VANESSA NADINE GRIS

Avaliação dos efeitos antinociceptivos e farmacocinética do tramadol em jabutis-piranga

São Paulo

2018

VANESSA NADINE GRIS

Avaliação dos Efeitos Antinociceptivos e

Farmacocinética do Tramadol em Jabutis-Piranga

Dissertação/Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:

Prof[a]. Dr[a]. Silvia Renata Gaido Cortopassi

De acordo:_____

Orientador

São Paulo
2018

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

VERSÃO CORRIGIDA

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3632
FMVZ

Gris, Vanessa Nadine
Avaliação dos efeitos antinociceptivos e farmacocinética do tramadol em jabuti-piranga. / Vanessa Nadine Gris. -- 2018.
80 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Silvia Renata Gaido Cortopassi.

1. Antinocicepção. 2. Chelonoidis carbonarius. 3. CG-MS/MS. 4. Opioide. 5. Répteis. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada por Denise Yamashita, CRB-8/8931.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos Efeitos Analgésicos e Farmacocinética do Tramadol em Jabutis-piranga", protocolada sob o CEUA nº 6687070716, sob a responsabilidade de **Silvia Renata Gaido Cortopassi** *e equipe; Vanessa Nadine Gris; Caroline Topan da Silva* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 15/08/2016.

We certify that the proposal "Evaluation of the analgesic effects and pharmacokinetics of tramadol in red-footed tortoises", utilizing 9 Reptiles (males and females), protocol number CEUA 6687070716, under the responsibility of **Silvia Renata Gaido Cortopassi** *and team; Vanessa Nadine Gris; Caroline Topan da Silva* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/15/2016.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 09/2016 a 02/2017 Área: Clínica Cirúrgica Veterinária

Origem:	Não aplicável biotério						
Espécie:	Répteis	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 15 anos	N:	9
Linhagem:	Jabuti-piranga			Peso:	1 a 15 kg		

Resumo: O Brasil é considerado detentor de uma das maiores biodiversidades mundiais, ocupando a terceira posição em relação ao número total de répteis (791), atrás apenas da Austrália (1038) e do México (910). Entre eles encontra-se o jabuti-piranga (Chelonoidis carbonarius), um quelônio comum nas matas brasileiras, encontrado do nordeste ao sudeste do país. De acordo com a International Association for the Study of Pain, a dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada à lesão real ou potencial nos tecidos. A IASP reforça ainda que a dor é subjetiva e que a incapacidade de se comunicar verbalmente não elimina a possibilidade de um indivíduo estar experimentando a dor. A consequência da dor não tratada consiste em sofrimento e quebra da homeostase do paciente. Essas alterações podem resultar em balanço energético negativo, levar ao comprometimento do sistema imune, inibir a cicatrização e interferir no processo comportamental normal essencial para a saúde. Levando em consideração que todos os animais vertebrados são passíveis de injúria e apresentam as estruturas neuroanatômicas e neurofarmacológicas necessárias para nocicepção e resposta a estímulos nocivos e que o reconhecimento da dor em répteis é complexo, podendo ser ainda mais difícil determinar objetivamente quando uma medicação analgésica é eficaz para o paciente, conclui-se que existe um campo muito abrangente a ser estudado com relação aos processos dolorosos experienciados por esses animais. Diversos testes nociceptivos foram estabelecidas para utilização em vertebrados, mas poucos estão disponíveis para répteis. Um deles é a avaliação do período para retirada da pata quando se aplica um estímulo térmico. Este método é fácil, rápido e não-invasivo em comparação com outros métodos e os animais podem escapar imediatamente do estímulos movendo sua pata traseira. Em pesquisa feita com clínicos da Associação de Veterinários de Répteis e Anfíbios o butorfanol foi apontado como o fármaco analgésico opioide mais comumente administrados em répteis. Nesse mesmo trabalho, as doses variavam de 0,02 mg/kg até 25 mg/kg, com intervalos de administração variando de 4 a 48 horas. Entretanto, já foi demonstrado que o butorfanol não possui efeitos significativos na diminuição da CAM do isoflurano em iguanas e não aumenta o tempo de latência térmica em tigres d'água americanos e dragões barbudos. Além disso, nota-se uma lacuna na definição das doses e intervalos de administração. A mofina comprovadamente promove aumento da latência térmica na dose de 1,5 mg/kg, porém com uma depressão respiratória consistente. Diante dessa perspectiva clínica, o tramadol se tornou um analgésico amplamente utilizado na prática veterinária como uma alternativa ao uso de outros opioides, pela facilidade de administração oral, não ser uma substância controlada e por não causar depressão respiratória importante nas doses terapêuticas. Em geral, para avaliar a eficácia dos fármacos analgésicos é importante determinar a farmacocinética e farmacodinâmica especificamente para a espécie. Escassos trabalhos apresentam as farmacocinética dos opioides em répteis como a buprenorfina, o tapentadol e o tramadol. Embora os répteis tenham sofrido uma grande popularização como animais de companhia e tenham importante representação em zoológicos, laboratórios de pesquisa e centros de triagem, estudos específicos com dados relevantes sobre analgesia e o efeito dos opioides são escassos. Na rotina, as doses terapêuticas são em sua grande parte extrapoladas a partir de dose estabelecidas para pequenos animais e os poucos estudos existentes não abrangem a especificidade e diversidade das espécies. Sendo assim, são necessários mais estudos

relacionados à analgesia em répteis, especificamente na espécie Chelonoidis carbonarius.

Local do experimento: Divisão Técnica de Medicina Veterinária e Manejo da Fauna Silvestre (DEPAVE-3) Universidade de São Paulo

São Paulo, 17 de agosto de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: GRIS, Vanessa Nadine

Título: **Avaliação dos efeitos antinociceptivos e farmacocinética do tramadol em jabutis-piranga**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Silvia Renata Gaido Cortopassi, figura de caráter admirável e excelência profissional que me inspira diariamente, pelas observações atentas e dedicação dispensada a mim. Foi um privilégio realizar esse trabalho sob sua orientação.

Ao Prof. Dr. Adriano Bonfim Carregaro pela paciência, arguição generosa e sugestões feitas no exame de qualificação e também pela parceria durante meu mestrado e especialização.

À equipe do CeMaCAs: Sergio, Francisco, Juliana, Rodrigo, Ticiana, Amanda, Luiz e dona Alice por terem me recebido e ajudado sempre da melhor forma possível.

Aos pesquisadores Claudia Barbosa e Rodobiko Hirata do Instituto Biológico de São Paulo. À Drª Claudia Ciscato, pessoa incrível que tive o privilégio de conhecer quase no final do mestrado, pelo auxílio com a análise cromatográfica e pelas conversas enriquecedoras.

À Profª Drª Cristina Massoco pelas sugestões feitas no exame de qualificação, por ter aberto as portas do laboratório e pelo incentivo à pesquisa. À Andressa Kotleski pela imensa ajuda nesse trabalho, pela amizade, por tratar com carinho e zelo meus projetos pessoais e profissionais e por ter feito parte da minha vida como ninguém durante todo esse período. Amo você.

Ao Julio Ken Nagashima pela ajuda no experimento, por todos os momentos amáveis e encontros e desencontros em Curitiba e em São Paulo.

Ao querido amigo Mario Ferraro pela ajuda fundamental na redação e estatística desse trabalho, pela paciência e pela preciosa amizade.

À Caroline Topan pela ajuda no experimento e por ser especialmente cuidadosa e preocupada com os nossos animais.

Ao Vagner Gonçalves por passar um ano inteiro comigo no processo da cromatografia e ser peça fundamental na etapa de extração e análise das amostras. Pelos momentos de descontração e pela amizade que criamos.

À equipe do LADTOX-VPT-USP: Herculano, Drª Nicole Hazarbassanov e Prof. Dr. Jorge Flório.

À Drª Mirtes Eliete Velletri de Souza do Jockey Clube de São Paulo pela doação do padrão de tramadol.

Às professoras Denise Fantoni e Aline Ambrósio e à Patrícia Flor pela valiosa contribuição à minha carreira profissional. À Geni Cristina por todos os conselhos e amizade.

À Lívia Gimenez pela companhia e por todo auxílio com as questões burocráticas durante o mestrado.

Ao Belarmino Ney, da secretaria do Departamento de Cirurgia.

Aos auxiliares Miron, Jesus Vieira, Cledson Lélis e Otávio Rodrigues. Aos integrantes do Núcleo de Anestesiologia Veterinária (NAVE) da FZEA-USP, especialmente à Shayne, Thaís e Thayane, por terem me recebido durante o treinamento em Pirassununga e terem compartilhado o termoalgímetro para que eu pudesse realizar o projeto.

Aos meus amigos da FMVZ-USP: Aline Macedo, Lucas Alaião, Juliana Durigan, Paula Pacheco, Marco Pereira, Ana Flávia, Rosana Thurler, Nadia Yuri, Isis Dal-Bó, Naiá Carvalho, Bianca Fiuza, Clarissa Muniz, Gabriel Diamante e Renato Otaviano pelo companheirismo e pelos momentos especiais na nossa “salinha da pós”.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2016/15776-2 pelo apoio financeiro, sem o qual o presente trabalho não poderia ser concluído.

Finalmente, agradeço aos meus pais Nadir e Delci e ao meu irmão Vinicius pelo amor enorme, por vibrarem as minhas vitórias e apoiarem as minhas escolhas.

Young Tom Joad and the preacher watched the turtle go—waving its legs and boosting its heavy, high-domed shell along toward the southwest.

"Where the hell you s'pose he's goin'?" said Joad.

"I seen turtles all my life. They're always goin' someplace. They always seem to want to get there."

John Steinbeck, The Grapes of Wrath, 1939

RESUMO

GRIS, V.N. **Avaliação dos efeitos antinociceptivos e farmacocinética do tramadol em jabutis-piranga.** [Evaluation of the antinociceptive effects and pharmacokinetics of tramadol in red-footed tortoises]. 2018. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

O tramadol é um analgésico de ação central amplamente utilizado em répteis. Seu efeito ocorre por meio da ativação de receptores opioides e do bloqueio da recaptação de serotonina e norepinefrina. Este estudo objetivou avaliar a atividade antinociceptiva e a farmacocinética do tramadol em jabutis-piranga. Oito jabutis receberam quatro tratamentos, com intervalo mínimo de 21 dias: solução salina (grupo controle), tramadol nas doses de 5 mg/kg (TIM5) e 10 mg/kg (TIM10) por via intramuscular e 5 mg/kg (TIV5) por via intravenosa. Um estímulo nociceptivo térmico foi aplicado na superfície plantar dos animais e a avaliação da latência do reflexo de retirada do membro foi realizada nos tempos 0, 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48, 72 e 96 horas. Foi realizada também colheita de sangue e análise do plasma por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas triplo quadrupolo. A farmacocinética do tramadol foi calculada por abordagem não-compartimental. A concentração máxima para TIM5 e TIM 10 foi de 128,98 ± 59,46 ng/mL e 613,87 ± 524,26 ng/mL, respectivamente. A meia-vida de eliminação foi de 21,22 ± 8,74 horas para TIV5, 32,84 ± 6,41 horas para TIM5 e 22,5 ± 8,02 horas para TIM10. As doses de tramadol 10 mg/kg por via intramuscular e 5 mg/kg por via intravenosa não apresentaram alteração do tempo de latência para o reflexo de retirada do membro. O grupo que recebeu 5 mg/kg por via intramuscular apresentou diferença nos tempos 1 hora e 24 horas após a administração. O tramadol não apresentou efeito antinociceptivo consistente por via intramuscular nas doses de 5 e 10 mg/kg e por via intravenosa na dose de 5 mg/kg em jabutis-piranga. Independente da via de administração, o tramadol apresentou meia-vida de eliminação longa.

Palavras-chave: Antinocicepção. *Chelonoidis carbonarius*. CG-MS/MS. Opioide. Répteis.

ABSTRACT

GRIS, V. N. **Evaluation of the antinociceptive effects and pharmacokinetics of tramadol in red-footed tortoises.** [Avaliação dos efeitos antinociceptivos e farmacocinética do tramadol em jabutis-piranga]. 2018. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Tramadol is a centrally acting analgesic widely used in reptiles. It promotes activation of opioid receptors and inhibits serotonin and norepinephrine reuptake. This study aimed to evaluate the antinociceptive effects and pharmacokinetics of tramadol in red-footed tortoises. Eight animals were treated with four different protocols, with a 3-week washout period: saline IM (control group), tramadol 5 mg/kg IM (TIM5) and 10 mg/ kg IM (TIM10) and 5 mg/kg IV (TIV5). Infrared heat stimuli was applied to the plantar surface of the animals and thermal withdrawal latencies were measured at 0 and 30 minutes, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48, 72 and 96 hours after drug treatment. Blood samples were obtained and plasma analysis performed by gas chromatography - triple quadrupole tandem mass spectrometry. Pharmacokinetics parameters were determined using non-compartimental equations. The average peak drug concentration was 128.98 ± 59.46 ng/mL (TIM5) and 613.87 ± 524.26 ng/mL (TIM10). The elimination half-life was 21.22 ± 8.74 hours (TIV5), 32.84 ± 6.41 hours (TIM5) and 22.5 ± 8.02 hours (TIM10). TIM10 and TIV5 showed no changes in thermal withdrawal latencies. TIM5 showed a significant increase in thermal withdrawal latencies at 1 hour and 24 hours after administration. Tramadol did not induce a consistent antinociceptive effect at 5 mg/kg and 10 mg/kg IM and ar 5 mg/kg IV in red-footed tortoises. Regardless of the route of administration, tramadol had a long half-life and plasma concentrations close to those reported in other species.

Keywords: Antinociception. *Chelonoidis carbonarius*. GC-MS/MS. Opioid. Reptiles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Recinto dos jabutis-piranga com lâmpada infravermelha de aquecimento 31

Figura 2 - Dieta dos jabutis-piranga composta por frutas, verduras, legumes e ração 31

Figura 3 - Administração intramuscular em jabuti-piranga 33

Figura 4 - Instrumento de teste plantar utilizado para termoalgimetria em jabutis-piranga 35

Figura 5 - Compartimento individual do instrumento de teste plantar utilizado para termoalgimetria em jabutis-piranga 35

Figura 6 - Display do instrumento de termoalgimetria 35

Figura 7 - Colheita de sangue da veia jugular de jabuti-piranga 35

Figura 8 - Cromatogramas representativos de (a) plasma de jabuti sem tramadol, (b) plasma de jabuti fortificado com tramadol (250 ng/ml), (c) plasma de jabuti após 30 minutos da administração de 5mg/kg de tramadol por via intravenosa.....51

Figura 9 - Cromatograma sobreposto representativo de plasma de jabuti fortificado com tramadol (250 ng/ml) e plasma de jabuti após 30 minutos da administração de 5mg/kg de tramadol por via intravenosa. o tempo de retenção foi de 8,864 para a fortificação e 8,870 minutos para a amostra 51

Figura 10 - Curva de calibração para o tramadol em plasma de jabuti nas concentrações de 0,0025 a 0,75 ng/µl 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições cromatográficas para análise de cloridrato de tramadol em plasma de jabuti-piranga (*Chelonoidis Carbonarius*).....37

Tabela 2 – Valores individuais dos exames de hematócrito, proteína total e aspartato aminotransferase em jabutis-piranga (*Chelonoidis Carbonarius*) (N = 8) 42

Tabela 3 – Latência (segundos) para o reflexo de retirada do membro frente a um estímulo termonociceptivo aplicado na face plantar de jabuti-piranga após a administração de tramadol (10 mg/kg) 43

Tabela 4 - Latência (segundos) para reflexo de retirada do membro frente um estímulo termonociceptivo aplicado na face plantar de jabutis-piranga (semana 1) 44

Tabela 5 - Latência (segundos) para reflexo de retirada do membro frente a um estímulo termonociceptivo aplicado na face plantar de jabutis-piranga (semana 2) 45

Tabela 6 - Latência (segundos) para reflexo de retirada do membro frente a um estímulo termonociceptivo aplicado na face plantar de jabutis-piranga (semana 3) 45

Tabela 7 - Latência (segundos) para reflexo de retirada do membro frente a um estímulo termonociceptivo aplicado na face plantar de jabutis-piranga (semana 4) 46

Tabela 8 - Valores médios e respectivos desvios-padrão da latência (segundos) do reflexo de retirada do membro de jabutis-piranga que receberam solução salina 0,9% IM (SAL), 5 mg/kg de tramadol IM (TIM5), 10 mg/kg de tramadol IM (TIM10) e 5 mg/kg de tramadol IV (TIV5) 47

Tabela 9 - Valores médios e respectivos desvios-padrão da diferença entre os momentos e o basal da latência (segundos) do reflexo de retirada do membro de jabutis-piranga que receberam solução salina 0,9% IM (SAL), 5 mg/kg de tramadol IM (TIM5), 10 mg/kg de tramadol IM (TIM10) e 5 mg/kg de tramadol IV (TIV5) 48

Tabela 10 - Valores médios e respectivos desvios-padrão da temperatura corporal (cº) de jabutis piranga até 96 horas de experimento e os respectivos valores de *p* entre grupos no mesmo momento e no mesmo grupo ao longo do tempo.....50

Tabela 11 - Concentração plasmática (individuais e média) do cloridrato de tramadol em oito jabutis-piranga tratados por via IV (5 mg/kg) 53

Tabela 12 - Parâmetros farmacocinéticos (individuais e média ± dp) obtidos por análise não compartimental do cloridrato de tramadol após administração de 5 mg/kg IM em jabutis-piranga (n=8).....54

Tabela 13 - Concentração plasmática (individuais e média) do cloridrato de tramadol em oito jabutis-piranga tratados por via IM (5 mg/kg) 55

Tabela 14 - Parâmetros farmacocinéticos (individuais e média ± dp) obtidos por análise não compartimental do cloridrato de tramadol após administração de 5 mg/kg IM em jabutis-piranga (n=8).....56

Tabela 15 - Concentração plasmática (individuais e média) do cloridrato de tramadol em oito jabutis-piranga tratados por via IM (10 mg/kg) 57

Tabela 16 - Parâmetros farmacocinéticos (individuais e média ± dp) obtidos por análise não compartimental do cloridrato de tramadol após administração de 10 mg/kg IM em jabutis-piranga (n=8).....58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Representação gráfica dos valores médios da latência (segundos) do reflexo de retirada do membro de jabutis-piranga que receberam solução salina 0,9% IM (SAL), 5 mg/kg de tramadol IM (TIM5), 10 mg/kg de tramadol IM (TIM10) e 5 mg/kg de tramadol IV (TIV5) 47

Gráfico 2 - Representação gráfica dos valores médios da latência (segundos) do reflexo de retirada do membro de jabutis-piranga que receberam solução salina 0,9% IM (SAL), 5 mg/kg de tramadol IM (TIM5), 10 mg/kg de tramadol IM (TIM10) e 5 mg/kg de tramadol IV (TIV5) 49

Gráfico 3 - Representação gráfica dos valores médios da temperatura corporal (cº) de jabutis-piranga que receberam solução salina 0,9% IM (SAL), 5 mg/kg de tramadol IM (TIM5), 10 mg/kg de tramadol IM (TIM10) e 5 mg/kg de tramadol IV (TIV5) 50

Gráfico 4 – Concentração plasmática do cloridrato de tramadol (ng/ml) após administração de 5mg/kg IV em jabutis-piranga (n=8) ao longo do tempo (média ± dp). 53

Gráfico 5 - Concentração plasmática do cloridrato de tramadol (ng/ml) após administração de 5mg/kg IM em jabutis-piranga (n=8) ao longo do tempo (média ± dp) 55

Gráfico 6 – Concentração plasmática do cloridrato de tramadol (ng/ml) após administração de 5mg/kg IM em jabuti -piranga (n=8) ao longo do tempo (média ± dp) 57

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO** 18
2 **REVISÃO DE LITERATURA** 19
2.1 CLASSE REPTILIA 19
2.2 AVALIAÇÃO DE DOR 21
2.3 USO DE OPIOIDES EM RÉPTEIS 23
2.4 TRAMADOL 24
2.4.1 **Tramadol: estrutura química, farmacocinética e farmacodinâmica** 25
3 **HIPÓTESE** 28
4 **OBJETIVO** 29
4.1 Objetivo geral 29
4.2 Objetivos específicos 29
5 **MATERIAIS E MÉTODOS** 30
5.1 ANIMAIS 30
5.2 PROJETO PILOTO 32
5.3 TERMOALGIMETRIA 32
5.4 AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA 36
5.4.1 Método analítico 36
5.4.1.1 Condições cromatográficas 36
5.4.2 Preparo das amostras 38
5.4.3 Recuperação 39
5.4.4 Avaliação não compartimental do perfil plasmático do tramadol 39
5.5 Análise Estatística 41
6 **RESULTADOS** 42
6.1 ANIMAIS 42
6.2 PROJETO PILOTO 43
6.3 TERMOALGIMETRIA 44
6.3.1 Comparação para os valores totais 46
6.3.2 Comparação com o basal 48
6.3.3 Temperatura corporal 49
6.4 AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA 51
6.4.1 Condições cromatográficas 51
6.4.2 Curva de calibração 52

6.4.3 Recuperação 52
6.4.4 Avaliação não compartimental do perfil plasmático do tramadol 53
7 **DISCUSSÃO** 59
7.1 TEMPERATURA CORPORAL 59
7.2 TESTE PLANTAR 59
7.3 AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA 65
7.4 LIMITAÇÕES 66
8 **CONCLUSÕES** 68
REFERÊNCIAS 69

1 INTRODUÇÃO

Os répteis fazem parte de um grupo amplo e diverso de animais cada vez mais presente na prática veterinária. O Brasil ocupa a 3ª posição mundial em relação ao número total de espécies de répteis e dentre eles encontra-se o jabuti-piranga (*Chelonoidis carbonarius*). O jabuti-piranga é um quelônio comum nas matas brasileiras, encontrado do nordeste ao sudeste do país que, juntamente com outros répteis como cágados e serpentes, é cada vez mais visto como animal de estimação (IBGE, 2103; UETZ; FREED; HOŠEK, 2017).

Segundo Hawkins e Paul-Murphy (2014) todos os vertebrados são passíveis de lesões e apresentam as estruturas neuroanatômicas e neurofarmacológicas necessárias para nocicepção e resposta a estímulos. Porém, o reconhecimento da dor em répteis é ainda complexo, podendo ser ainda mais difícil determinar objetivamente quando uma medicação analgésica é eficaz para o animal. O tramadol é um analgésico de ação central muito utilizado nesses animais, promovendo seu efeito por meio de uma interação entre os mecanismos de ação opioide, adrenérgico e serotoninérgico, com a vantagem de não causar depressão respiratória pronunciada (SLADKY et al., 2007; SOUZA; COX, 2011; MIOTTO et al., 2017). As características farmacocinéticas favoráveis do tramadol, como boa absorção, biodisponibilidade elevada e grande volume de distribuição, documentadas em humanos e cães e a incidência reduzida de efeitos depressores respiratórios em tartarugas de orelha vermelha, encorajam o estudo desse fármaco em répteis.

Embora os répteis tenham sofrido grande popularização como animais de companhia e possuam importante representação em zoológicos, laboratórios de pesquisa e centros de triagem, estudos específicos sobre o tratamento da dor e o efeito dos opioides ainda são escassos. Portanto, o presente estudo objetivou avaliar o efeito do tramadol em jabutis-piranga a partir de um estímulo nociceptivo experimental e mensurar as concentrações plasmáticas do fármaco após a administração intravenosa e intramuscular.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CLASSE REPTILIA

Os répteis caminham sobre a Terra há cerca de 250 milhões de anos e atualmente são encontrados em todos os continentes, exceto na Antártida. Eles são divididos em quatro ordens: *Testudines, Crocodylia, Rhynchocephalia* e *Squamata*. Os quelônios, integrantes da ordem *Testudines*, são os animais que apresentam carapaça e são os mais antigos répteis vivos, com cerca de 200 milhões de anos, enquanto as serpentes são as mais recentes (O'ḾALLEY, 2005; BUJES, 2010). De todos os répteis, são os quelônios que apresentam vida mais longa, podendo passar dos 50 anos em cativeiro (NORTON, 2005; O'MALLEY, 2005).

O Brasil é o detentor da 3ª maior riqueza de espécies de répteis do mundo, atrás apenas da Austrália (1057) e do México (936) (UETZ; FREED; HOŠEK, 2017). Atualmente o país conta com 773 representantes, sendo 36 espécies de tartarugas, cágados e jabutis (*Testudines)*, seis espécies de jacarés (*Crocodylia)* e 731 espécies de *Squamata* (73 anfisbenas, 266 lagartos e 392 serpentes) (COSTA; BÉRNILS, 2015).

O conhecimento sobre a história natural dos Testudines brasileiros é ainda rudimentar, apesar da sua grande diversidade (SOUZA, 2004). Relatos indicam que a distribuição geográfica do jabuti-piranga é bastante ampla, desde o leste dos Andes, ao longo da Guiana, Venezuela, Colômbia, Bolívia, Paraguai, norte da Argentina e parte da América Central (BULHLMAN, 2000; VINKE et al., 2008). No Brasil, ocorre nos estados do Amazonas, Pará, Roraima, Maranhão, Piauí, Pernambuco, Alagoas, Bahia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás (SILVA et al., 2005; VOGT et al., 2015).

O jabuti-piranga é um animal terrestre, onívoro e com dimorfismo sexual externo bastante evidente. Basicamente, o macho possui a cauda mais longa e robusta do que a da fêmea e uma concavidade evidente no plastrão que serve para facilitar a monta sobre as fêmeas. As fêmeas apresentam o plastrão sem concavidade ou ligeiramente convexo (CONCEIÇÃO et al., 2009).

O jabuti-piranga não faz parte da lista vermelha das espécies ameaçadas da União Internacional para Conservação da Natureza (UICN). Na Convenção Sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas da Fauna e Flora Silvestres – CITES, a espécie consta no apêndice II, ou seja, atualmente não está ameaçada porém pode se tornar futuramente caso a população não seja monitorada. Embora o jabuti-piranga seja intensamente utilizado de forma ilegal como animal de estimação e na alimentação humana, essas atividades parecem não afetar significativamente sua população (NORTON, 2005; VOGT, 2008). Por essas razões, a espécie foi categorizada como Menos Preocupante (LC – *Least Concern*) na Avaliação de Risco de Extinção de Espécies no Brasil (VOGT, 2015).

A temperatura corporal desses animais varia conforme a temperatura ambiente e é controlada por métodos comportamentais (NORTON, 2005; SYKES; GREENACRE, 2006). Uma pequena porção de calor metabólico é produzida, porém devido à falta de pelos e de gordura corporal, não há isolamento térmico próprio e os animais perdem calor rapidamente e com maior facilidade (O'MALLEY, 2005). Cada espécie possui uma zona de temperatura preferencial (ZdTP). Para a maioria das espécies terrestres, a temperatura ideal encontra-se entre 26°C e 38°C, e para espécies aquáticas ou semi-aquáticas entre 25°C e 35°C (BOYER; BOYER, 2006; LONGLEY, 2008; SLADKY; MANS, 2012). Os sistemas imunológico, cardiovascular e respiratório são dependentes da termorregulação (MOSLEY, 2005; MITCHELL, 2006; MARTINEZ-JIMENEZ; HERNANDEZ-DIVERS, 2007; LONGLEY, 2008).

Outra característica marcante dessa classe é a existência de sistema portarrenal. Historicamente, a administração de fármacos nos membros pélvicos ou cauda tem sido evitada devido ao efeito da rápida eliminação pelo sistema portar renal e potencial nefrotoxidade de alguns medicamentos (MOSLEY, 2005; SYKES; GREENACRE, 2006). Entretanto, estudos em tartarugas de orelha vermelha (*Trachemys scripta elegans*) sugerem que essa preocupação parece ser mais teórica do que prática porque apenas uma pequena quantidade de sangue desses membros passa pelos rins e esse sistema teria basicamente a função de perfusão renal nos casos de privação hídrica (HOLZ et al., 1997).

Os répteis possuem sistema nervoso bem desenvolvido, apresentam cérebro que corresponde a 1% da massa corporal e medula espinhal que vai até a

ponta da cauda, não possuindo cauda equina (BENNETT, 1996). O córtex dos hemisférios cerebrais, entretanto, é bastante simples e rudimentar, possuindo apenas uma única camada de células enquanto os mamíferos atuais apresentam seis camadas de isocórtex (DALGALARRONDO, 2011).

O exame físico pode indicar o estado de higidez dos quelônios. Parâmetros como perfusão, hidratação e temperatura corporal podem ser realizados sem grandes complicações. O tempo de preenchimento capilar e coloração de mucosas podem ser avaliados na cloaca e na boca. Os parâmetros utilizados para avaliar a hidratação incluem umidade da membrana mucosa, a elasticidade da pele (valor limitado devido ao tegumento altamente queratinizado), valores de hematócrito e de proteína total (MARTINEZ-JIMENEZ; HERNANDEZ-DIVERS, 2007). Em quelônios, os locais para punção de sangue venoso incluem a veia jugular, veia braquial, seio venoso supraoccipital, veia coccígea dorsal e ventral e veias subcarapaciais (MARTINEZ-JIMENEZ; HERNANDEZ-DIVERS, 2007; SCHUMACHER, 2008; MEDEIROS et al., 2012).

A quantidade máxima de sangue que pode ser colhida de um réptil saudável é de 0,8% do peso corporal. O volume total de sangue representa entre 5% e 8% do peso corporal e até 10% disso pode ser colhido com segurança (LONGLEY, 2008). Os anticoagulantes de escolha são heparina lítica ou heparina sódica, pois o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) pode causar hemólise. É preferível avaliar o plasma em vez do soro, uma vez que o volume de plasma é maior e a formação de coágulos é imprevisível e pode causar alteração na amostra (LONGLEY, 2008; NORTON; WALSH, 2012).

2.2 AVALIAÇÃO DE DOR

Por muito tempo acreditou-se que somente os humanos poderiam experimentar realmente a dor por causa da consciência da dor que sentem. Até meados de 1980, recém-nascidos e crianças eram submetidas a procedimentos e até mesmo cirurgias complexas como amputações, com anestesia e analgesia limitadas (SCHECHTER; ALLAN; HANSON, 1986). Os médicos acreditavam que a percepção de dor em crianças era subdesenvolvida devido a um estágio imaturo do

desenvolvimento sistema nervoso central. Essa crença só foi desmistificada com o avanço rápido das pesquisas em dor pediátrica e com o ativismo intenso de muitos pais que participavam do sofrimento de sua família (GUARDIOLA; BAÑOS, 1993; RODKEY; RIDDELL, 2013).

Técnicas mais antigas de contenção e anestesia de répteis incluem o resfriamento, um método que diminui a resposta e o metabolismo dos animais ectotérmicos, facilitando a manipulação. A técnica, porém, não promove analgesia e a hipotermia intensa pode levar a lesõe e formação de focos de necrose cerebral (SCHUMACHER; YELEN, 2006).

De acordo com a *International Association for the Study of Pain* (IASP), a dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada à lesão real ou potencial nos tecidos. A IASP reforça que a dor é subjetiva e que a incapacidade de se comunicar verbalmente não elimina a possibilidade de um indivíduo estar experimentando a dor (PAUL-MURPHY et al., 2004). Uma vez que todos os vertebrados possuem os componentes para a nocicepção da dor e o papel dos componentes para a percepção de estímulos nocivos ainda não está bem estabelecido, deve-se considerar que os animais passam pela experiência aversiva da dor ou sentem a dor *per se*, mesmo que eles não possam comunicar verbalmente a consciência da mesma (HAWKINS, 2006; NRC, 2009). A consequência da dor não tratada consiste em sofrimento e quebra da homeostase do paciente (READ, 2004; KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008). Essas alterações podem resultar em balanço energético negativo, levar ao comprometimento do sistema imune, inibir a cicatrização e interferir no processo comportamental normal (MUIR, 2009; MOSLEY, 2011).

Equívocos sobre a natureza e significado da dor, dificuldades em reconhecer sua gravidade, incertezas quanto às terapias mais adequadas e uma falta de dados científicos consistentes em animais exóticos têm dificultado a compreensão da dor nesses pacientes (HAWKINS, 2006; DUNCAN, 2012).

Embora a perda de apetite e aumento das frequências cardíaca e respiratória possam ser sinais observados em animais sentindo dor, a ausência dessas alterações não assegura necessariamente conforto (HAWKINS, 2006). A demonstração de comportamentos de dor por espécies consideradas presas pode atrair a atenção indesejada de predadores: desse modo, os quelônios, animais que apresentam comportamento estoico, podem apresentar sinais muito sutis de dor. A

maioria dos quelônios não vocaliza e não apresenta expressões faciais (FLEMING, 2008). Eles podem demonstrar desconforto ao estender a cabeça e pescoço para dentro e fora da carapaça, morder quando manuseados ou semicerrar ou fechar os olhos (DUNCAN, 2012). A dor crônica e persistente é associada com inapetência, letargia e perda de peso; no entanto, é difícil associar esses sinais de comprometimento do bem-estar especificamente com dor (NRC, 2009).

Diversos testes nociceptivos foram estabelecidos para utilização em vertebrados, mas poucos estão disponíveis para répteis. Um dos métodos disponíveis é o tempo para retirada do membro ou cauda frente a um estímulo térmico. Este método é fácil, rápido e não invasivo em comparação com outros métodos, como o teste de formalina ou capsaicina, e os animais podem escapar imediatamente do estímulo movendo-se para longe dele.

Em uma pesquisa realizada com médicos veterinários da Associação de Veterinários de Répteis e Anfíbios, residentes na América do Norte, Read (2004) relata que um dos principais fatores que influenciam os médicos veterinários na administração rotineira de fármacos analgésicos é a percepção dos médicos veterinários sobre a dor. A maioria dos participantes (75,5%) afirmou que utilizam analgésicos baseando-se na extrapolação do grau de dor de um procedimento similar realizado em outras espécies. Quase todos os participantes [361 (98,4%) respostas] acreditam que os répteis podem sentir dor; entretanto somente 39% dos que responderam, utilizam analgésicos em mais de 50% dos seus pacientes.

2.3 USO DE OPIOIDES EM RÉPTEIS

Os analgésicos opioides fazem parte de uma classe de fármacos extremamente eficaz no controle da dor. Bem descrita em mamíferos, a modulação da nocicepção ocorre em receptores localizados no sistema nervoso central, tanto na medula espinhal como em estruturas supra-espinhais, sendo ainda descrita a ação em tecidos periféricos (PASCOE, 2000). Os receptores opioides têm, dentre diversas funções, o papel de modular a nocicepção e encontram-se conservados em diversas ordens de vertebrados. Estudos realizados em peixes, anfíbios e

répteis confirmaram a presença de receptores μ e δ similares aos encontrados em mamíferos (LI; KEITH JR.; EVANS, 1996; XIA; HADDAD, 2001). Outras pesquisas sugerem também a existência de um sistema opioide endógeno em répteis, com ação em nível central modulando diversos processos fisiológicos (REINER, 1987; POLZONETTI-MAGNI et al., 1994). Agonistas μ, como a morfina, podem causar depressão respiratória significativa em *Trachemis scripta* e *Iguana iguana* (MOSLEY; DYSON; SMITH, 2004; SLADKY et al., 2007, 2009). Por outro lado, os opioides como o butorfanol e o tramadol parecem estar associados com efeitos adversos respiratórios menores em tartarugas de orelha vermelha (SLADKY et al., 2007, 2009; CUMMINGS; SLADKY; JOHNSON, 2009).

O butorfanol (fármaco agonista κ e antagonista μ) foi apontado como o fármaco analgésico opioide mais administrado em répteis (READ, 2004). Nesta mesma pesquisa, as doses variavam de 0,02 mg/kg até 25 mg/kg, com intervalos de administração variando de 4 a 48 horas. Entretanto, já foi demonstrado que o butorfanol não possui efeitos significativos na diminuição da concentração alveolar mínima (CAM) do isofluorano em iguanas e não aumenta o tempo de latência térmica (tempo para que o animal retire o membro de uma fonte de estímulo nociceptivo) em *Trachemis scripta* e dragões barbudos (*Pogona vitticeps)* (MOSLEY; DYSON; SMITH, 2003; SLADKY et al., 2007, 2008). Já a morfina, agonista μ, promoveu aumento da latência térmica nessas espécies na dose de 1,5 mg/kg, porém com depressão respiratória prolongada (SLADKY et al., 2007). Em cobras do milho (*Elaphe guttata*), porém, uma dose alta de butorfanol (20 mg/kg) promoveu resposta antinociceptiva, enquanto uma dose alta de morfina (40 mg/kg) não demonstrou ser efetiva (SLADKY et al., 2008).

Diante dessa perspectiva clínica, o tramadol tornou-se um analgésico amplamente utilizado na prática veterinária como uma alternativa ao uso de outros opioides, pela facilidade de administração oral e por não ser uma substância controlada (SOUZA; COX, 2011).

2.4 TRAMADOL

2.4.1 Tramadol: estrutura química, farmacocinética e farmacodinâmica

O tramadol (1RS,2RS)-2-[(dimetilamino)-metil]-1-(3-metoxifenil)-ciclohexanol) é um analgésico de ação central que exerce ação em receptores opioides, sendo responsável também pela inibição da recaptação de serotonina e norepinefrina (MYERS, 2005; IDE et al., 2006). É comercializado como uma mistura racêmica de dois enantiômeros: a forma (+)-tramadol e a forma (-)-tramadol. A primeira forma é responsável pela inibição da receptação de serotonina; o (-)-tramadol é responsável pela inibição da receptação da norepinefrina (GROND; SABLOTZKI, 2004). Devido ao seu mecanismo de interação com os sistemas noradrenérgico e dopaminérgico, o tramadol tem sido utilizado no tratamento da ansiedade e da depressão, com efeitos já demonstrados em camundongos (JESSE et al., 2010; VAZZANA et al., 2015). Em relação à sua ação em receptores opioides, o tramadol tem uma afinidade moderada por receptores μ e uma afinidade ínfima por receptores δ e κ (RAFFA et al. 1992). A afinidade do tramadol por receptores μ é aproximadamente 6000 vezes menor que a da morfina (FRINK et al., 1996).

Absorção

Em pacientes veterinários, a administração oral de tramadol é usada comumente para analgesia. O tramadol administrado por via oral em humanos atinge o pico de concentração plasmática (C_{max}) entre 1,2 e 1,9 horas, enquanto em tartarugas-cabeçudas (10 mg/kg) a $C_{max,}$ foi encontrada em 14 ± 6,44 horas (GROND; SABLOTZKI, 2004; NORTON et al., 2015). Após administração intramuscular de 50 mg e 100 mg em humanos, o tramadol atingiu concentração máxima de 166 μg/L em 0,75 horas e 355-369 μg/L entre 0,9 e 1,1 horas respectivamente (LINTZ; BEIER; GERLOFF, 1999; CHAO et al., 2000). Na administração por via intramuscular em *Trachemis scripta scripta* a C_{max} foi de 58,22 ± 25,18 μg/mL atingida em 0,7 ± 0,16 horas (GIORGI et al., 2015b). Após administração via intravenosa (100 mg) em humanos, as concentrações de tramadol encontradas foram 553, 483 e 409 μg/L em 0,5, 1 e 2 horas, respectivamente (LINTZ et al., 1986).

Distribuição

O tramadol apresenta pKa de 9,41, afinidade elevadas pelos tecidos e ligação com proteínas plasmáticas de aproximadamente 20% (GROND; SABLOTZKI, 2004; BOX; COMER, 2008). O tramadol é caracterizado por extensa distribuição tecidual (volume aparente de distribuição 3L/kg e volume de distribuição total após administração parenteral de 203L (LINTZ et al., 1986; LEE; MCTAVISH; SORKIN, 1993; KLOTZ, 2003).

A meia vida de eliminação em humanos encontra-se entre 4,5 e 9,5 horas e a depuração plasmática é moderadamente alta (600 mL/min) (KLOTZ, 2003). A média do tempo de meia vida encontrada em tigres d'água e tartarugas-cabeçudas foi 28,7 horas e 22,67 horas, respetivamente (GIORGI et al., 2015b; NORTON et al., 2015).

O tramadol é extensivamente metabolizado pelas enzimas do citocromo P-450 2D6, 2B6 e 3A4 no fígado, onde passa por biotransformação e resulta em diversos metabólitos. O principal deles é o O-desmetiltramadol, também conhecido como M1. Em modelos animais, o M1 demonstrou ser até seis vezes mais potente que o tramadol em termos de analgesia e demonstrou afinidade de ligação 200 vezes maior com receptores μ (RAFFA et al. 1992; FRINK et al., 1996; WU et al., 2002). Sua excreção é primariamente renal. Apesar disso, demonstrou-se que o tramadol não diminui o fluxo sanguíneo renal em ratos com função renal intacta e com insuficiência renal induzida, sendo considerado um analgésico seguro no pós-operatório de pacientes nefropatas (NAGAOKA et al. 2002). Em cães e ratos, o tramadol inalterado é eliminado na urina juntamente com mais 26 metabólitos (WU et al., 2001).

Baker, Sladky e Johnson (2011) demonstraram que o tramadol nas doses de 10 e 25 mg/kg administrado por via oral, promoveu aumento nos tempos de latência térmica quando comparado com o grupo controle que em tartarugas de orelha vermelha. A dose mais alta (25 mg/kg) causou depressão respiratória importante, não sendo recomendada clinicamente. Embora ocorra diminuição da ventilação também na dose de 10 mg/kg, a depressão respiratória foi significativamente menor do que a causada pela morfina (SLADKY et al., 2007).

A avaliação da eficácia dos fármacos analgésicos depende em grande parte da determinação da farmacodinâmica e farmacocinética específicas para cada espécie (TOUTAIN; LESS, 2004). Porém, é importante salientar que o nível plasmático do agente não necessariamente está correlacionado com a analgesia e duração do seu efeito (HAWKINS, 2006).

Em relação à farmacocinética dos analgésicos em répteis, estudos foram publicados com o cetoprofeno (TUTTLE et al., 2006) e com o meloxicam em iguanas (DIVERS et al., 2010), tartarugas-cabeçudas (*Caretta caretta*) (LAI et al., 2015) e *Trachemys scripta scripta* (DI SALVO et al., 2016). Quanto aos opioides, pode-se citar os estudos de Kummrow et al. (2008) com buprenorfina em tartarugas de orelha vermelha, de Giorgi et al. (2015a;b) com tapentadol e tramadol em tigres d'água e de Norton et al. (2015) com tramadol em tartarugas-cabeçudas.

Embora avanços recentes tenham sido atingidos quanto à avaliação de dor em répteis e anfíbios, muitas lacunas precisam ser preenchidas no que diz respeito à farmacocinética, eficácia e efeitos adversos dos analgésicos mais comuns utilizados na prática clínica. Mesmo dentro da classe, a diversidade de répteis em termos de tamanho, anatomia e fisiologia apresenta um desafio clínico único para o veterinário.

3 HIPÓTESE

A hipótese do presente estudo é de que o tramadol promoveria efeito antinociceptivo em jabutis-piranga nas doses de 5 mg/kg por via intravenosa e 5 e 10 mg/kg por via intramuscular.

4 OBJETIVO

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito antinociceptivo e a farmacocinética do tramadol em jabutis-piranga.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito antinociceptivo promovido por uma dose de tramadol administrada pela via intravenosa (5 mg/kg) e duas doses de tramadol (5 e 10 mg/kg) administradas pela via intramuscular em jabutis-piranga submetidos ao estímulo térmico nociceptivo na face plantar do membro pélvico.

Determinar a concentração plasmática do tramadol administrado por via intravenosa e intramuscular em jabutis-piranga por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

Apresentar a farmacocinética do tramadol administrado por via intravenosa e intramuscular em jabutis-piranga.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo sob o protocolo de número 6687070716. O projeto foi autorizado pelo Ministério do Meio Ambiente por meio do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO número 54536-1) e pela Comissão Científica da instituição mantenedora dos animais em estudo, Secretaria do Verde e Meio Ambiente da Prefeitura de São Paulo.

A etapa de teste de nocicepção e colheita de material biológico foi realizada no Centro de Manejo e Conservação de Animais Silvestres (CeMaCAS) da Prefeitura de São Paulo. O CeMaCAS fica localizado dentro do Parque Anhanguera, no bairro de Perus, na cidade de São Paulo.

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados oito fêmeas de jabuti-piranga provenientes do CeMaCAS, identificadas individualmente e mantidas em recinto coletivo.

A avaliação do estado de saúde dos animais foi realizada por meio de exame físico (coloração e umidade das membranas mucosas, elasticidade da pele, posição e aspecto do bulbo ocular) e exames laboratoriais (avaliação do hematócrito, proteína total e concentração sérica de aspartato aminotransferase (AST). A carapaça foi avaliada em termos de dureza, conformação, trauma ou sinais de infecção. Foram avaliados também o comportamento alimentar e histórico médico recente. Os animais foram selecionados também de acordo com o peso, devido ao tamanho limitado do compartimento do termoalgímetro e prezando pela integridade do aparelho e segurança dos animais ao colocá-los sobre de uma placa de vidro.

Os animais foram mantidos em seu recinto original com temperaturas em torno de 27°C e umidade relativa entre 50% e 90%. Durante o dia os animais possuíam acesso a uma área verde, com substrato de terra, grama e folhas secas;

lago; banho de sol e abrigo de cimento com telhado de fibrocimento ondulado. No período da noite, os animais permaneciam confinados dentro do abrigo.

O recinto utilizado para o experimento passou por duas reformas com o objetivo de melhorar o campo de trabalho, evitar chuvas e alagamento e também manter uma temperatura confortável para os animais durante a noite. Foi realizada cobertura do teto com telhas de vinil transparente e uma lâmpada infravermelha[1] (100 w) de aquecimento permaneceu ligada durante a noite (Figura 1).

A alimentação dos jabutis do CeMaCAS é composta por folhas verdes (couve e acelga), frutas (mamão, maçã, banana, manga), legumes (cenoura e abóbora), ração para répteis[2] e ração para cachorro[3] (Figura 2). A dieta foi elaborada por um médico veterinário nutrólogo de acordo com as necessidades da espécie. A alimentação sólida foi oferecida uma vez por dia e a água foi fornecida *ad libitum*. Após o experimento os animais receberam suplemento vitamínico com vitamina D3[4] (fórmula a base de cálcio, vitaminas, minerais e aminoácidos desenvolvidos especialmente para répteis).

Figura 1 - Recinto dos jabutis-piranga com lâmpada infravermelha de aquecimento

Fonte: (GRIS, V.N., 2017)

Figura 2 - Dieta dos jabutis-piranga composta por frutas, verduras, legumes e ração

Fonte: (GRIS, V.N., 2017)

[1] Nocturnal Infrared Heat Lamp, Zoo Med Laboratories Inc., California, EUA.
[2] Alcon Club Repto Mix, Alcon pet ®, Santa Catarina, Brasil.
[3] mag dog Premium, Nutrimag®, São Paulo, Brasil.
[4] ReptiVite™ with D3, Zoo Med Laboratories Inc., California, EUA.

5.2 PROJETO PILOTO

Um projeto piloto foi realizado 4 meses antes do experimento com objetivo de analisar e adequar as técnicas antes de ser realizado de forma definitiva. Os objetivos específicos incluem avaliar a presença de resposta (LRRM) frente ao estimulo térmico e avaliar se o mesmo seria adequado ou poderia causar lesão na superfície plantar dos animais. Devido à natureza estoica dos quelônios, existia a possibilidade de haver imobilidade mesmo com alta intensidade do estímulo.

Durante esse período foi realizada a reforma do recinto e aclimatação dos animais nos 3 meses antecedentes ao experimento. O exame físico e a colheita de sangue de todos os animais para exames pré-experimento foram realizados nesse período.

Três animais participaram do projeto piloto. O primeiro recebeu tramadol pela via intramuscular na dose de 5 mg/kg e o segundo na dose de 10 mg/kg. O animal que recebeu tramadol 5 mg/kg por via intramuscular foi avaliado quanto à resposta qualitativa e o animal que recebeu 10 mg/kg foi avaliado quanto á resposta quantitativa no teste de termoalgimetria. Um terceiro animal seria utilizado no estudo, mas foi excluído devido a impossibilidade de colocá-lo na placa de vidro com segurança devido ao seu peso elevado (3,3 kg).

Os três jabutis serviram como modelo experimental para cateterização da veia jugular com o objetivo de facilitar a colheita de sangue.

5.3 TERMOALGIMETRIA

O efeito antinociceptivo do tramadol foi avaliado mediante o emprego do teste de termoalgimetria. O estudo foi feito em delineamento *cross-over*, ou seja, cada animal foi seu próprio controle e recebeu todos os tratamentos em momentos diferentes. Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos de maneira aleatória (papeis identificados retirados um a um de um recipiente):

- SAL: administração intramuscular de cloreto de sódio 0,9%[5]
- TIV5: administração intravenosa de tramadol[6] na dose de 5 mg/kg
- TIM5: administração intramuscular de tramadol na dose de 5 mg/kg
- TIM10: administração intramuscular de tramadol na dose de 10 mg/kg

A aplicação por via intramuscular foi realizada no membro torácico (Figura 3). A administração por via intravenosa foi realizada na veia jugular.

O estudo foi encoberto e a avaliação foi realizada sempre pelo mesmo pesquisador.

Figura 3 - Administração intramuscular em jabuti-piranga

Fonte: (GRIS, V.N., 2017)

O estudo de termoalgimetria avaliou o tempo de tolerância dos animais a um estímulo nociceptivo térmico aplicado na face plantar do membro pélvico com um instrumento de teste plantar[7] (Figura 4).

Os animais foram acomodados em cima de uma placa de vidro, em um compartimento individual delimitado por paredes opacas para evitar contato visual com o ambiente externo (Figura 5). Logo abaixo da placa de vidro e em contato com a mesma, encontrava-se um dispositivo posicionado sob a face plantar do membro pélvico e que ao ser acionado, emitiu radiação infravermelha na potência de 70mW/cm^3 traduzida em um aumento de temperatura de aproximadamente 47ºC. No momento em que o dispositivo foi ligado, um *timer* sensível ao movimento foi

[5] Solução de cloreto de sódio 0,9%, Isofarma Industrial Farmacêutica Ltda., Ceará, Brasil.
[6] Cloridrato de tramadol®, Cristália, São Paulo, Brasil.
[7] Plantar Test (Hargreaves Apparatus), modelo 37370, Ugo Basile, Lombardia, Italia.

acionado. A fonte de calor permaneceu ligada até o momento que o animal retirou o membro do local. Nesse instante o LRRM foi marcado no cronômetro e disponibilizado no display (Figura 6).

Para prevenir danos teciduais devido ao calor foi utilizado um tempo máximo de exposição de 30 segundos baseado nos estudos de Baker, Sladky e Johnson (2011) e Sladky et al. (2007; 2008). O estímulo foi realizado três vezes (M1, M2 e M3) de forma alternada (alternando membros esquerdo e direto), com um intervalo de 3 minutos entre cada exposição. A LRRM foi mensurada antes do tratamento (basal) e 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48, 72 e 96 horas após a administração do tratamento. Para cada momento, foi calculada a média do tempo de latência de retirada. Quando a diferença entre a primeira e segunda medida foi menor ou igual a 2 segundos, as duas primeiras medidas foram utilizadas para o cálculo. Quando a diferença foi maior do que 2 segundos, utilizaram-se as três medidas para o cálculo.

Em cada um desses momentos também foi realizada colheita de amostras de sangue das veias jugular ou subcarapacial (nos casos em que o local de punção jugular estivesse comprometido) (Figura 7). Os animais foram contidos manualmente e até 0,5 mL de sangue foi retirado. O sangue foi armazenado em microtubos com heparina sódica[8] e centrifugado a 3000 g por 15 minutos. O plasma foi decantado e armazenado em freezer a -80ºC até o momento de processamento.

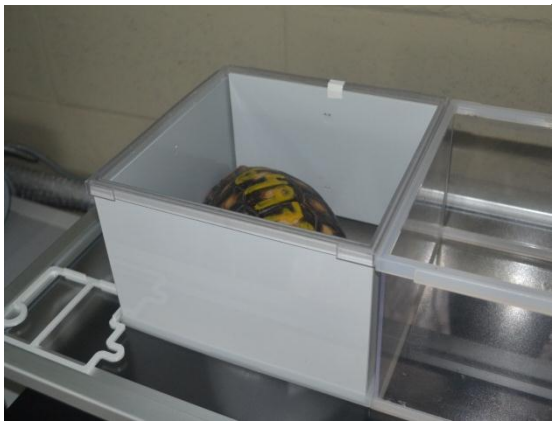
Ao final de cada semana de experimento foram administrados 16 mL de Ringer lactato[9] por via subcutânea na região da base do pescoço cada jabuti.

[8] Micro tubo para coleta de sangue com heparina sódica 50uL, Labor Import, São Paulo, Brasil.
[9] Ringer com Lactato, JP Indústria Farmacêutica, São Paulo, Brasil.

Figura 4 - Instrumento de teste plantar utilizado para termoalgimetria em jabutis-piranga

Fonte: (GRIS, V.N., 2017)

Figura 5 - Compartimento individual do instrumento de teste plantar utilizado para termoalgimetria em jabutis-piranga



Fonte: (GRIS, V.N., 2017)

Figura 6 - Display do instrumento de termoalgimetria

Fonte: (GRIS, V.N., 2017)

Figura 7 - Colheita de sangue da veia jugular de jabuti-piranga

Fonte: (GRIS, V.N., 2017)

Foi respeitado um período de intervalo mínimo de 21 dias entre cada fase do experimento para depuração plasmática e descanso dos animais. Esse período de *wash-out* foi determinado de acordo com estudos prévios (BAKER; SLADKY; JOHNSON, 2011; NORTON et al., 2015).

5.4 AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA

Para avaliação do perfil farmacocinético das concentrações plasmáticas de tramadol mediante análise não compartimental foi utilizado o programa Excel® 2010 (Microsoft®). A identificação e quantificação do tramadol nas amostras de plasma foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas triplo quadrupolo (CG-MS/MS)[10].

5.4.1 Método analítico

A etapa de extração das amostras foi realizada no Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do Departamento de Patologia Veterinária (LADTOX - VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. A análise das amostras foi realizada no Laboratório de Resíduos de Pesticidas do Instituto Biológico de São Paulo (LRP - IB).

5.4.1.1 Condições cromatográficas

O tramadol foi analisado empregando-se um sistema de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas triplo quadrupolo após a otimização das

[10] Agilent 7890A series (G3440A); Agilent 700B Triple Quadrupole CG/MS, Agilent Technologies Inc., CA, EUA.

condições cromatográficas (Tabela 1). As amostras foram injetadas em coluna capilar HP - 5MS UI com fase estacionária composta por (5%-fenil)-dimetilpolisoloxano.

Tabela 1 - Condições cromatográficas para análise de cloridrato de tramadol em plasma de jabuti-piranga (*Chelonoidis carbonarius*)

Condições de CG	
Coluna	Agilent J&W HP-5ms Ultra Inert 15 m x 0,25 mm, 0,25 µm (p/n 19091S-431 UI) 2 unidades
Entrada	Splitness
Linha de entrada	Splitness, single taper, Ultra Inert liner com lã de vidro (p/n 5190-3167)
Carreador	Hélio
Fluxo de entrada (coluna 1)	1 mL/min (modo de fluxo constante) durante a corrida 2 psi durante o backflush
Fluxo de PUU (coluna 2)	Coluna 1 fluxo + 0,2 mL/min
Temperatura de entrada	280ºC
Volume de injeção	1 Ml
Fluxo de purga	30 mL/min aos 0,75 minutos
Gas saver	20 mL/min aos 2 minutos
Temperatura do forno	60ºC (1 minuto) 40ºC/min para 170ºC (0 minutos), 10ºC/min para 310ºC (0 minutos), 16ºC/min para 280ºC (3 minutos)
Tempo total de corrida	20,75 minutos
Tecnologia de fluxo capilar	Agilent Purged Ultimate Union (p/n G3186) Usado para coluna de backflushing
Tempo de retenção de bloqueio	Chlopyrifos-methyl firmado em 9,143 minutos
CG	Agilent 7890A series (G3440A)
Injetor automático	Agilent 7693A injetor e bandeja de amostras
Condições de MS	
Espectrômetro	Agilent 700B Triple Quadrupole CG/MS System
Modo	Impacto de elétrons
Temperatura da linha de transferência	280ºC
Delay do solvente	2,3 minutos
Temperatura da fonte	300ºC
Temperatura do quadrupolo	Q1 e Q2 = 180ºC

Fonte: (modificado de CISCATO; BARBOSA; GEBARA, 2016)
Legenda: CG: cromatografia gasosa; MS: espectrometria de massas, UI: ultra inerte; PUU: Purged Ultimate Union

A seletividade da detecção foi assegurada pela determinação do tempo de retenção e pela avaliação da massa na biblioteca de espectros de massa no NIST[11].

Foram monitorados os seis íons mais abundantes durante a espectrometria de massas.

As análises foram realizadas em concordância com o Manual de Garantia da Qualidade Analítica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011).

5.4.2 Preparo das amostras

O método de extração foi baseado e modificado de Gonçalves-Jr et al. (2017). A matriz biológica selecionada para o estudo foi o plasma de jabutis-piranga. Após a colheita e centrifugação para separação do plasma, as amostras foram transportadas em caixa de isopor com gelo até o LADTOX e armazenadas em *freezer* -80°C até o momento da análise.

No dia da extração, o plasma armazenado a -80°C foi descongelado em bancada. Em um microtubo de 1,5 mL, foram adicionados 250 µL de plasma, 10 µL de hidróxido de sódio[12] (NaOH 0,2 M) e 1 mL de éter:clorofórmio[13] (1:1, V/V). Os tubos foram agitados vigorosamente em agitador tipo vórtex por 10 segundos e em seguida centrifugados por 15 minutos a 3000 rpm e temperatura de 10°C.[14]

A fase orgânica foi removida e transferida para outro microtubo, sendo o mesmo deixado aberto em capela de exaustão até completa evaporação. Finalmente, 50 µL de etanol[15] foram adicionados ao tubo, novamente agitados em vórtex por 60 segundos. As amostras foram transferidas para inserts[16] alocados dentro de vials de vidro[17] e 1 µL foi injetado no CG-MS/MS.

---

[11] National Institute of Standards and Technology, U.S. Department of Commerce, Maryland, EUA.
[12] Hidróxido de sódio P.A.-A.C.S. 100%, Labsynth, São Paulo, Brasil.
[13] Clorofórmio P.A.-A.C.S. 100% e Éter etílico P.A.-A.C.S. 100%, Labsynth, São Paulo, Brasil.
[14] Centrífuga 5804R, Eppendorf AG, Hamburgo, Germany.
[15] Ethanol, puriss. p.a., ACS reagent, absolut ≥99.8%, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA.
[16] Vial insert, 150µL, Agilent Technologies Inc., California, EUA.
[17] Vial clear 2mL, Allcrom, São Paulo, Brasil.

O padrão analítico de tramadol certificado[18] e com pureza declarada de 99,8% m/m foi utilizado no preparo de soluções-padrão estoque e de uso diário, com concentrações conhecidas, para estabelecimento das condições de análise.

A curva de calibração do tramadol foi estabelecida em triplicata e construída em plasma de jabuti nas concentrações 0,0025; 0,005; 0,0075; 0,01; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 ng/µL. As concentrações foram analisadas e utilizadas para o estudo de linearidade, repetibilidade, limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD). A linearidade foi estabelecida estatisticamente por análise de regressão com limite de confiança de 95% (MEIER; ZÜND, 1993). A repetibilidade foi realizada a partir do cálculo do Coeficiente de Variabilidade intra-amostra e inter-amostra em dias diferentes.

5.4.3 Recuperação

A recuperação foi avaliada em três níveis de concentração: limite inferior (0,01 ng/µL), limite médio (0,1 ng/µL) e limite superior (0,5 ng/µL). A solução de tramadol foi adicionada a 250 µL de amostras de plasma de jabuti e as amostras foram submetidas à extração conforme item 4.3.2 para posterior análise no CG-MS/MS.

5.4.4 Avaliação não compartimental do perfil plasmático do tramadol

Os valores para constante de eliminação (λ), meia-vida plasmática ($t_{1/2}$), área sob a curva ($ASC_{0-\infty}$) foram determinados por abordagem não compartimental, utilizando-se as equações listadas abaixo (TOZER; ROWLAND, 2009; FLÓRIO; SOUSA, 2017). A concentração máxima (C_{max}) do tramadol no plasma e o tempo para atingir a C_{max} (T_{max}) foram observados diretamente dos dados analisados. Os valores dos parâmetros para a população são descritos como a média dos parâmetros estimados individualmente. A variabilidade dos parâmetros

[18] Tramadol Hydrocloride, padrão analítico, United States Pharmacopeia (USP), Maryland, EUA.

farmacocinéticos foi expressa como desvio-padrão. No caso da meia-vida, foram utilizados a média harmônica e o pseudo desvio-padrão.

A constante da velocidade de eliminação (λ) foi calculada pela inclinação da fase terminal da curva log-linear dos perfis de concentração por tempo de cada animal, empregando-se no mínimo os cinco últimos pontos dos perfis. A partir do valor de λ, o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) do tramadol foi determinado pela Equação 1.

$$t_{1/2} = \frac{0{,}693}{\lambda} \tag{1}$$

A determinação da área sob a curva dos tempos 0 a t ($ASC_{0\text{-}t}$) foi calculada pela regra trapezoidal, em que t é o último tempo de colheita (Equações 2a e 2b).

$$ASC_{0\text{-}t} = \frac{[(C_{(t-1)} + C_{(t)})]}{2} \times [(t)-(t-1)] \tag{2a}$$

$$ASC_{0\text{-}t} = \frac{(C_0+C_1)}{2} \times (t_1-t_0) + \frac{(C_1+C_2)}{2} \times (t_2-t_1) + \ldots + \frac{(C_{t-1}+C_t)}{2} \times (t_t-t_{t-1}) \tag{2b}$$

Para o cálculo de $ASC_{0\text{-}\infty}$, foi utilizado o produto de $ASC_{0\text{-}t}$ e $C_{t/\lambda}$ conforme a Equação 3.

$$ASC_{0-\infty} = ASC_{0-t} + \frac{C_t}{\lambda} \tag{3}$$

A área sob a curva do primeiro momento ($ASMC_{0\text{-}\infty}$) foi determinada pela regra trapezoidal (Equações 4a, 4b e 4c).

$$ASMC_{0\text{-}t} = \left(\frac{(C_0 \times t_0) + (C_1 \times t_1)}{2}\right) \times (t_1-t_0) + \ldots + \left(\frac{(C_{t-1} \times t_{t-1}) + (C_1 \times t)}{2}\right) \tag{4a}$$

$$\Delta ASMC_{t\text{-}\infty} = \frac{(C_t \times t)}{\lambda} \times \frac{(C_t)}{\lambda^2} \quad (4b)$$

$$ASMC_{0\text{-}\infty} = ASMC_{0\text{-}t} + \Delta ASMC_{t\text{-}\infty} \quad (4c)$$

O tempo de residência médio (TMR) foi calculado a partir dos valores de $ASC_{0\text{-}\infty}$ e $ASMC_{0\text{-}\infty}$ (Equação 5).

$$\mathrm{TMR} = \frac{\mathrm{ASMC}_{0-\infty}}{\mathrm{ASC}_{0-\infty}} \quad (5)$$

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk para averiguação da distribuição normal e decisão sobre o teste estatístico.

Para os dados referentes à Latência do Reflexo de Retirada do Membro foi utilizado o teste ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguido do *post hoc* de Tukey para avaliar os efeitos do tempo e do protocolo utilizado. Para essa análise foram utilizados os valores totais obtidos durante a mensuração dos tempos e os valores obtidos pela diferença entre cada momento em relação ao seu basal. Essa diferença foi realizada para avaliar o efeito dos fármacos durante as avaliações.

Em relação à temperatura corpórea, os dados não apresentaram distribuição normal e, portanto foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para identificar diferenças entre os grupos em relação ao tempo; e o teste de Friedman seguido do *post hoc* de Nemenyi para avaliar os diferentes momentos dentro de cada grupo.

O grau de significância estabelecido para os testes estatísticos foi de 5% ($p<0,05$). Os testes estatísticos foram realizados no software RStudio, Version 0.99.903 – © 2009-2016 RStudio, Inc. e no software Prism Version 7.0 for Windows (GraphPad Software, Inc., CA, USA).

6 RESULTADOS

6.1 ANIMAIS

Após a finalização da primeira reforma e dos testes de chuva e vento, foi realizada uma segunda reforma para reforço da estrutura e então os animais foram alocados no recinto.

Todos os animais apresentaram bom estado geral ao exame físico e histórico médico e alimentar dentro da normalidade. O resultado dos exames encontra-se na tabela 2.

Tabela 2 – Valores individuais dos exames de hematócrito, proteína total e aspartato aminotransferase em jabutis-piranga (*Chelonoidis carbonarius*) (n = 8)

Animal	Hematócrito (%)	Proteína Total (g/dL)	AST (UI/L)
1	27	5,0	244,7
2	26	5,0	137,3
3	26	5,4	100,5
4	29	4,8	223.6
5	26	4,8	237,1
6	25	4,6	130,1
7	27	5,8	364,7
8	19	4,0	239,4
Referência	18 - 40	3 - 7	214±152

Fonte: (DIETHELM, 2005; CAMPBELL, 2006; STACY; ALLEMANN; SAYLER, 2011; MEDEIROS et al., 2012)

6.2 PROJETO PILOTO

Os animais responderam de maneira satisfatória apresentando o reflexo de retirada do membro frente ao teste nocicepção térmica. Constatou-se, por avaliação visual, que o estímulo na potência foi adequado e não houve lesão tecidual, pois a pele não apresentou sinais de queimadura, inflamação ou solução de continuidade e os animais voltaram a ambular normalmente após os testes.

O jabuti que recebeu 10 mg/kg foi submetido ao teste de termoalgimetria e a LRRM foi aferida nos tempos 0 (basal), 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 24 e 48 horas após a administração (Tabela 3).

Tabela 3 – Latência (segundos) para o reflexo de retirada do membro frente a um estímulo termonociceptivo aplicado na face plantar de jabuti-piranga após a administração de tramadol (10 mg/kg)

Momento	**Basal**	**30 min**	**1h**	**2h**	**4h**	**24h**	**48h**
T corporal (°C)	23,7	24,5	24,4	25,6	28,8	30,8	24,1
Média (s)	13,8	14,9	13,0	12,4	14,8	11,7	22,6

Fonte: (GRIS, V. N., 2017)
Legenda: Os tempos de latência são descritos em segundos e representados como a média de 2 ou 3 medidas no mesmo momento.

Durante o piloto foi realizada a punção venosa em cinco pontos: veias jugular, subcarapacial, caudal, femoral e braquial. A punção da veia jugular foi a mais adequada por permitir maior volume de sangue coletado em menos tempo, diminuindo dessa forma, a chance de coagulação dentro da seringa e maior conforto para o animal e para o profissional.

A venopunção e a colheita de sangue foram bem sucedidas durante quatro dias consecutivos no projeto piloto. Um dia antes do projeto efetivo, a veia de cada um dos animais foi cateterizada, porém no dia do experimento o sangue não pode ser colhido de maneira adequada. Dessa forma, optou-se pela retirada dos cateteres e punção individual em cada um dos momentos.

A partir desses procedimentos foi possível aperfeiçoar a metodologia utilizada no estudo definitivo e avaliar a necessidade de adaptação do método de acordo com o comportamento dos animais e resposta ao estímulo.

6.3 TERMOALGIMETRIA

Os resultados individuais do teste de termoalgimetria encontram-se nas Tabelas 4, 5, 6 e 7.

Tabela 4 - Latência para reflexo de retirada do membro frente a um estímulo termonociceptivo aplicado na face plantar de jabutis-piranga (semana 1)

Animal	**T°C / Tempo(s)**	**Momentos de avaliação**											
		Basal	**0,5h**	**1h**	**2h**	**4h**	**6h**	**8h**	**10h**	**24h**	**48h**	**72h**	**96h**
1	T°C	27	27,6	27,2	27,9	28,2	28	28,2	29,5	28	27,5	27,7	27,9
SAL	Média	8,5	4,3	11,0	10,3	9,1	12,5	9,8	9,7	11,4	13,3	13,3	15,0
2	T°C	22,3	24,8	25,2	26,3	27,4	30	28,5	27,1	26,4	24,1	24,2	
TIV5	Média	12,4	21,5	17,7	16,8	14,9	16,1	11,6	15,8	15,0	18,2	10,8	
3	T°C	27,4	28,4	27,6	28	27,9	28,2	27,5	29,1	28,7	27,8	28	28
TIM5	Média	6,0	10,8	11,1	13,1	7,7	7,6	14,5	15,8	17,4	9,7	20,5	18,7
4	T°C	27	26,9	27,1	27,9	27	27,5	28,1	27,5	26,9	27,4	27,9	27,7
TIM5	Média	3,8	10,3	10,0	7,0	13,8	9,4	18,1	7,1	10,3	14,2	10,2	13,4
5	T°C	24,0	23,7	26,6	27,1	28	28	31,2	28,5	25,2	24,2	24,9	
TIM10	Média	15,9	20,9	19,1	16,8	15,7	14,2	5,3	14,2	15,0	20,8	8,3	
6	T°C	27,5	27,9	27,5	28,4	27,1	28	27,2	28,5	27,6	27,4	27,9	28
SAL	Média	5,7	13,8	12,2	15,6	13,3	11,9	11,5	7,8	11,3	10,0	11,3	11,1
7	T°C	27,5	27,3	28,2	28,2	27,1	27,9	27,5	29,1	27,8	28	28	28
TIV5	Média	3,9	11,0	13,5	10,8	14,4	14,3	15,6	9,1	8,3	12,5	14,1	15,5
8	T°C	27,5	27,6	28,2	28,2	28	27,9	28	27,8	28,2	27,5	28,5	28,3
TIM10	Média	13,9	6,9	12,3	5,1	10,2	17,4	12,8	8,5	11,1	7,3	12,7	13,1

Fonte: (GRIS, V.N., 2017)
Legenda: Os tempos são descritos em segundos e dados como a média das mensurações. T°C - temperatura corporal do jabuti no momento do teste; SAL - administração intramuscular de NaCl 0,9% - controle; TIM5 - administração intramuscular de 5 mg/kg de tramadol; TIM10 - administração intramuscular de 10 mg/kg de tramadol; TIV5 - administração intravenosa de 5mg/kg de tramadol

Tabela 5 - Latência para reflexo de retirada do membro frente a um estímulo termonociceptivo aplicado na face plantar de jabutis-piranga (semana 2)

Animal	T°C/ Tempo	Momentos de avaliação											
		Basal	**0,5h**	**1h**	**2h**	**4h**	**6h**	**8h**	**10h**	**24h**	**48h**	**72h**	**96h**
1	T°C	24,1	24	24,1	24,5	28,4	31	31	27	27,2	26,5	26,5	27,1
TIV5	Média	14,0	11,8	11,1	10,2	9,2	7,1	6,1	14,5	16,1	11,5	10,7	5,4
2	T°C	24,5	26,2	25,2	25,4	26,8	29,8	30,5	27,5	26,7	26,5	26,7	26,4
TIM5	Média	14,2	20,2	20,9	25,4	15,1	11,5	10,4	18,4	14,7	18,4	20,7	18,4
3	T°C	24,2	26	27,2	28	25,7	29,9	30,9	27,8	26,7	26,7	26,8	26,3
TIM10	Média	17,3	19,7	16,0	25,0	16,8	11,1	12,0	16,2	14,6	24,6	12,8	9,9
4	T°C	24,2	25,8	26,7	26,6	27,8	30,1	30,1	26,5	27,4	27,6	26,8	27
TIM10	Média	16,9	17,9	13,8	14,0	11,4	7,2	9,8	15,6	16,2	10,6	9,9	8,8
5	T°C	24,8	25,8	27,7	27,7	28,7	30,8	31	26,6	26,1	26,8	26,3	26,8
SAL	Média	18,9	12,9	14,1	12,1	10,3	12,6	8,8	13,6	14,7	14,0	14,8	13,3
6	T°C	25	27	26,8	27,7	28,7	31	31,8	26,3	27,2	27,7	27,5	26,1
TIV5	Média	21,8	22,3	13,7	11,9	9,0	10,6	12,7	24,3	16,2	10,7	11,4	8,6
7	T°C	24,2	25,5	26,5	26,8	28,2	30,1	31,2	26,8	28,5	26,6	26,6	28,2
TIM5	Média	8,0	19,6	20,6	11,2	11,1	10,1	6,7	15,0	13,4	14,7	3,2	13,1
8	T°C	24,8	27,4	28,2	28,1	28,3	29,6	31	26,4	27	28	26,6	28,2
SAL	Média	15,1	20,2	14,7	16,3	7,0	9,3	11,0	17,2	14,9	15,4	21,0	8,9

Fonte: (GRIS, V.N., 2017)
Legenda: Os tempos são descritos em segundos e dados como a média das mensurações. T°C - temperatura corporal do jabuti no momento do teste; SAL - administração intramuscular de NaCl 0,9% - controle; TIM5 - administração intramuscular de 5 mg/kg de tramadol; TIM10 - administração intramuscular de 10 mg/kg de tramadol; TIV5 - administração intravenosa de 5mg/kg de tramadol

Tabela 6 - Latência para reflexo de retirada do membro frente a um estímulo termonociceptivo aplicado na face plantar de jabutis-piranga (semana 3)

Animal	**T°C/ Tempo (s)**	**Momentos de avaliação**											
		Basal	**0,5h**	**1h**	**2h**	**4h**	**6h**	**8h**	**10h**	**24h**	**48h**	**72h**	**96h**
1	T°C	25,5	26,5	27,5	26	27,1	26,3	27,1	26,9	26,9	27,5	26,5	27,1
TIM5	Média	6,3	10,2	12,4	11,4	11,9	11,5	9,4	10,1	17,5	16,6	11,2	13,6
2	T°C	26,5	27,4	26,9	26,7	26,7	27,1	27,1	27,1	27,1	27,3	26,6	27
TIM10	Média	12,5	11,5	21,8	19,8	18,4	18,6	14,1	18,4	19,8	18,2	21,0	22,4
3	T°C	27,4	27,8	27,4	27,6	27,6	27,1	27,5	27,3	27,1	27,8	28	27,2
SAL	Média	10,3	15,3	22,0	12,0	15,0	13,5	18,2	16,3	14,3	17,3	13,9	7,5
4	T°C	26,5	26,5	26,5	26,5	26,8	26,8	27	26,9	26,7	26,6	27	26,8
SAL	Média	16,9	16,6	11,5	11,3	9,4	14,6	11,3	9,3	15,9	14,9	12,8	12,5
5	T°C	26,8	26,4	26,4	26,4	26,6	26,5	27	26,9	26,9	27	26,2	26,8
TIV5	Média	15,5	19,8	19,3	15,2	16,4	18,9	13,5	16,0	19,1	17,9	21,5	13,8
6	T°C	27,4	26,9	26,9	27,2	26,6	27,1	26,9	26,9	26,6	27	27,5	26,9
TIM5	Média	13,1	17,1	20,3	12,3	23,3	13,2	9,9	9,6	16,3	13,0	6,0	13,3
7	T°C	27,4	28,4	27,4	26,9	27,8	27,1	26,9	26,9	27,9	28	26,6	26
TIM10	Média	13,9	21,1	18,2	16,1	16,0	12,9	12,3	11,6	9,2	16,4	12,4	14,5
8	T°C	27,6	27,3	27,4	27,2	27,3	26,9	27,3	26,9	27,9	27,1	26,7	27,5
TIV5	Média	3,3	15,3	16,0	11,2	9,9	10,0	12,0	12,1	8,4	9,7	13,6	10,7

Fonte: (GRIS, V.N., 2017)
Legenda: Os tempos são descritos em segundos e dados como a média das mensurações. T°C - temperatura corporal do jabuti no momento do teste; SAL - administração intramuscular de NaCl 0,9% - controle; TIM5 - administração intramuscular de 5 mg/kg de tramadol; TIM10 - administração intramuscular de 10 mg/kg de tramadol; TIV5 - administração intravenosa de 5mg/kg de tramadol

Tabela 7 - Latência para reflexo de retirada do membro frente a um estímulo termonociceptivo aplicado na face plantar de jabutis-piranga (semana 4)

Animal	T°C/ Tempo(s)	Momentos de avaliação											
		Basal	0,5h	1h	2h	4h	6h	8h	10h	24h	48h	72h	96h
1	T°C	27,5	27,8	27,5	27,7	27,6	27,9	27,6	27,9	27,4	27,4	27,8	28,0
TIM10	Média	9,0	13,8	11,6	9,1	13,1	12,3	11,4	13,1	14,7	9,2	12,2	16,0
2	T°C	27,4	28,3	27,0	27,4	27,2	27,2	27,8	27,8				
SAL	Média	12,8	18,1	16,6	15,3	12,1	16,9	10,0	14,6				
3	T°C	26,9	27,2	27,8	27,2	27,5	27,7	27,7	27,5	27,3	27,5	27,9	28,0
TIV5	Média	20,4	15,2	16,0	16,8	16,0	11,8	15,6	19,2	16,9	15,9	14,6	18,6
4	T°C	27,7	28	27,2	27,8	27,5	27,5	28	27,5	27,5	27,8	27,9	27,3
TIV5	Média	5,7	13,8	15,2	13,2	17,3	16,5	10,4	14,0	20,9	13,0	12,9	10,8
5	T°C	27,9	27,9	27,9	27,9	27,9	27,9	27,7	27,5	27,7	28,0	27,1	27,0
TIM5	Média	7,4	15,4	26,6	16,1	15,4	21,3	16,2	18,4	17,4	10,9	13,9	14,4
6	T°C	27,1	27,9	27,3	27,4	27,5	27,6	27,7	27,8	28,1	27,3	28,1	28,0
TIM10	Média	7,0	6,8	15,7	15,0	13,8	12,7	9,7	9,3	12,9	10,2	12,7	10,1
7	T°C	27,5	27,7	27,4	27,8	27,5	27,5	27,2	27,2	28,0	27,9	27,5	27,6
SAL	Média	13,0	10,9	15,9	18,7	18,9	16,9	10,8	13,1	13,6	12,7	11,5	8,4
8	T°C	27,5	27,9	27,1	27,7	27,9	27,9	27,6	27,7	27,3	27,8	28,3	27,9
TIM5	Média	10,7	14,0	12,5	13,6	11,7	15,5	9,1	10,6	14,8	12,5	14,8	8,5

Fonte: (GRIS, V.N., 2017)
Legenda: Os tempos são descritos em segundos e dados como a média das mensurações. T°C - temperatura corporal do jabuti no momento do teste; SAL - administração intramuscular de NaCl 0,9% - controle; TIM5 - administração intramuscular de 5 mg/kg de tramadol; TIM10 - administração intramuscular de 10 mg/kg de tramadol; TIV5 - administração intravenosa de 5mg/kg de tramadol

6.3.1 Valores totais

Não houve diferença significativa entre os grupos ao longo do tempo (p= 0,7755 para o efeito do grupo).

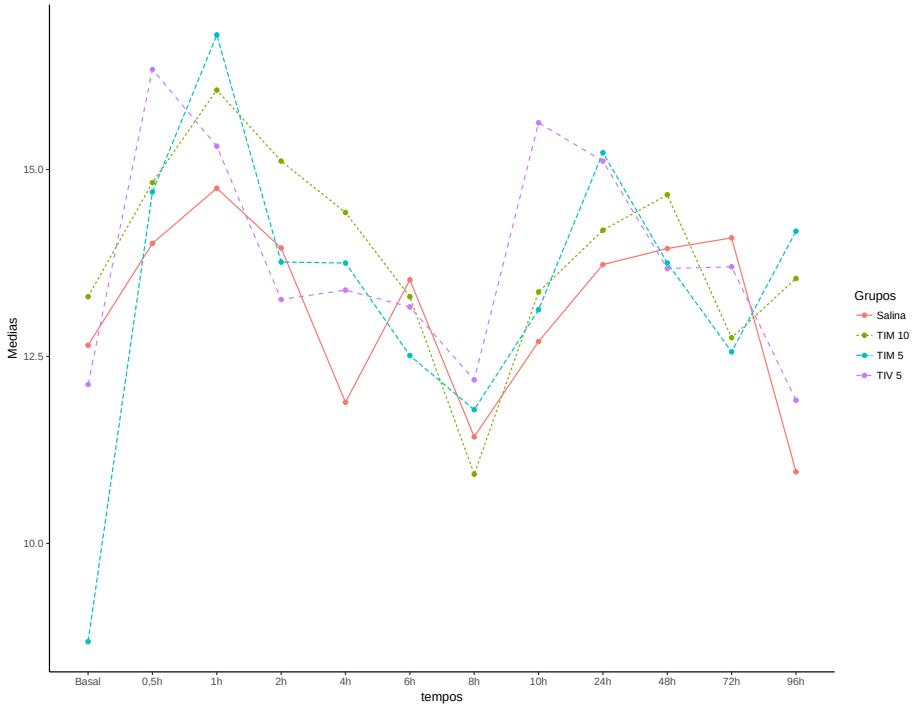
Não foi observada diferença significativa entre os momentos para os grupos SAL, TIM 10 e TIV 5 (p > 0,05), porém houve diferença estatística para o grupo TIM 5 entre os momentos basal e 1h (p= 0,0009) e basal e 24h (p= 0,0219) (Tabela 8 e Gráfico 1).

Tabela 8 - Valores médios e respectivos desvios-padrão da latência (segundos) do reflexo de retirada do membro de jabutis-piranga que receberam solução salina 0,9% IM (SAL), 5 mg/kg de tramadol IM (TIM5), 10 mg/kg de tramadol IM (TIM10) e 5 mg/kg de tramadol IV (TIV5)

	SAL	TIM 5	TIM 10	TIV 5
Basal	12,65 ± 4,38	8,69 ± 3,64	13,30 ± 3,69	12,12 ± 7,21
0,5h	14,01 ± 4,91	14,70 ± 4,07	14,82 ± 5,96	16,33 ± 4,34
1h	14,75 ± 3,56	16,80 ± 6,05*	16,06 ± 3,50	15,31 ± 2,57
2h	13,95 ± 2,93	13,76 ± 5,36	15,11 ± 6,11	13,26 ± 2,68
4h	11,88 ± 3,80	13,75 ± 4,58	14,42 ± 2,79	13,38 ± 3,45
6h	13,52 ± 2,57	12,51 ± 4,28	13,30 ± 3,57	13,16 ± 3,95
8h	11,42 ± 2,88	11,79 ± 3,98	10,92 ± 2,71	12,19 ± 3,07
10h	12,70 ± 3,43	13,12 ± 4,32	13,36 ± 3,43	15,62 ± 4,58
24h	13,72 ± 1,76	15,22 ± 2,50*	14,19 ± 3,22	15,11 ± 4,57
48h	13,94 ± 2,30	13,75 ± 2,87	14,66 ± 6,24	13,67 ± 3,26
72h	14,08 ± 3,29	12,56 ± 6,26	12,75 ± 3,71	13,70 ± 3,49
96h	10,96 ± 2,79	14,17 ± 3,24	13,54 ± 4,71	11,91 ± 4,42

Fonte: (FERRARO, M.A.; GRIS, V.N. 2018)
Legendas: IM - intramuscular; IV - intravenoso. Grau de significância: ($p<0,05$).
*Diferença significativa em relação ao momento basal.

Gráfico 1 - Representação gráfica dos valores médios da latência (segundos) do reflexo de retirada do membro de jabutis-piranga que receberam solução salina 0,9% IM (SAL), 5 mg/kg de tramadol IM (TIM5), 10 mg/kg de tramadol IM (TIM10) e 5 mg/kg de tramadol IV (TIV5)



Fonte: (FERRARO, M.A.; GRIS, V.N. 2018)
Legendas: IM - intramuscular; IV - intravenoso.

6.3.2 Valores normalizados

Houve diferença significativa entre os grupos SAL e TIM 5 para os momentos 1h (p= 0,0063), 4h (p= 0,00388), 24h (p= 0,0194) e 96h (p= 0,0014). Entre os grupos TIM 5 e TIM 10 nos momentos 1h (p= 0,0196), 8h (p= 0,016), 24h (p= 0,0119) e 96h (p= 0,0313). Entre os grupos TIM 5 e TIV 5 nos momentos 1h (p= 0,0377) e 96h (p= 0,0231) (Tabela 9 e Gráfico 2).

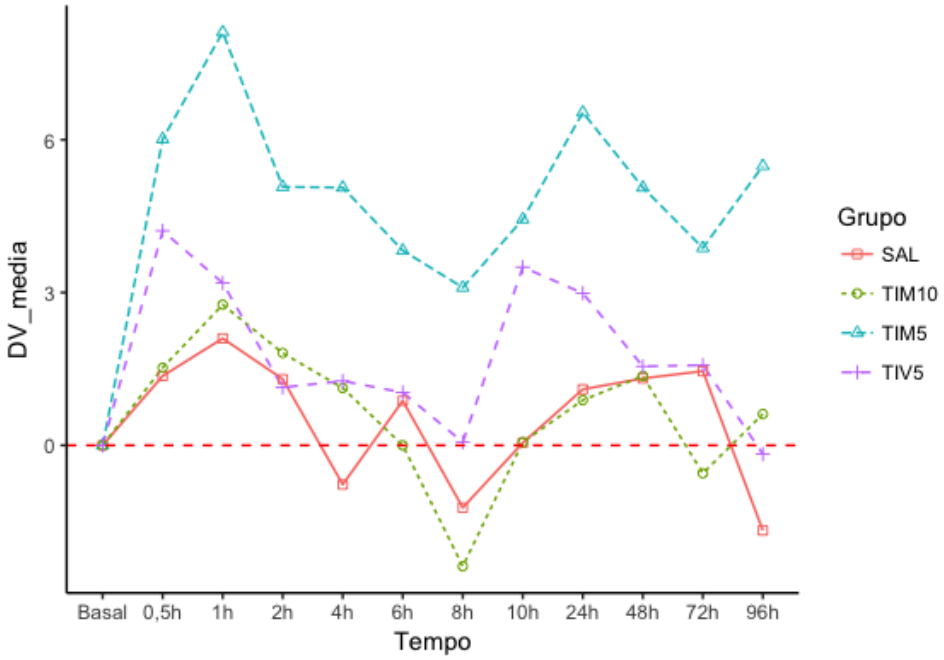
Ao se avaliar os diferentes momentos dentro de cada grupo não foi observada diferença significativa entre os momentos para os grupos SAL, TIM 10 e TIV 5 (p > 0,05), porém houve diferença estatística para o grupo TIM 5 entre os momentos Basal e 1h (p= 0,0008) e Basal e 24h (p= 0,0212).

Tabela 9 - Valores médios e respectivos desvios-padrão da diferença entre os momentos e o basal da latência (segundos) do reflexo de retirada do membro de jabutis-piranga que receberam solução salina 0,9% IM (SAL), 5 mg/kg de tramadol IM (TIM5), 10 mg/kg de tramadol IM (TIM10) e 5 mg/kg de tramadol IV (TIV5)

	SAL	**TIM 5**	**TIM 10**	**TIV 5**
Basal	-	-	-	-
0,5h	1,36 ± 5,18	6,01 ± 2,74	1,52 ± 4,44	4,21 ± 5,99
1h	2,1 ± 5,67[a]	8,11 ± 5,38*[abc]	2,76 ± 4,63[b]	3,18 ± 5,74[c]
2h	1,3 ± 5,45	5,07 ± 3,80	1,81 ± 5,87	1,13 ± 6,55
4h	-0,76 ± 6,61[a]	5,03 ± 3,94[a]	1,12 ± 4,41	1,26 ± 8,35
6h	0,87 ± 4,91	3,82 ± 4,95	0 ± 5,72	1,03 ± 8,73
8h	-1,22 ± 5,96	3,1 ± 6,71[b]	-2,37 ± 4,85[b]	0,06 ± 7,63
10h	0,05 ± 4,39	4,43 ± 4,83	0,06 ± 3,72	3,5 ± 3,68
24h	1,1 ± 3,32[a]	6,53 ± 4,00*[ab]	0,88 ± 4,67[b]	2,98 ± 6,24
48h	1,31 ± 4,21	5,06 ± 3,79	1,36 ± 5,27	1,55 ± 6,94
72h	1,46 ± 4,53	3,87 ± 6,86	-0,55 ± 5,89	1,57 ± 7,86
96h	-1,67 ± 5,32[a]	5,48 ± 4,83[ab]	0,61 ± 6,77[b]	-0,17 ± 8,84[c]

Fonte: (FERRARO, M.A.; GRIS, V.N. 2018)
Legendas: IM - intramuscular; IV - intravenoso. Grau de significância: (p<0,05). * Diferença significativa em relação ao momento Basal. Letras iguais indicam diferença significativa

Gráfico 2 **-** Representação gráfica dos valores médios da latência (segundos) do reflexo de retirada do membro de jabutis-piranga que receberam solução salina 0,9% IM (SAL), 5 mg/kg de tramadol IM (TIM5), 10 mg/kg de tramadol IM (TIM10) e 5 mg/kg de tramadol IV (TIV5)



Fonte: (FERRARO, M.A.; GRIS, V.N. 2018)
Legendas: IM - intramuscular; IV - intravenoso.

6.3.3 Temperatura corporal

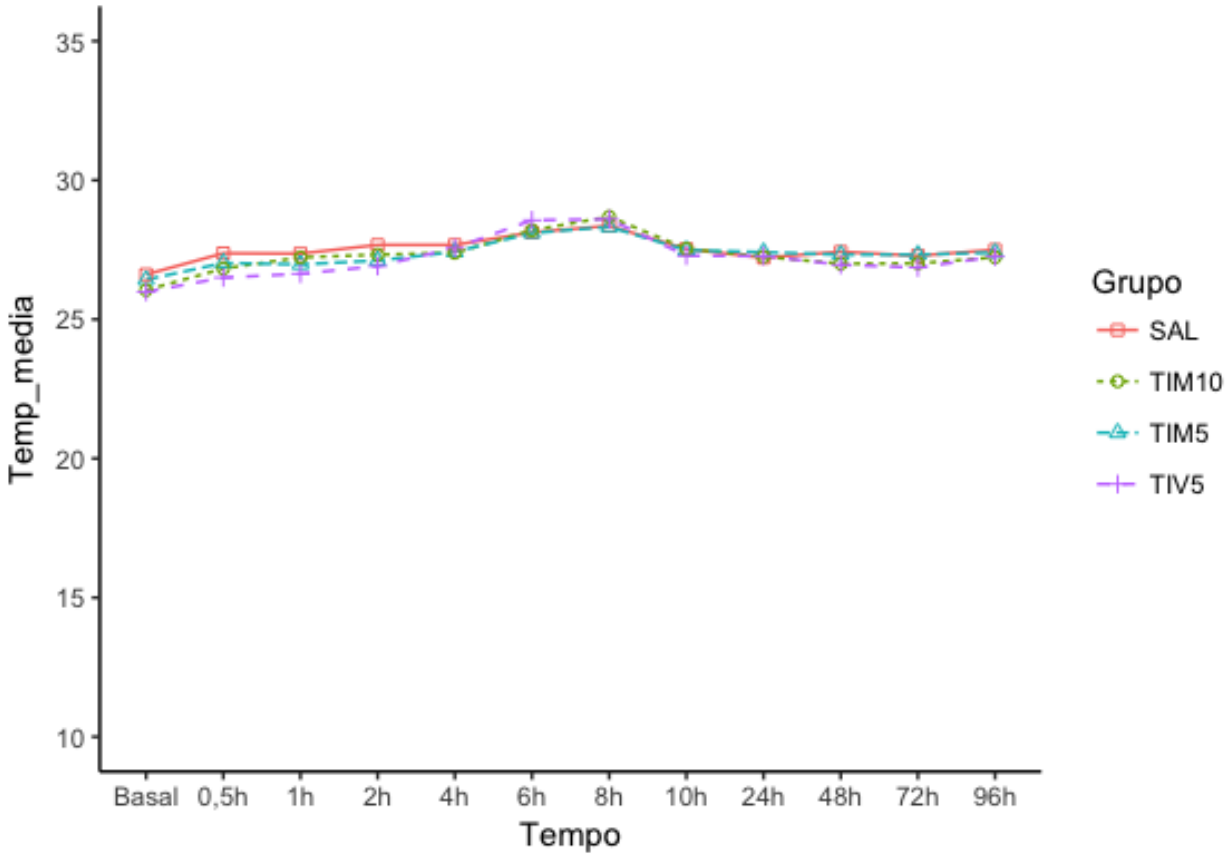
Não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum dos momentos de avaliação. As médias e respectivos desvios-padrão assim como os referidos valores de *P* são mostrados na Tabela 10 e Gráfico 3.

Tabela 10 - Valores médios e respectivos desvios-padrão da temperatura corporal (Cº) de jabutis piranga até 96 horas de experimento e os respectivos valores de *p* entre grupos no mesmo momento e no mesmo grupo ao longo do tempo

Momento	SAL	TIM 5	TIM 10	TIV 5	*P*
Basal	26,6 ± 1,2	26,4 ± 1,5	26,0 ± 1,6	26,0 ± 2,0	0,9063
0,5h	27,8 ± 0,8	27,0 ± 1,0	26,8 ± 1,6	26,5 ± 1,4	0,5859
1h	27,4 ± 0,5	27,0 ± 0,8	27,2 ± 0,5	26,6 ± 1,4	0,6775
2h	27,7 ± 0,6	27,1 ± 1,0	27,3 ± 0,6	27,0 ± 1,2	0,4594
4h	27,7 ± 0,7	27,4 ± 0,6	27,4 ± 0,8	27,6 ± 0,7	0,9087
6h	28,1 ± 1,4	28,1 ± 1,3	28,2 ± 1,2	28,6 ± 1,8	0,9863
8h	28,4 ± 1, 7	28,3 ± 1,6	28,7 ± 1,7	28,6 ± 1,8	0,9557
10h	27,5 ± 1,0	27,5 ± 0,7	27,5 ± 0,6	27,3 ± 0,8	0,735
24h	27,2 ± 0,7	27,4 ± 0,8	27,2 ± 1,0	27,3 ± 0,5	0,9635
48h	27,4 ± 0,5	27,3 ± 0,6	27,0 ± 1,2	27,0 ± 1,2	0,887
72h	27,3 ± 0,7	27,3 ± 0,7	27,0 ± 1,1	26,9 ± 1,3	0,9036
96h	27,5 ± 0,6	27,4 ± 0,6	27,2 ± 0,9	27,2 ± 0,7	0,9436
P	0,2761	0,3326	0,08453	0,2407	

Fonte: (FERRARO, M.A.; GRIS, V.N. 2018)
Legendas: IM - intramuscular; IV - intravenoso. Grau de significância: (p<0,05).

Gráfico 3 - Representação gráfica dos valores médios da temperatura corporal (Cº) de jabutis-piranga que receberam solução salina 0,9% IM (SAL), 5 mg/kg de tramadol IM (TIM5), 10 mg/kg de tramadol IM (TIM10) e 5 mg/kg de tramadol IV (TIV5)



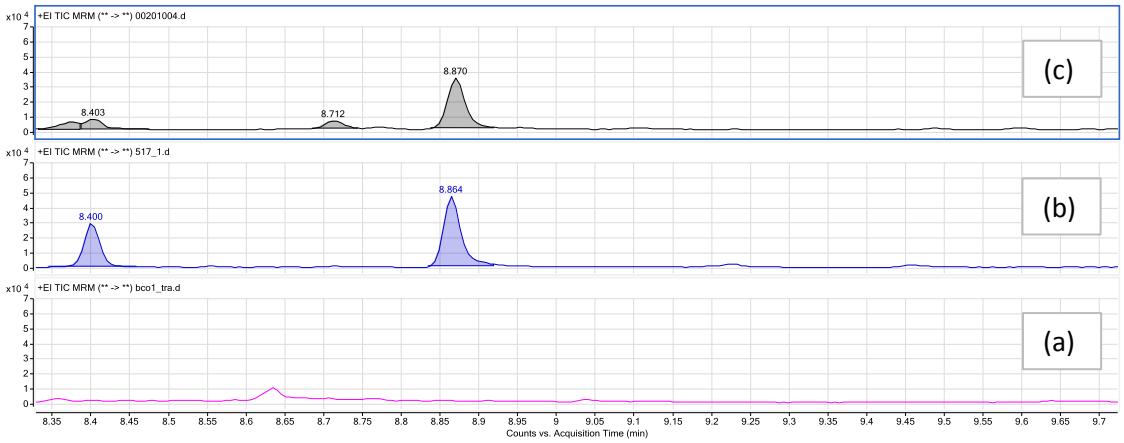
Fonte (FERRARO, M.A.; GRIS, V.N. 2018)
Legendas: IM - intramuscular; IV - intravenoso

6.4 AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA

6.4.1 Condições cromatográficas

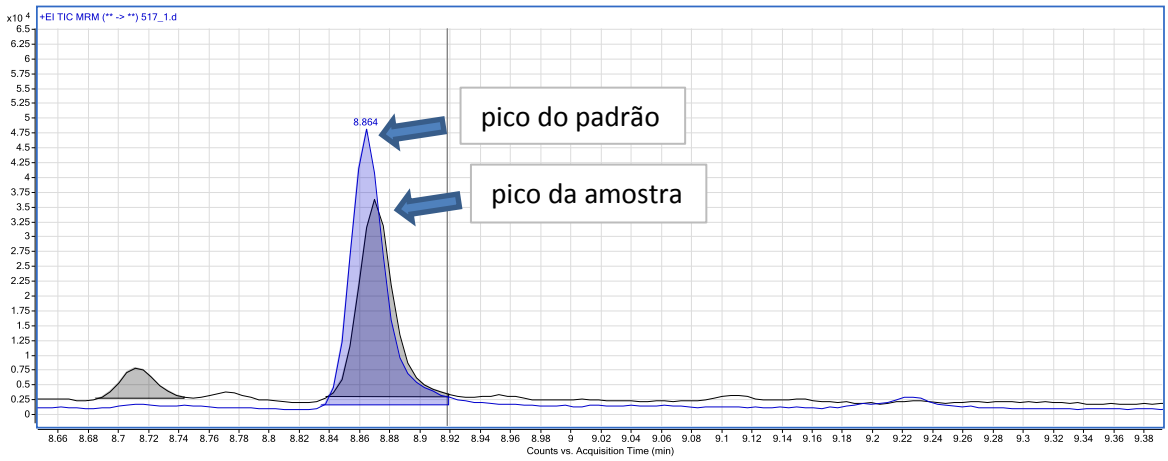
O tempo de retenção para o tramadol foi de 8,86 minutos (Figuras 8 e 9). Para a quantificação do tramadol monitorou-se a transição m/z 135 -> 77,0; 114.1-> 58.2; 128.1->108.1; 150.1->77.0; 158.9->144.1 e 188.9->121.2.

Figura 8 - Cromatogramas representativos de (a) plasma de jabuti sem tramadol, (b) plasma de jabuti fortificado com tramadol (250 ng/mL), (c) plasma de jabuti após 30 minutos da administração de 5mg/kg de tramadol por via intravenosa



Fonte: (CISCATO, C. H. P.; GRIS, V.N. 2018)

Figura 9 - Cromatograma sobreposto representativo de plasma de jabuti fortificado com tramadol (250 ng/mL) (pico do padrão) e plasma de jabuti após 30 minutos da administração de 5mg/kg de tramadol por via intravenosa (pico da amostra de plasma proveniente de animal tratado). O tempo de retenção foi de 8,864 para a fortificação e 8,870 minutos para a amostra

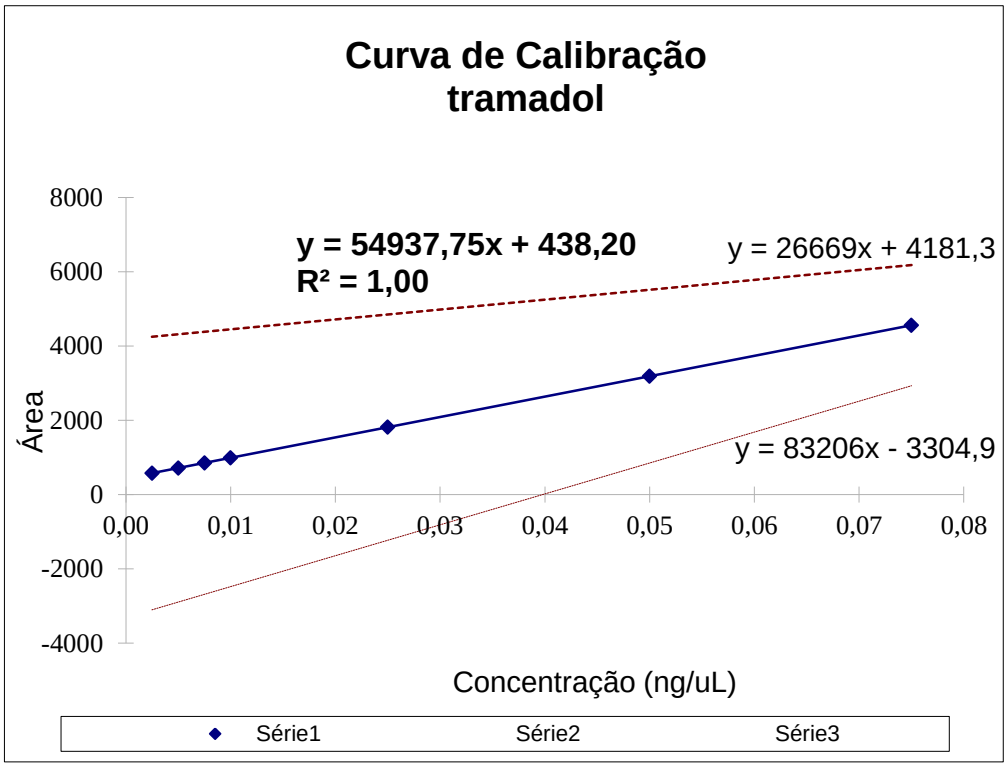


Fonte: (CISCATO, C. H. P.; GRIS, V.N. 2018)

6.4.2 Curva de calibração

O limite de quantificação foi 2.5 ng/mL. O limite de detecção foi de 0,85 ng/mL. O coeficiente de variabilidade intra-amostra foi de 7,6% e o inter-amostra de 8,1%. A curva de calibração (r^2=1,00) está representada na figura 10.

Figura 10 - Curva de calibração para o tramadol em plasma de jabuti nas concentrações de 0,0025 a 0,75 ng/µL



Fonte: (CISCATO, C. H. P.; GRIS, V.N. 2018)

6.4.3 Recuperação

A recuperação para o limite inferior foi de 91,4%, para o limite médio de 107,1% e para o limite superior de 88,5%.

6.4.4 Avaliação não compartimental do perfil plasmático do tramadol

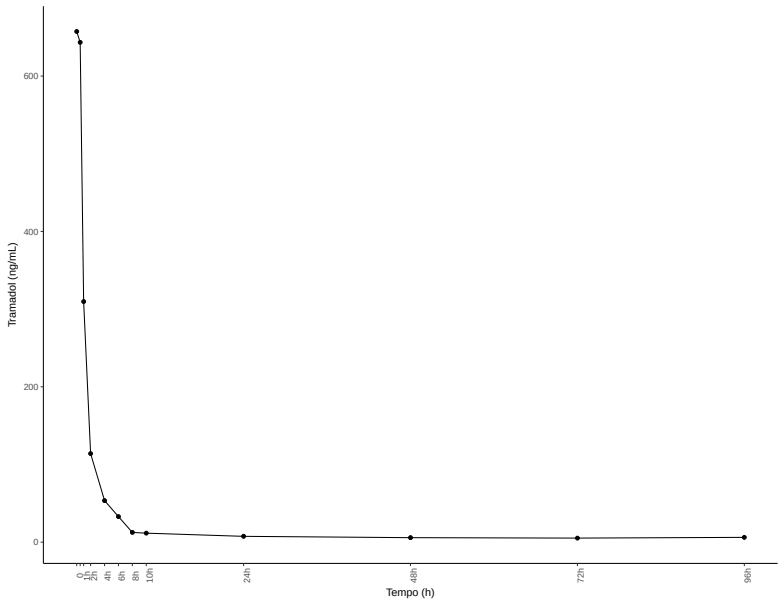
Os resultados individuais da concentração plasmática dos animais e dos parâmetros farmacocinéticos do grupo encontram-se nas tabelas 11 a 16 e gráficos 4 a 6.

Tabela 11 - Concentração plasmática (individuais e média) do cloridrato de tramadol em oito jabutis-piranga tratados por via IV (5 mg/kg)

Tempo (h)	1	2	3	4	5	6	7	8	Média	DP
C_0	325,59	160,44	1975,7	929,27	496,61	123,92	69,23	1178,3	657,38	622,16
0,5	319,22	159,10	1926,5	912,72	485,89	122,37	68,38	1153,3	643,45	606,80
1	114,28	68,82	591,11	859,70	157,20	60,11	61,60	565,24	309,76	293,75
2	48,58	88,79	174,41	98,37	32,00	36,87	24,97	408,33	114,04	120,44
4	17,47	10,77	56,97	41,23	8,67	25,25	16,06	251,42	53,48	76,38
6	3,41	X	19,14	20,37	6,18	14,58	14,60	152,35	32,95	49,09
8	6,11	X	4,42	11,49	3,70	3,91	5,20	53,28	12,59	16,80
10	5,03	14,62	8,00	LIQ	0,00	5,97	5,46	30,75	11,64	9,14
24	3,95	21,47	10,86	LIQ	0,00	5,01	6,44	5,25	7,57	6,41
48	0,00	14,03	5,50	6,16	LIQ	4,05	4,95	6,30	5,86	3,88
72	LIQ	11,59	6,77	0,00	0,00	3,88	6,17	8,24	5,24	3,23
96	0,00	13,66	ILQ	7,73	0,00	3,70	12,14	ILQ	6,20	5,42

Fonte: (GRIS, V.N. 2018)
IV: intravenoso; ILQ: Inferior ao limite de quantificação

Gráfico 4 – Concentração plasmática do cloridrato de tramadol (ng/mL) após administração de 5mg/kg IV em jabutis -piranga (n=8) ao longo do tempo (média ± DP)
.



Fonte: (FERRARO, M.A; GRIS, V.N. 2018)
IV: intravenoso

Tabela 12 - Parâmetros farmacocinéticos (individuais e média ± DP) obtidos por análise não-compartimental do cloridrato de tramadol após administração de 5 mg/kg IV em jabutis-piranga (n=8)

Parâmetros	**Animais**								**Média**	**DP**
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**		
$T_{1/2}$ [a] (h)	17,52	41,49	13,76	19,28	15,88	27,51	28,27	27,36	21,22	8,74
Ke (h-1)	0,04	0,02	0,05	0,04	0,04	0,03	0,02	0,03	0,03	0,01
T_{max} (h)	*NA*	*NA*	*NA*	*NA*	*NA*	*NA*	*NA*	*NA*	*NA*	*NA*
C_{max} (ng/mL)	*NA*	*NA*	*NA*	*NA*	*NA*	*NA*	*NA*	*NA*	*NA*	*NA*
$ASC_{0-\infty}$ (ng*h/mL)	779,50	2498,36	2941,11	2516,83	735,63	804,36	817,64	3546,14	1829,95	1088,36
ASC_{extr} (ng*h/mL)	85,97	817,95	134,46	214,99	14,30	146,73	251,81	325,32	248,94	233,43
ASC_{0-96} (ng*h/mL)	693,53	1680,41	2806,65	2301,84	721,32	657,64	565,83	3417,66	1605,61	1049,40
$ASCM_{0-\infty}$	8363,06	127498,65	12350,38	26619,54	2761,21	17183,39	28403,60	36267,85	32430,96	37412,99
TRM (h)	14,06	51,03	6,80	13,98	38,30	23,38	36,57	11,91	24,50	14,72

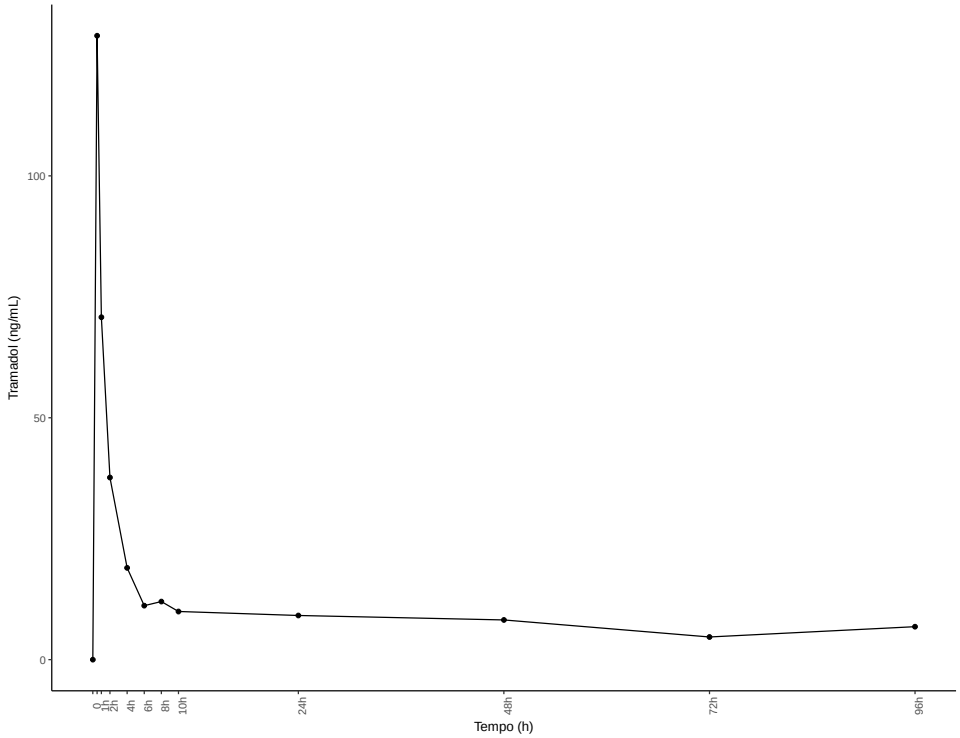
Fonte: (GRIS, V.N. 2018)
Legendas: IV: intravenoso; NA: não aplicável; Ke: constante de eliminação; T_{max}: tempo para atingir a concentração máxima; C_{max}: concentração máxima; $ASC_{0-\infty}$: área sob a curva do tempo 0 ao infinito; ASC_{ext}: área sobre a curva extrapolada; ASC_{0-96}: área sob a curva do tempo 0 ao tempo 96; $ASCM_{0-\infty}$: área sob o primeiro momento da curva; TRM: tempo médio de residência

Tabela 13 - Concentração plasmática (individuais e média) do cloridrato de tramadol em oito jabutis-piranga tratados por via IM (5 mg/kg)

Tempo (h)	1	2	3	4	5	6	7	8	Média	DP
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,5	132,42	115,56	114,67	108,27	278,23	62,91	103,25	116,53	128,98	59,46
1	29,42	76,60	43,98	51,91	80,06	24,60	103,65	156,09	70,79	40,92
2	8,08	61,78	66,75	19,34	56,21	13,59	23,18	52,24	37,65	22,32
4	13,61	37,57	8,45	11,44	X	3,66	16,03	42,09	18,98	13,73
6	5,84	12,71	11,30	9,90	X	6,85	5,28	26,25	11,16	6,69
8	LIQ	7,69	16,85	17,62	X	4,79	2,74	22,37	12,01	7,29
10	X	LIQ	9,75	17,20	5,68	LIQ	7,17	X	9,95	4,43
24	9,41	LIQ	23,67	6,85	X	LIQ	0,00	5,73	9,13	7,89
48	0,00	0,00	23,27	20,27	11,02	2,91	LIQ	0,00	8,21	9,34
72	LIQ	LIQ	5,06	15,49	LIQ	0,00	2,84	0,00	4,68	5,73
96	LIQ	0,00	21,63	15,56	0,00	0,00	3,75	0,00	6,82	8,32

Fonte: (GRIS, V.N. 2018)
IV: intravenoso; ILQ: Inferior ao limite de quantificação

Gráfico 5 - Concentração plasmática do cloridrato de tramadol (ng/mL) após administração de 5mg/kg IM em jabutis -piranga (n=8) ao longo do tempo (média ± DP)



Fonte: (FERRARO, M.A.; GRIS, V.N. 2018)
IM: intramuscular

Tabela 14 - Parâmetros farmacocinéticos (individuais e média ± DP) obtidos por análise não-compartimental do cloridrato de tramadol após administração de 5 mg/kg IM em jabutis -piranga (n=8)

Parâmetros	**Animais**								**Média**	**DP**
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**		
$T_{1/2}$ (h)	35,39	30,51	40,49	50,99	32,39	31,68	20,68	36,36	32,84	6,41
Ke (h-1)	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,01
T_{max} (h)	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,00
C_{max} (ng/mL)	132,42	115,56	114,67	108,27	278,23	62,91	103,25	116,53	128,98	59,46
ASC0-∞ (ng*h/mL)	832,30	1031,40	1950,30	2737,50	1303,90	475,50	470,00	1908,10	1338,63	750,56
ASC_{extr} (ng*h/mL)	315,20	206,10	397,30	1144,60	218,80	77,70	111,80	637,00	388,56	330,55
ASC_{0-96} (ng*h/mL)	517,10	825,30	1553,00	1593,00	1085,20	397,80	581,80	1271,20	978,05	438,13
$ASCM_{0-\infty}$	38790,87	28855,44	38589,80	85476,12	31232,31	11012,82	14070,76	94574,01	42825,27	28938,84
TRM (h)	48,45	28,82	20,96	36,51	25,52	24,12	31,33	51,96	33,46	10,66

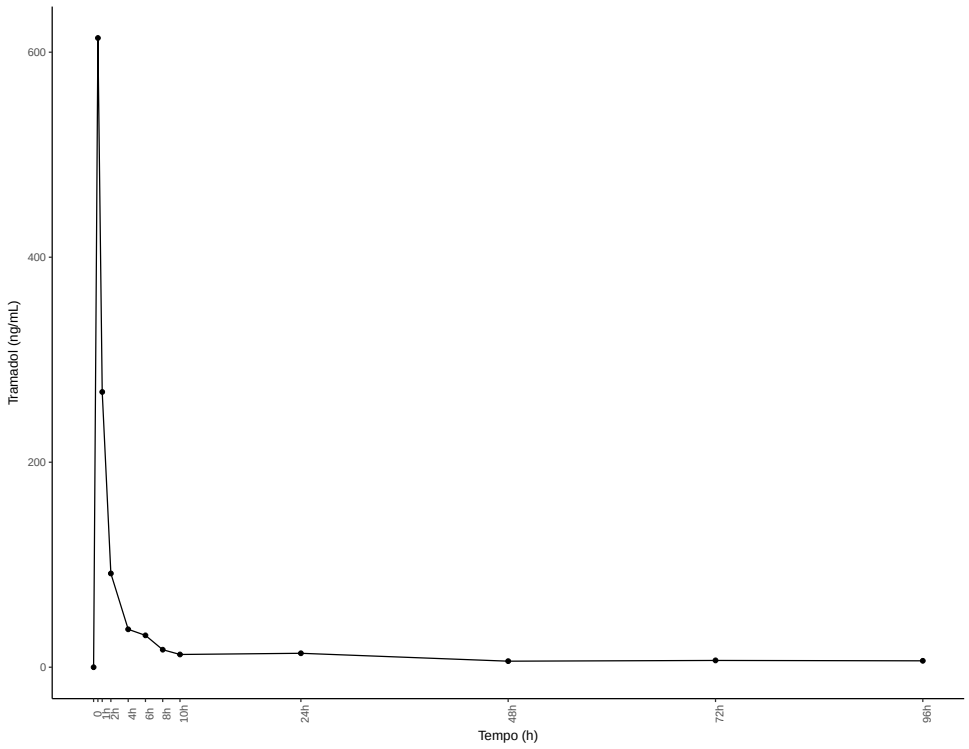
Fonte: (GRIS, V.N. 2018)
Legendas: IM: intramuscular; NA: não aplicável; Ke: constante de eliminação; T_{max}: tempo para atingir a concentração máxima; C_{max}: concentração máxima; $ASC_{0-\infty}$: área sob a curva do tempo 0 ao infinito; ASC_{ext}: área sobre a curva extrapolada; ASC_{0-96}: área sob a curva do tempo 0 ao tempo 96; $ASCM_{0-\infty}$: área sob o primeiro momento da curva; TRM: tempo médio de residência

Tabela 15 - Concentração plasmática (individuais e média) do cloridrato de tramadol em oito jabutis-piranga tratados por via IM (10 mg/kg)

Tempo (h)	1	2	3	4	5	6	7	8	Média	DP
0	0	0	0	0	0	0	0	0		
0,5	267,17	694,35	251,57	521,73	X	402,64	X	1545,8	613,87	443,39
1	58,71	538,84	101,65	130,33	54,78	225,63	233,96	804,53	268,55	250,02
2	15,51	141,78	84,74	69,05	22,61	83,66	170,27	144,11	91,47	53,19
4	26,71	27,16	10,73	67,69	27,28	48,83	37,99	49,70	37,01	16,70
6	10,99	16,34	2,89	64,7	23,56	40,54	25,03	64,60	31,08	21,94
8	0	3,92	3,4	40,12	27,22	27,99	X	X	17,11	15,30
10	0	4,81	3,35	25,1	15,27	12,82	12,32	26,19	12,46	9,04
24	18,21	6,23	LIQ	21,3	21,86	11,40	0,00	16,34	13,62	7,56
48	0	5,52	2,5	17,43	7,10	LIQ	0,00	9,11	5,95	5,68
72	X	4,82	3,64	LIQ	7,60	0,00	11,64	12,35	6,68	4,38
96	0	2,88	LIQ	LIQ	13,55	0,00	12,20	9,18	6,30	5,58

Fonte: (GRIS, V.N. 2018)
IV: intravenoso; ILQ: Inferior ao limite de quantificação

Gráfico 6 – Concentração plasmática do cloridrato de tramadol (ng/mL) após administração de 5mg/kg IM em jabutis -piranga (n=8) ao longo do tempo (média ± DP)



Fonte: (FERRARO, M.A.; GRIS, V.N. 2018)
IM: intramuscular

Tabela 16 - Parâmetros farmacocinéticos (individuais e média ± DP) obtidos por análise não-compartimental do cloridrato de tramadol após administração de 10 mg/kg IM em jabutis -piranga (n=8)

Parâmetros	Animais								Média	DP
	1	2	3	4	5	6	7	8		
$T_{1/2}$ (h)	29,67	18,83	18,77	21,08	31,12	21,06	29,44	18,38	22,50	8,02
Ke (h-1)	0,02	0,04	0,04	0,03	0,02	0,03	0,02	0,04	0,03	0,01
T_{max} (h)	0,50	0,50	0,50	0,50	X	0,50	X	0,50	0,50	0,00
C_{max} (ng/mL)	267,17	694,35	251,57	521,73	X	402,64	X	1545,80	613,87	524,26
ASC0-∞ (ng*h/mL)	1395,11	1576,50	650,03	2103,72	1358,03	1619,97	2457,50	3300,41	1807,66	753,28
ASC_{extr} (ng*h/mL)	269,80	78,25	98,68	180,98	341,56	191,49	518,11	243,42	240,29	132,54
ASC_{0-96} (ng*h/mL)	1125,31	1498,25	551,34	1922,75	1016,47	1428,49	1939,40	3056,99	1567,37	710,54
$ASCM_{0-\infty}$	37453,57	12976,01	9778,06	20798,11	39932,41	20776,91	71747,39	29826,21	30411,08	18588,35
TRM (h)	28,83	9,44	16,95	9,89	29,97	13,64	31,18	10,42	18,79	8,99

Fonte: (GRIS, V.N. 2018)
Legendas: IM: intramuscular; NA: não aplicável; Ke: constante de eliminação; T_{max}: tempo para atingir a concentração máxima; C_{max}: concentração máxima; $ASC_{0-\infty}$: área sob a curva do tempo 0 ao infinito; ASC_{ext}: área sobre a curva extrapolada; ASC_{0-96}: área sob a curva do tempo 0 ao tempo 96; $ASCM_{0-\infty}$: área sob o primeiro momento da curva; TRM: tempo médio de residência

7 DISCUSSÃO

7.1 TEMPERATURA CORPORAL

A mensuração da temperatura corporal dos jabutis foi realizada para a cada momento de coleta de dados, uma vez que existe um correlação importante entre temperatura e metabolismo nesses animais.

Os experimentos começaram sempre às 7 horas da manhã. A temperatura média dos animais das 7 às 10 horas e após as 16 horas foi de 27,1 ± 0,3 ºC. Os maiores valores de temperatura foram obtidos às 14 e 15 horas (28,4 ± 0,1 ºC). Isso ocorreu em todas as semanas de experimento. Observou-se um padrão de variabilidade diário, mas sem diferença estatística durante o dia ou durante os meses do estudo.

Os animais foram mantidos em seu recinto original adaptado para que a variação de temperatura e umidade fosse mínima. A temperatura dos animais não foi mensurada durante o período da noite e, apesar dos animais permanecerem fechados em seu abrigo com uma luz infravermelha de aquecimento, a temperatura corpórea mais baixa foi sempre a primeira da manhã. Devido à variação de temperatura entre o foco de luz para aquecimento e o resto do ambiente, é possível que mudanças na atividade metabólica tenham ocorrido e consequente influência nas variáveis estudadas. De qualquer forma, todos os animais foram alocados em um recinto compartilhado e estavam sujeitos aos eventos de maneira uniforme.

7.2 TESTE PLANTAR

Os resultados do estudo apontaram que o tramadol não apresentou efeitos antinociceptivos frente ao estímulo térmico no período de 30 minutos a 96 horas após a administração de 10 mg/kg por via intramuscular e de 5 mg/kg por via intravenosa. No grupo que recebeu 5 mg/kg IM, foi observado aumento da latência para a retirada do membro nos momentos de 1hora e 24 horas em relação ao valor basal.

Quando os dados foram normalizados o grupo TIM5 apresentou aumento da LRRM nos momentos 1 hora, 4 horas, 24 horas e 96 horas em relação ao grupo controle.

O grupo TIM10 apresentou maior tempo para a LRRM nos momentos 30 minutos, 1, 2, 4, 10, 48 e 96 horas, porém sem diferença estatística. Assim como grupo TIV5 que apresentou valores maiores em relação ao basal nos momentos 30 minutos a 96 horas, porém sem diferença estatística.

Os resultados com diferença significativa para os dois tipos de análise (número bruto e normalizado) são encontrados somente no grupo TIM5. Porém, é pouco provável que este resultado esteja relacionado a um efeito antinociceptivo do fármaco, uma vez que não foi observada continuidade do efeito entre esses horários. Além disso, apesar de não ter sido encontrada diferença estatística entre o valor basal dos grupos, os valores encontrados no momento basal do grupo TIM5 foram menores (média = 8,69) do que nos grupos SAL (média = 12,65), TIM10 (média = 13,3) e TIV (média = 12,12). Uma análise visual do gráfico 1 destaca essa diferença.

Esse resultado foi inesperado, uma vez que a dose de 10 mg/kg IM em tigres d´água promoveu aumento dos tempos de LRRM de 8 até 48 horas e a dose de 10 mg/kg VO e SC em tartarugas de orelha vermelha promoveu aumento dos tempos de LRRM de 6 a 96 horas e de 12 a 48 horas, respectivamente (BAKER; SLADKY; JOHNSON, 2011; GIORGI et al., 2015b).

Uma possível explicação para a ausência do aumento da LRRM seria de que as doses utilizadas nesse experimento foram muito baixas para a espécie. Entretanto, já foi demonstrado que doses de 10 mg/kg ou superiores, apesar de promoverem aumento nos tempos de LRRM, resultam em diminuição da frequência respiratória e mais de 50% de decréscimo na ventilação, devendo ser utilizadas com cautela. Doses fora dessa faixa não promoveram efeito antinociceptivo (1 mg/kg VO) ou promoveram antinocicepção com importante depressão respiratória persistente por até 12 horas (25 mg/kg VO) (BAKER; SLADKY; JOHNSON, 2011). As doses escolhidas estão de acordo com trabalhos publicados em quelônios, porém não foram realizados trabalhos com tramadol na mesma espécie (BAKER; SLADKY; JOHNSON, 2011; GIBBONS; KLAPHAKE; CARPENTER, 2013; NORTON et al., 2015).

É possível também que o tramadol tenha uma atividade nociceptiva mais evidente durante alguma época do ano. Os animais foram avaliados durante quatro meses (período deverão e outono) e não apresentaram nenhuma diferença nos valores basais, porém não se sabe qual seria a resposta de avaliações ao longo do ano. Em estudo recente, iguanas e teiús, avaliados em ambiente controlado, apresentaram diferenças comportamentais significativas nos testes de campo aberto, natação forçada (iguanas) e no teste de plantar seguindo oscilações diárias, com variações entre os meses. Nestas espécies, o teste plantar apresentou cinco padrões de oscilação na análise diária nos diferentes meses do ano. Os dados sugerem a influência de um ritmo endógeno sobre o comportamento e ainda a influência de fatores múltiplos ainda não compreendidos para as espécies (BISETTO, 2016).

Finalmente, é possível que o tramadol não apresente efeito antinociceptivo em jabutis-piranga. Em um estudo realizado com gecos-leopardo (*Eublepharis macularius*) submetidos à anestesia com alfaxalona e administração de tramadol (10 mg/Kg IM) e meloxicam (1 mg/kg IM) não foram encontrados resultados consistentes com uma resposta antinociceptiva frente a estímulos por pinçamento, deixando aberta a questão de efeito em algumas espécies e não em outras (HEUVEL, 2017). No entanto, é importante salientar que o método utilizado para análise da nocicepção não foi preciso devido às diferentes pressões que podem ser aplicadas durante o pinçamento.

A diferença da resposta aos opioides nas diferentes espécies é inquestionável. Isso foi claramente demonstrado com a morfina, que apresentou efeito antinociceptivo em dragões barbudos (10mg/kg), tartarugas de orelha vermelha (1,5 mg/kg), mas não em cobras do milho (40 mg/kg). Pode-se notar também que há grande variação de doses entre as espécies ((SLADKY et al., 2007; SLADKY et al., 2008).

Sabe-se ainda que a família dos genes dos receptores se encontra conservada em diversas ordens de vertebrados (LI; KEITH JR.; EVANS, 1996). Em um estudo recente, os receptores δ e κ foram caracterizados em sistema nervoso central de iguanas (BRESSAN, 2017). Porém ainda pouco se sabe sobre a localização desses receptores no sistema nervoso central das diferentes espécies e se eles possuem o mesmo papel na fisiologia da dor que em mamíferos.

Além disso, o tramadol possui fraca ação em receptores opioides μ e o responsável por grande parte do efeito opioide é o seu metabólito O-desmetiltramadol, que apresenta afinidade aos receptores cerca de 200 vezes maior que o composto primário. Em cães da raça Beagle, foi demonstrado que a administração de tramadol por via intravenosa não promoveu efeito antinociceptivo, justamente pela associação da resposta a uma quantidade muito baixa do metabólito mensurada no plasma (KÖGEL et al., 2014). A formação do metabólito responsável pela maior parte do efeito opioide acontece no fígado. Em estudo ainda em desenvolvimento, constatou-se que há formação do O-desmetiltramadol em jabutis-piranga após a administração intravenosa e intramuscular, indicando funcionalidade do sistema hepático e biotransformação desse fármaco. Nesse trabalho foi demonstrada a presença do metabólito até 4 horas após a administração (em fase de elaboração)[19]. Se existe uma correlação entre a concentração plasmática do tramadol e do seu metabólito com efeitos antinociceptivos, ainda está indeterminado para a espécie. Em tigres d'água americanos tratados com tramadol 10 mg/kg IM, não houve correlação entre os níveis plasmáticos de tramadol e a atividade antinociceptiva. Para O-desmetiltramadol o resultado apontou para um possível relacionamento entre as variáveis, mas de maneira indireta (GIORGI et al., 2015b).

O segundo mecanismo de ação do tramadol é caracterizado pela inibição da recaptação de noradrenalina e serotonina e é extensivamente descrito em mamíferos. Esses neurotransmissores já foram quantificados em tartarugas, porém, pouco se sabe sobre o seu papel nas vias analgésicas descendentes (MAHAPATRA; MAHATA; MAITI, 1989).

Outro ponto a ser discutido é que apesar do tramadol demonstrar efeito antinociceptivo em espécies de proximidade filogenética ao jabuti-piranga, em tese, adaptações fisiológicas poderiam justificar a resposta diferente frente ao mesmo estímulo.

Os répteis são encontrados em todos os continentes, com exceção da Antártida. Isso se traduz em uma adaptação fisiológica das diferentes espécies aos mais diversos climas. Sladky, Kinney e Johnson (2008) e Leal et al. (2017) discutem a possibilidade de répteis que habitam áreas desérticas e serem fisiologicamente

[19] GRIS et al. Farmacocinética do o-desmetiltramadol em jabutis-piranga, 2018.

adaptados a mudanças drásticas de temperatura em seu habitat e, que portanto, poderiam apresentar maiores valores de LRRM e menores variações de duração da latência. Por outro lado, animais de ambientes aquáticos estariam expostos a menores flutuações de temperatura, apresentando, portanto, valores menores do LRRM basal e maior variabilidade do tempo de latência Porém, assim como já avaliado por Bressan (2017), essa hipótese não foi sustentada pelo presente trabalho. Os jabutis-piranga são exemplos de animais terrestres que pela sua distribuição geográfica são expostos à variação extrema de temperatura, que pode partir de valores negativos e chegar a valores maiores do que 40ºC (MONTAÑO et al., 2013). No entanto, os jabutis apresentaram LRRM basal média de 11,6 ± 5 segundos. Os valor médio da RLLM no momento basal encontrado em tartarugas de orelha vermelha foi de 16,9 ± 1,2, (SLADKY et al., 2007), 6,55 ± 1,7 em tigres d'água americanos (GIORGI et al., 2015b), 8,9 ± 0,6 segundos em dragões barbudos, 6,9 ± 0,8 segundos em cobras do milho (SLADKY; KINNEY; JOHNSON, 2008), 8,8 ± 2,9 segundos em teiús (LEAL et al., 2017) e 12,7 ± 1 segundos em iguanas (BRESSAN, 2017).

Infelizmente, poucos métodos estão disponíveis para a avaliação nociceptiva em répteis. No presente estudo, o método do teste plantar foi considerado eficaz e de fácil aplicação. Esse método apresenta algumas vantagens como a avaliação rápida e principalmente uma resposta clara da retirada do membro: os animais apresentavam um movimento abrupto do membro para dentro da carapaça. Essa reação foi observada somente no membro que recebeu o estímulo, permanecendo imóvel o membro contralateral.

Ao contrário de outros testes utilizados em roedores (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001; BARROT, 2012) e répteis (WANBUGU et al., 2010), como por exemplo o teste da formalina intradérmica, o teste plantar não provoca a indução de inflamação duradoura e o animal tem a possibilidade de se afastar da fonte de estímulo e cessá-la por completo sem continuar a experimentar uma possível sensação de desconforto e potencial lesão tecidual (BARROT, 2012). O teste plantar é um método já descrito em répteis e especialmente utilizado com sucesso em tartarugas de orelha vermelha, tigres d'água, teiús e iguanas (SLADKY et al., 2007,

2008; BAKER; SLADKY; JOHNSON, 2011; GIORGI et al., 2015b; LEAL et al., 2017; BRESSAN, 2017; BISETTO; MELO; CARREGARO, 2018[20]).

Levantou-se a hipótese de lesão da superfície plantar dos animais devido às mensurações repetidas ao longo do dia e dos meses. Entretanto, por meio de inspeção visual, não foram observadas lesões nos membros dos animais durante e até dois meses após o término no experimento.

O estímulo térmico provocado pelo aparelho utilizado equivale a cerca de 47ºC. Em humanos, os receptores responsáveis pela mediação da dor estão a cerca de 200 µm de distância da superfície, com localização subepidérmica e o limiar de dor é de aproximadamente 43,2°C. O limiar para o produção de eritema transitório é de 53 °C e o limiar para o aparecimento de bolhas requer uma temperatura de 56,7°C por 7,8 segundos de exposição. A partir do limiar de formação de bolhas, mesmo pequenos prolongamentos na exposição que produzam mudanças de até mesmo 1°C resultam em bolhas que se unem umas às outras formando uma única bolha envolvendo toda área irradiada algumas horas após a exposição e aumentando em altura em até 24 horas (STOLL; GREENE, 1959). Ainda não foram realizados estudos dessa magnitude em quelônios, porém se supõe que o limiar de dor nesses animais, frente ao mesmo estímulo térmico, seja mais alto quando comparado ao limiar em humanos. A camada epidérmica dos répteis tende a ser mais espessa, especialmente em quelônios terrestres, pois a pele apresenta a função de ajudar na retenção de água. Além disso, os répteis podem apresentar uma camada superficial de queratina maior que a outros animais (WYNEKEN; MADER, 2009).

Por fim, constatou-se que os animais não apresentaram lesão e responderam de maneira satisfatória ao estímulo térmico infravermelho na potência de 70mW/cm^3.

Todas as avalições foram realizadas pelo mesmo observador. A manipulação dos animais (aplicação do tratamento e coleta de sangue) também foi realizada pelo mesmo grupo de pesquisadores para minimizar um possível efeito estressor e alteração dos resultados.

---

[20] BISETTO, S. P.; MELO, C. F.; CARREGARO, A. B. Evaluation of sedative and antinociceptive effects of dexmedetomidine, midazolam and dexmedetomidine-midazolam in tegus (*Salvator merianae*). **Veterinary Anaesthesia and Analgesia.** (Aceito para publicação em 2018). No prelo.

7.3 AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA

O tramadol é amplamente utilizado em humanos (GROND; SABLOTZKI, 2004). No Brasil, o tramadol é apontado como um analgésico muito utilizado para o tratamento da dor em répteis, com adesão de 89% dos clínicos (em fase de elaboração[21]).

Em geral, para se avaliar a eficácia analgésica de um fármaco, devem ser realizados estudos de farmacocinética e farmacodinâmica específica do fármaco para determinada espécie. Somente os dados de farmacocinética não são suficientes para determinar as doses e intervalos apropriados, pois as concentrações plasmáticas dos opioides nem sempre se correlacionam com a analgesia (HAWKINS, 2006). Porém, elas podem servir como um guia até que estudos mais específicos sejam realizados.

A proposta do estudo foi determinar se a administração intravenosa e intramuscular de tramadol levaria a concentrações plasmáticas consistentes com aquelas que produzem analgesia em mamíferos.

Estudos em humanos e outros mamíferos indicam que concentrações do tramadol e dos seus metabólitos acima de 100 ng/mL são consistente com ação analgésica (GROND; SABLOTZKI, 2004). Entretanto, no único estudo com tramadol em tigres d´água, a atividade antinociceptiva não foi correlacionada com a concentração plasmática do tramadol (GIORGI et al., 2015b).

A concentração máxima encontrada em jabutis-piranga foi de 128,98 ± 59,46 ng/mL (5 mg/kg) e 613,87 ± 524,26 ng/mL enquanto em tartarugas marinhas foi de 373 ± 153 ng/mL (5 mg/kg) e 719 ±331 (ng/mL) (NORTON et al., 2015). Esse parâmetro diferiu muito do resultado encontrado em tigres d´água, que teve sua concentração máxima em 58220 ± 25180 ng/mL. O tramadol é rapidamente absorvido por via intramuscular em humanos e apresentou uma concentração máxima de 166 ng/mL em 0,75 horas após administração de 100 mg (LINTZ; BEIER; GERLOFF, 1999). Em coelhos a C_{max} após 11 mg/kg foi de 135,3 ± 89,1 ng/mL (SOUZA; GREENACRE; COX, 2008).

Todos os jabutis tratados com 5 mg/kg e 10 mg/kg apresentaram a C_{max} em 30 minutos. O T_{max} encontrado em tartarugas marinhas foi de 11,5 ± 4,76 horas (5

[21] GRIS et al., Use of Anesthetics and Analgesics by Brazilian veterinarians, 2018.

mg/kg) e 14 ± 6,44 horas (NORTON et al., 2015). Os dados do presente trabalho são, porém, semelhantes aos encontrados em tigres d´água (0,7 ± 0,16 horas), em cães (1,04 ± 0,51 horas) e humanos (0,75 horas) (LINTZ; BEIER; GERLOFF, 1999; KUKANICH; PAPICH, 2004; GIORGI et al., 2015b).

A meia vida de eliminação encontrada no estudo com jabutis-piranga foi de 21,22 ± 8,74 horas para TIV5, 32,84 ± 6,41 horas para TIM5 e 22,5 ± 8,02 horas para TIM10, corroborando com os valores encontrados em tartarugas marinhas 20,35 ± 21,52 horas e 22,67 ± 23, 72 horas para 5 e 10 mg/kg, respectivamente (NORTON, 2015). Estes dados se assemelham também com os valores encontrados em tigres d´água que receberam 10 mg/kg, sendo de 28,7 ± 15,77 horas (GIORGI et al., 2015b).

Como era de se esperar, a meia vida em humanos (5-6 horas) (GROND; SABLOTZKI, 2004), coelhos (2,4 ± 1,35 horas) (SOUZA; GREENACRE; COX, 2008) e cães (0,8 ± 0,2 horas)(KUKANICH; PAPICH, 2004) foi muito menor do que a encontrada no presente estudo assim como em outros trabalhos com répteis (GIORGI et al., 2015b; NORTON, 2015)

7.4 INTERCORRÊNCIAS

Uma das limitações do estudo foi o atraso na compra do padrão do metabólito O-desmetiltramadol para inclusão dos resultados na dissertação. Foi realizado contato com três empresas fornecedoras de que informaram sobre a impossibilidade de importação do produto devido à ausência da licença necessária para compra de produtos controlados (controlada pela portaria 344 da ANVISA). Foi realizado também contato com duas empresas farmacêuticas sobre a doação do padrão para fins didáticos. Umas delas não retornou e a outra informou sobre a indisponibilidade do metabólito, sendo possível somente a doação do padrão do tramadol. Além disso, três pesquisadores (UNESP Araraquara, USP Ribeirão Preto e UFBA) foram contatados sobre a possibilidade de doação de padrão disponível no laboratório ou de indicação de empresa para compra. A última pesquisadora retornou com uma indicação e o padrão foi adquirido no final

do experimento. Os resultados estarão disponíveis do artigo resultante dessa dissertação.

O método de análise do plasma também foi modificado desde o projeto inicial. Foram realizadas centenas de testes e corridas cromatográficas no aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência com DAD. Foi possível avaliar a recuperação e linearidade do método para concentrações altas (cerca de 4 μg/mL), porém a faixa esperada para o trabalho seria de 10 a 1000 ng/mL. Foram testados diferentes métodos e realizada consultoria com o responsável pelo desenvolvimento do método descrito em literatura, porém sem sucesso. Felizmente, foi firmada uma parceria com um instituto em São Paulo que resultou em uma análise eficiente e um método inédito.

O número de animais estudados nesse projeto foi pequeno. Dos cerca de 60 animais triados no CeMaCAS, apenas nove foram selecionados para o projeto seguindo o critério de histórico médico e peso. Todos os jabutis selecionados foram fêmeas.

No 2º dia da 4ª semana de experimento, um dos jabutis veio a óbito. O animal foi encontrado pela equipe debaixo do abrigo, imóvel e aparentemente em apneia por volta das 7 horas da manhã. Foi levado então para o atendimento na clínica médica, onde se constatou que ele estava respirando, porém sem outros sinais de movimentação ou reação a estímulo. Constatou-se o óbito por volta das 12h horas do mesmo dia. O material foi então encaminhado para necropsia no VPT-FMVZ-USP. A necropsia foi realizada no mesmo dia e a *causa mortis* constatada no laudo foi de insuficiência respiratória. Esse animal fazia parte do grupo controle. Uma das hipóteses foi de um possível efeito depressor respiratório causado pelo tramadol, porém sendo o animal pertencente ao grupo controle, essa hipótese foi descartada. Uma segunda possibilidade seria a de uma insuficiência respiratória causada por anemia devido às colheitas de sangue. Embora esse animal fosse um dos maiores do grupo, apresentasse crescente ganho de peso ao longo das semanas e ausência de comportamento anormal durante o experimento, essa hipótese não deve ser descartada.

8 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que o teste plantar mostrou-se adequado como método de avaliação da resposta nociceptiva em jabutis-piranga e não produziu respostas ambíguas.

As doses de tramadol 10 mg/kg por via intramuscular e 5 mg/kg por via intravenosa não apresentaram efeito antinociceptivo. O grupo que recebeu 5 mg/kg por via intramuscular apresentou diferença nos tempos 1 hora e 24 horas após a administração em relação ao grupo controle. É mais provável que esse resultado não esteja relacionado ao efeito antinociceptivo do tramadol, uma vez que os valores não foram consistentes ao longo do tempo e o valor basal desse grupo foi mais baixo que dos grupos SAL, TIV5 e TIV10.

A farmacocinética do tramadol foi determinada por abordagem não-compartimental. Constatou-se que, independente da via de administração, o tramadol apresentou meia-vida de eliminação longa. Além disso, o método inédito utilizado no estudo mostrou-se eficaz.

REFERÊNCIAS

ABINPET (Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação). **Dados de Mercado.** Disponível em: http://abinpet.org.br/site/mercado/. Acesso em: 02 jan. 2018.

BAKER, B. B.; SLADKY, K. K.; JOHNSON, S. M. Evaluation of the analgesic effects of oral and subcutaneous tramadol administration in red-eared slider**. Journal of the American Veterinary Association**, Schaumburg, v. 238, n. 2, p. 220–227, 2011.

BARROT, M. Review tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience**,[S.l.], v. 211, p. 39–5, 2012

BENNETT, R. A. Neurology. In: MADER, D. R. (Ed.). **Reptile medicine and surgery.** 1st ed. Philadelphia: Saunders, 1996. p. 141–148.

BISETTO, S. P. **Avaliação das atividades locomotora e nociceptive diárias e sazonais de lagartos mantidos em condições ambientais controladas.** 2016. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

BOYER, H. T.; BOYER D.M. Turtles, Tortoises and Terrapins. In: MADER, D. R. (Ed.). **Reptile medicine and surgery.** 2nd ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2006. p. 87.

BOX, K. J.; COMER, J. E. A. Using measured pka, logp and solubility to investigate supersaturation and predict bcs class. **Current Drug Metabolism**, [S.I.], v. 9, n. 9, p. 869-878, 2008.

BRESSAN, T. F. **Localização dos receptores opioides no sistema nervoso central e avaliação dos efeitos analgésico e sedativo da morfina e do butorfanol em iguanas verdes (*Iguana iguana*).** 2017. 114 f. Tese (Doutorado em Biociência Animal) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

BUJES, C. S. Os Testudines continentais do Rio Grande do Sul, Brasil: taxonomia, história natural e conservação. **Iheringia, Série Zoologia,** Porto Alegre, v. 100, n. 4, p. 413-424, 2010.

BULHLMAN, K. A. **World Turtle Database**. 2000. Disponível em: <http://emys.geo.orst.edu/cgi-bin/emysmap?tn=137&cf=ijklmno>. Acesso em 25/01/2018.

CAMPBELL, T. W. Clinical pathology of reptiles. In**:** MADER, D. R. **Reptile medicine and surgery**. 2nd ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2006. p. 453-470

CHAO, C. K.; YU, L. L.; LIU, C. M.; YANG, T. H.; CHEN, C. M. Bioequivalence study of tramadol by intramuscular administration in healthy volunteers: Randomized controlled trial. **Arzneimittelforschung**, Germany, v. 50, n. 7, p. 636-640, 2000.

CISCATO, C; BARBOSA, C.; GEBARA, A. Sample Cleanup Methods for Multiresidue Pesticide CG/MS/MS Analysis in Avocado: A Comparison of GPC and EMR - Lipide Methods.Application. **Note - Food Testing and Agriculture.** EUA, Agilent Technologies, 2016.

CONCEIÇÃO, A. M.; ALMEIDA, B. M.; BRASILEIRO, M. T. R.; BARROS, L. E. D.; WILTSHIRE, S. A.; SARMENTO, C. A. P. Comunicação: hermafroditismo em jabuti-piranga (*Geochelone carbonaria*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** Belo Horizonte, v. 61, n. 6, p.1478-1481, 2009.

COSTA, H. C.; BÉRNILS, R. S. Répteis brasileiros: Lista de espécies – 2015. **Herpetologia Brasileira,** [S.l.], v. 4, n. 3, p. 75–94, 2015.

CUMMINGS, B. B.; SLADKY, K. K.; JOHNSON, S. M. Tramadol analgesic and respiratory effects in red-eared slider turtles (*Trachemys scripta*). In: **American Association of Zoo Veterinarians and American Association of Wildlife Veterinarians Joint Conference**. Tulsa, p. 115, 2009.

DALGALARRONDO, P. Os vertebrados: um mesmo plano para todos os encéfalos. In: DALGALARRONGO, P. **Evolução do cérebro: sistema nervoso, psicologia e psicopatologia sob a perspectiva evolucionista.** Porto Alegre: Artmed, 2011.

DIETHELM, G. Reptiles. In: CARPENTERS, J. W. **Exotic Animal Formulary**. 3th ed. Saunders, Philadelphia. 2005. p. 105.

DI SALVO, A.; GIORGI, M.; CATANZARO, A.; DELI, G.; DELLA ROCCA, G. Pharmacokinetic profiles of meloxicam in turtles (*Trachemys scripta scripta*) after single oral, intracoelomic and intramuscular. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics,** [S.l.], v. 39, n. 1, p. 102-105, 2016.

DIVERS, J. S.; PAPICH, M.; MCBRIDE, M.; STEDMAN, N. L.; PERPINAN, D.; KOCH, T. F.; HERNANDEZ, S. M.; BARRON, H.; PETHEL, M.; BUDSBERG, S. T. Pharmacokinetics of meloxicam following intravenous and oral administration in green iguanas *(Iguana iguana).* **American Journal of Veterinary Research,** Schaumburg, v. 71, n. 11, p. 1277-1283, 2010.

DUNCAN, A. Reptile and Amphibian Analgesia. In: MILLER, E. R.; FOWLER, M. **Fowler's zoo and wild animal medicine**. 7th ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2012. p. 247.

Food and Drug Administration (FDA), **Analytical Procedures – Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, US Department of Health – Human Services**. 2001 Disponível em http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm> Acesso em: 25 jan 2018.

FLEMING, G. J. Clinical technique: chelonian shell repair. **Journal of Exotic Pet Medicine,** [S.l.], v. 17, n. 4, p. 246-258, 2008.

FLÓRIO, J. C., SOUSA, A. B. Farmacocinética. In: SPINOSA, H. S.; BERNARDI, M. M.; GÓRNIAK, S. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 6a ed. Rio de Janeiro: GEN-Guanabara Koogan, 2017. p. 44.

FRINK, M. C.; HENNIES, H.H., ENGLBERGER, W.; HAURAND, M.; WILFFERT, B. Influence of tramadol on neurotransmitter systems of the rat brain. **Arzneimittelforschung,** Germany, v. 46, n. 11, p. 1029-1036, 1996.

GIBBONS, P. M.; KLAPHAKE, E.; CARPENTER, J. W. Reptiles. In: CARPENTER, J. **Exotic animal formulary**. 4th. ed. Missouri: Elsevier, 2013. p. 135.

GIORGI, M.; LEE, H.; ROTA, S.; OWEN, H. DE VITO, V.; DEMONTIS, M. P.; VARONI, V. V. Pharmacokinetic/pharmacodynamic Assessments of Tapentadol in Yellow-bellied Slider Turtles (*Trachemys scripta scripta*) After a Single Intramuscular Injection. **Journal of Exotic Pet Medicine,** [S.l.], v. 24, n. 3, p. 317-325, 2015a.

GIORGI, M.; SALVADOR, M.; DE VITO, V.; OWEN, H.; DEMONTIS, M. P.; VARONI, M.V. Pharmacokinetic/pharmacodynamic assessments of 10 mg/kg tramadol intramuscular injection in yellow-bellied slider turtles (*Trachemys scripta scripta*). **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, [S.l.], v. 38, p. 488-496, 2015b.

GONÇALVES-JR, V.; HAZARBASSANOVA, N. Q.; SIQUEIRA, A.; FLORIO, J. C.; CISCATO, C. H. P.; MAIORKA, P. C.; FUKUSHIMA, A. R.; SPINOSA, H. S. Development and validation of carbofuran and 3-hydroxycarbofuran analysis by high-pressure liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD) for forensic Veterinary Medicine. **Journal of Chromatography B**, [S.l.] v. 1065–1066, p. 8-13, 2017.

GROND, S.; SABLOTZKI, A. Clinical pharmacology of tramadol. **Clinical Pharmacokinetics,** [S.l.], v. 43, n. 13, p. 879-923, 2004.

GUARDIOLA, E.; BANÒS, J. E. Is there an increasing interest in pediatric pain? Analysis of the biomedical articles published in the 1980s. **Journal of Pain Symptom Management,** [S.l.], v. 8, p. 449-450, 1993.

HAWKINS, M. G. The Use of analgesics in birds, reptiles, and small exotic mammals. **Journal of Exotic Pet Medicine.** [S.l.], v. 15, n. 3, p. 177-192, 2006.

HAWKINS, M. G., PAUL-MURPHY, P. Bird-specific considerations: recognizing pain behavior in pet birds. In: GAYNOR, J. S.; MUIR III, W. W. **Handbook of Veterinary Pain Management.** 3 ed. Missouri: Elsevier, 2014.

HOLZ, P.; BARKER, I. K.; BURGER, J. P.; CRAWSHAW, G. J.; CONLON, P. D. The Effect of the renal portal system on pharmacokinetic parameters in the red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine,**Yulee, v. 28, n. 4, p. 386-393, 1997.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-tematicas/insumos-agropecuarios/anos-anteriores/ibge-populacao-de-animais-de-estimacao-no-brasil-2013-abinpet-79.pdf> Acesso: 25 jan. 2018.

International Association for the Study of Pain (IASP). **Taxonomy.** Disponível em: https://www.iasp-pain.org/Taxonomy#Pain. Acesso em 25 de janeiro de 2018.

IDE, S.; MINAMI, M.; ISHIHARA, K.; UHL, G. R.; SORA, I.; IKEDA, K. Mu opioid receptor-dependent and independent components in effects of tramadol . **Neuropharmacology,** [S.l.], v. 51, p. 651-658, 2006.

JESSE, C. R.; WILHELM, E. A.; BORTOLATTO, C. F.; NOGUEIRA, C. W. Evidence for the involvement of the noradrenergic system, dopaminergic and imidazoline

receptors in the antidepressant-like effect of tramadol in mice. **Pharmacology, Biochemical & Behavior,** [S.l.], v. 95, p. 344-350, 2010.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science,** Curitiba**,** v. 13, n.1, p.1-12, 2008.

KLOTZ, U. S. Tramadol - the impact of its pharmacokinetic and pharmacodynamic properties on the clinical management of pain. **Arzneimittelforschung**, Germany, v 53, n. 10, p. 681-687, 2003.

KÖGEL, B.; TERLINDEN, R.; SCHNEIDER, J. Characterisation of tramadol, morphine and tapentadol in an acute pain model in Beagle dogs. **Veterinary Anesthesia and Analgesia,** [S.l.], v. 41, n.3, p. 297-304, 2004.

KUKANICH, B.; PAPICH, M. G. Pharmacokinetics of tramadol and the metabolite O-desmethyltramadol in dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, [S.l.], v. 27, n. 4, p. 239-246, 2004.

KUMMROW, M. S.; TSENG, F.; HESSE, L.; COURT B. V. Pharmacokinetics of Buprenorphine after Single-Dose Subcutaneous Administration in Red-Eared Sliders (*Trachemys scripta elegans*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Yulee, v. 39, n. 4, p. 590-595, 2008.

LAI, O.; DI BELLO, A.; SOLOPERTO, S.; FREGGI, D.; MARZANO, G.; CAVALIERE, L.; CRESCENZO, G. Pharmacokinetic behavior of meloxicam in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) after intramuscular and intravenous administration. **Journal of Wildlife Diseases,** [S.l.], v. 51, n. 2, p. 509-512, 2015.

LEAL, W. P.; CARREGARO, A. B.; BRESSAN, T. F.; BISETTO, S. P.; MELO, C. F.; SLADKY, K. K. Antinociceptive efficacy of intramuscular administration of morphine sulfate and butorphanol tartrate in tegus (*Salvator merianae*). **American Journal of Veterinary Research,** Schaumburg, v. 78, n. 9, p. 1019-1024, 2017.

LEE, C. R.; MCTAVISH, D.; SORKIN, E. M. Tramadol. a preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in acute and chronic pain states. **Drugs**, [S.l.], v. 46, n. 2, p. 313-340, 1993.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal Models of Nociception. **Pharmacological Reviews,** Bethesda, v. 53, n. 4, p.597-652, 2001.

LI, X.; KEITH JR., D. E.; EVANS, C. J. Multiple opioid receptor-like genes are identified in diverse vertebrate phyla. **Federation of European Biochemical Society,** Cambridge, v. 397, p. 25-29, 1996.

LINTZ, W.; BARTH, H.; OSTERLOH, G.; SCHIMDT-BÖTHELT, E. Bioavailability of enteral tramadol formulations. 1st communication: capsules. **Arzneimittelforschung**, Germany, v. 36, n. 8, p. 1278-1283, 1986.

LINTZ, W.; BEIER, H.; GERLOFF, J. Bioavailability of tramadol after i.m. injection in comparison to i.v. infusion. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, Munchen, v. 37, n. 4, p. 175-183, 1999.

LONGLEY, L. Reptile anesthesia. In: LONGLEY, L. **Anesthesia of exotic pets.** London: Saunders Elsevier, 2008. p. 185-210.

MAHAPATRA, M.; MAHATA, M. S.; MAITI, B. R. Effect of Ambient Temperature on Serotonin, Norepinephrine, and Epinephrine Contents in the Pineal-Paraphyseal Complex of the Soft-Shelled Turtle (Lissemys punctata punctata). **General and Comparative Endocrinology**, [S.l.], v**.** 4, p. 215-220, 1989.

MARTINEZ-JIMENEZ, D.; HERNANDEZ-DIVERS, S. J. Emergency care of reptiles. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice,** [S.l.], v. 10, p. 557-585, 2007.

Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Manual de garantia da qualidade analítica,** Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, 2011.

MEDEIROS, N. C.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; SCHIMDT, E. M. S.; ALVARES, A. A. A.; PATRÍCIO, L. L.; LANGE, R. R.; SOUZA, R. A. M. Efeito do sítio de venopunção nos parâmetros hematológicos em tigre-d'água-americano, *Trachemys scripta elegans*. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** Rio de Janeiro, v. 32, n. 1, p. 37-40, 2012.

MEIER, P.C.; ZUND, R.E. **Statistical methods in analytical chemistry.** New York: John Wiley & Sons, 1993. XX p.

MIOTTO, K.; CHO, A. K.; KHALIL, M. A.; BLANCO, K., SASAKI, J. D.; RAWSON, R. Trends in tramadol: pharmacology, metabolism, and misuse. **Anesthesia and Analgesia**, v. 124, n. 1, p. 44-45, 2017.

MITCHELL, M. A. Therapeutics. In: MADER, D. R. (Ed.). **Reptile medicine and surgery.** 2 ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2006. p. 631-664.

MONTAÑO, R. R.; CUÉLLAR, E.; FITZGERALD, L. A.; SORIA, F; MENDOZA, F.; PEÑA, R.; TELMO DOSAPEY; DEEM, S. L.; NOSS, A. J. Ranging patterns by the red-footed tortoise - Geochelone carbonaria (Testudines: Testudinidae) - in the Bolivian Chaco. **Ecología en Bolivia,** [S.l.], v. 48, n. 1, p. 17-30, 2013.

MOSLEY, C. Pain and nociception in reptiles. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice,**[S.l.], v. 14, p. 45-60, 2011.

MOSLEY, C. A. E. Anesthesia and analgesia in reptiles. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine,** [S.l.], v. 14, n. 4, p. 243–262, 2005.

MOSLEY, C. A. E.; DYSON, D.; SMITH, D. A. The cardiovascular dose-response effects of isoflurane alone and combined with butorphanol in the green iguana (*Iguana iguana*). **Veterinary Anesthesia and Analgesia,** [S.l.], v. 31, p. 64-72, 2004.

MOSLEY, C.A.; DYSON, D.; SMITH, D. A. Minimum alveolar concentration of isoflurane in green iguanas and the effect of butorphanol on minimum alveolar concentration. **Journal of the American Veterinary Medical Association,** Schaumburg, v. 222, n. 11, p. 1559-1564, 2003.

MUIR, W. W. Dor e estresse. In**:** GAYNOR, J.; MUIR, W. W. **Manual de controle da dor em medicina veterinária.** 2 ed. São Paulo: MedVet, 2009. p. 42.

MYERS, D. Tramadol. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine,** [S.l.], v. 14, n. 4, p. 284-287, 2005.

NAGAOKA, E.; MINAMI, K.; UEZONO, Y.; SHIRAISHI, M.; AOYAMA, SHIGMATSU, A. Tramadol has no effect on cortical renal blood flow--despite increased serum catecholamine levels--in anesthetized rats: implications for analgesia in renal insufficiency. **Anesthesia and Analgesia,** [S.l.], v. 94, n. 3, p. 619-625, 2002.

National Research Council (NRC). **Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals**. 1 ed. Washington, DC: The National Academies Press, 2009. p. 2; 62.

NORTON, M. T.; WALSH, M. T. Sea turtle rehabilitation. In: MILLER, E. R.; FOWLER, M. **Fowler's zoo and wild animal medicine.** 7 ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2012. p. 239-246.

NORTON, T. M. Chelonian emergency and critical care. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine,** [S.l.], v. 14, n. 2, p. 106- 130, 2005.

NORTON, T. M.; COX, S.; NELSON, S. E.; KAYLOR, M.; THOMAS, R.; HUPP, A.; SLADKY, K. K. Pharmacokinetics of tramadol and o-desmethyltramadol in Loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine,** Yulee, v.46, n. 2, p. 262–265, 2015.

O'MALLEY, B. General anatomy and physiology of reptiles. In: O'MALLEY, B. **Clinical anatomy and physiology of exotic species**. London: Saunders Elsevier, 2005.

PASCOE, P. J. Opioid analgesics. **Veterinary Clinics Of North America: Small Animal Practice,** [S.l.], v. 30, n. 4, p. 757-772, 2000.

PAUL-MURPHY, J.; ROBERTSON, S. A.; GAYNOR, J. A.; HELLYER, P. W.; WONG, P. L. The need for a cross-species approach to the study of pain in animals. **Journal of the American Veterinary Medical Association,** Schaumburg**,** v. 224, n. 5, p. 692-697, 2004.

POLZONETTI-MAGNI, A.; FACCHINETTI, F.; CARNEVALI, O.; MOSCONI, G.; PESTARINO, M; VALLARINO, M.; CIARGIA, G. Presence and steroidogenetic activity of β-endorphin in the ovary of the lizard, *Podarcis s. sicula* Raf. **Biology of Reproduction**, Oxford**,** v. 50, p. 1059-1065, 1994.

RAFFA, R. B.; FRIDERICHS, E.; REIMANN, W.; SHANK, R. P.; CODD, E. E.; VAUGHT, J. L. Opioid and nonopioid components independently contribute to the mechanism of action of tramadol, an `atypical' opioid analgesic. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,** Bethesda, v. 260, p. 275-285, 1992.

READ, M. R. Evaluation of the use of anesthesia and analgesia in reptiles. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 224, n. 4, p. 547-552, 2004.

RODKEY, E. N.; RIDDELL, R. P. The infancy of infant pain research: the experimental origins of infant pain denial. **The Journal of Pain,** [S.l.], v. 14, n. 4, p. 338-350, 2013.

SCHECHTER, N. L.; ALLAN, D. A.; HANSON, K. Status of pediatric pain control: A comparison of hospital analgesic usage in children and adults. **Pediatrics,** [S.l.], v. 7, p.11-15, 1986.

SCHUMACHER, J. Fluid therapy in reptiles. In: MILLER, E. R.; FOWLER, M. **Fowler's zoo and wild animal medicine.** 6 ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2008. p. 160-165.

SCHUMACHER, J.; YELEN, T. Anesthesia and analgesia. In: MADER, D. R. (Ed.). **Reptile medicine and surgery.** St Louis: Saunders Elsevier, 2006. p. 442–452.

SLADKY, K. K.; MANS, C. Clinical anesthesia in reptiles. **Journal of Exotic Pet Medicine,** [S.l.], v. 21, p. 17-31, 2012.

SLADKY, K. K.; KINNEY, M. E.; JOHNSON, S. M. Effects of opioid receptor activation on thermal antinociception in red-eared slider turtles (*Trachemys scripta)*. **American Journal of Veterinary Research,** Schaumburg, v. 70, n. 9, p. 1072-1078, 2009.

SLADKY, K. K.; KINNEY, M. E.; JOHNSON, S. M. Analgesic efficacy of butorphanol and morphine in bearded dragons and corn snakes. **Journal of the American Veterinary Medical Association,** Schaumburg, v. 233, p. 267-273, 2008.

SLADKY, K. K.; MILETIC, V.; PAUL-MURPHY, J.; KINNEY, M. E.; DALLWIG, R. K.; JOHNSON, S. M. Analgesic efficacy and respiratory effects of butorphanol and morphine in turtles. **Journal of the American Veterinary Medical Association,** Schaumburg, v. 230, n. 9, p. 1356-1362, 2007.

SOUSA, A. B.; SANTOS, A. C. D.; SCHRAMM, S. G.; PORTA, V.; GÓRNIAK, S. L.; FLÓRIO, J. C.; SPINOSA, H. S. Pharmacokinetics of tramadol and o-desmethyltramadol in goats after intrcanous and oral administration. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics,** [S.l.], v. 31, p. 45–51, 2007.

SOUZA, L. F. Uma revisão sobre padrões de atividade, reprodução e alimentação de cágados brasileiros (Testudines, Chelidae). **Phyllomedusa,** [S.l.], v. 3, n. 1, p. 15-27, 2004.

SOUZA, J. M.; GREENACRE, C. B.; COX, C. K. Pharmacokinetics of orally administered tramadol in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **American Journal of Veterinary Research,** Schaumburg, v. 69, n. 8, p. 979-982, 2008.

SOUZA, M. J.; COX, S. K. Tramadol use in zoologic medicine. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice,** [S.l.], v. 14, p. 117-130, 2011.

STACY, N. I.; ALLEMANN, A. R.; SAYLER, K. A. Diagnostic hematology of reptiles**. Clinics in Laboratory Medicine,** [S.l.], p. 87–108, 2011.

STEINBECK, J. **The Grapes of Wrath**. 1st edition. New York: Viking Press, 1939.

STOLL, A. M.; GREENE, L. C. Relationship between pain and tissue damage due to thermal radiation. **Journal Of Applied Physiology.** Bethesa, v. 14, n. 3, p. 373-382, 1959.

SYKES, J. M.; GREENACRE, C. B. Techniques for drug delivery in reptiles and amphibians. **Journal of Exotic Pet Medicine**, [S.l.], v. 15, n. 3, p. 210-217, 2006

TOUTAIN, P. L.; LEES, P. Integration and modelling of pharmacokinetic and pharmacodynamic data to optimize dosage regimens in veterinary medicine. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics,** [S.l.], v. 27, p. 467-477, 2004.

TOZER, T. N.; ROWLAND, M. **Introdução à farmacocinética e à farmacodinâmica: as bases quantitativas da terapia farmacológica**. Tradução de Eduardo Celia Palma; Helen Pedroni; Teresa Dalla Costa.1a ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TUTTLE, A. D.; PAPICH, M. S.; LEWBART, G. A.; CHRISTIAN, S.; GUNKEL, C.; HARMS, C. A. Pharmacokinetics of ketoprofen in the green iguana (*iguana iguana*) following single intravenous and intramuscular injections. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine,** Yulee, v. 37, n. 4, p. 567-570, 2006.

UETZ, P.; FREED, P; HOŠEK, J. **The Reptile Database**. Acessado em 25 de janeiro de 2018. www.reptile-database.org.

VAN DEN HEUVEL, M. W. J. **Repeated measurement comparison of different protocols for anesthesia and analgesia consisting of Alfaxalone, Meloxicam, and Butorphanol or Tramadol IM in Leopard Geckos (*Eublepharis macularius*).**

2017. 15 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Utrecht, Ultrecht, 2017.

VAZZANA, M.; ANDREANI, T.; FANGUEIRO, J.; FAGGIO, C.; SILVA, C.; SANTINI, A.; GARCIA, M. L.; SILVA, A.M.; SOUTO, E. B. Tramadol hydrochloride: pharmacokinetics, pharmacodynamics, adverse side effects, co-administration of drugs and new drug delivery systems. **Biomedicine & Pharmacotherapy,** [S.l.], v. 70, p.234-238, 2015**.**

VINKE, S.; VETTER, H.; VINKE, T.; VETTER, S. South American Tortoises**.** **Chelonian Library.** Germany: Edition Chimera*, v.3,* p. 27-29, 2008.

VOGT, R.C. **Tartarugas da Amazônia.** 1ª ed. INPA - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2008.

VOGT, R. C.; FAGUNDES, C. K.; BATAUS, Y. S. L.; BALESTRA, R. A. M.; BATISTA, F. R. W.; UHLIG, V. M.; SILVEIRA, A. L.; BAGER, A.; BATISTELLA, A. M.; SOUZA, F. L.; DRUMMOND, G. M.; REIS, I. J.; BERNHARD, R.; MENDONÇA, S. H. S. T.; LUZ, V. L. F. **Avaliação do Risco de Extinção de *Chelonoidis carbonaria* (Spix, 1824) no Brasil.** Processo de avaliação do risco de extinção da fauna brasileira. 2015. Disponível em: http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/estado-de-conservacao/7399-repteis-chelonoidis-carbonaria-jabuti-piranga.html> Acesso em: 25 jan 2018.

XIA, Y.; HADDAD, G. G. Major difference in the expression of δ- and G μ-opioid receptors between turtle and rat brain. **The Journal of Comparative Neurology,** [S.l.], v. 436, p. 202-210, 2001.

WEESE, A. O. An experimental study of the reactions of the horned lizard *Phrynosoma modestum* Gir, a reptile of the semi-arid desert. **The Biological Bulletin**, v. 32, p. 98-116, 1917.

WU, W. N.; MCKOWN, L. A.; GAUTHIER, A. D.; JONES. W. J.; RAFFA, R. B. Metabolism of the analgesic drug, tramadol hydrochloride, in rats and dogs. **Xenobiotica**, [S.l.], v. 31, p. 423-441, 2001.

WU, W. N.; MCKOWN, L. A.; LIAO, S. Metabolism of the analgesic drug ULTRAM 1 (tramadol hydrochloride) in humans: API-MS and MS/MS characterization of metabolites. **Xenobiotica**, [S.l.], v. 32, n. 5, p. 411- 425, 2002.

WYNEKEN, J.; MADER, D. Review: reptilian dermatology. **Proceedings Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians.** Milwalkee, WI, p. 83-87, 2009.

WANBUGU, S. N.; TOWETT, P. K.; KIAMA, S. G.; ABELSON, K. S. P.; KANUI, T. I. Effects of opioids in the formalin test in the Speke's hinged tortoise (*Kinixy's spekii).* **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics,** [S.l.], v. 33, v. 4, p. 347-351, 2010.