

**UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO**  
**Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde**

**JULIANA ZAMPOLI BOAVA PAPINI**

**AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA - FARMACODINÂMICA DE TRAMADOL EM  
FORMULAÇÕES DE POLOXAMERS**

Bragança Paulista  
2017

**JULIANA ZAMPOLI BOAVA PAPINI – R.A. 001201302049**

**AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA - FARMACODINÂMICA DE TRAMADOL EM  
FORMULAÇÕES DE POLOXAMERS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

**Área de Concentração:** Farmacologia

**Orientador:** Profa. Dra. Giovana Tofóli

Bragança Paulista  
2017

QV 40 Papini, Juliana Zampoli Boava

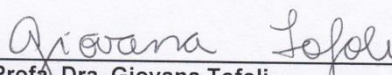
P234a Avaliação farmacocinética - farmacodinâmica de  
tramadol em formulações de poloxamers / Juliana  
Zampoli Boava Papini. -- Bragança Paulista, 2017.

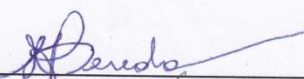
69 p.

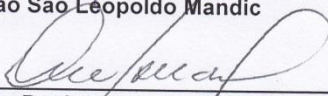
Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação  
*Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade

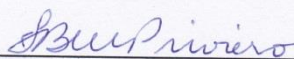
Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de  
Processamento Técnico da Universidade São Francisco.


PAPINI, B. Z., Juliana, "Avaliação Farmacocinética – Farmacodinâmica de Tramadol em Formulações com Polaxamers" Tese defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 22 de Fevereiro de 2017 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

  
\_\_\_\_\_  
Profª. Dra. Giovana Tofoli  
Instituição São Leopoldo Mandic

  
\_\_\_\_\_  
Profª. Dra. Cíntia Maria Saia Cereda  
Instituição São Leopoldo Mandic

  
\_\_\_\_\_  
Profª. Dra. Denise Gonçalves Priolli  
Universidade São Francisco

  
\_\_\_\_\_  
Profª. Dra. Fernanda Bruschi Marinho Priviero  
Universidade São Francisco

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Lucas Novaes Teixeira  
Instituição São Leopoldo Mandic

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais e familiares que me incentivam e motivam à sempre estudar.

## AGRADECIMENTOS

A todos que me ajudaram a construir esse trabalho, carinhosamente obrigada, em especial: Agradeço a Deus pelas oportunidades á mim concedidas, diante de todas: força para lutar pela vida.

Este estudo foi desenvolvido em colaboração com a pesquisadora Dra. Daniele Ribeiro de Araújo e sua equipe da Universidade Federal do ABC, agradeço pela gentileza das formulações concedidas para este estudo.

Em especial agradeço imensamente á Profa. Dra. Giovana Tofoli por ter me aceitado como sua aluna, e ter depositado sua confiança para o desenvolvimento deste trabalho, sou grata por ter me ajudado e orientado nesta caminhada.

Em especial a Universidade São Francisco pelo espaço cedido e os equipamentos utilizados para que fosse possível o desenvolvimento do trabalho proposto. À Profa. Dra. Silvana Aparecida Calafatti pelas análises das amostras coletadas da Universidade São Francisco (Unifag).

A todos os funcionários que colaboraram de alguma forma com meu trabalho.

Aos amigos de laboratório de pesquisa Ana Érika, Greiciely de Oliveira, Thaisy Pacheco e a Carolina Rennó, da Universidade São Francisco.

Ás Doutoradas Denise Gonçalves Prioli, Cíntia Maria Saia Cereda, Silvana Aparecida Calafatti e a Fernanda Bruschi Marinho Priviero que compuseram esta banca, contribuindo para o enriquecimento deste trabalho.

Aos colaboradores dos laboratórios de pesquisa da Faculdade São Leopoldo Mandic.

Ao apoio financeiro da agência FAPESP- Ref.: Proc. n°: 2012/16822-7; Ref.: Proc. n°: 2015/20744-0 e á Capes.

## **EPÍGRAFE**

“Que os vossos esforços desafiem as  
impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes  
coisas do homem foram conquistadas do que parecia  
impossível.”

Charles Chaplin

## RESUMO

Tramadol (TR) é um analgésico opióide utilizado para controle de dor aguda e crônica. Este analgésico apresenta curta duração de ação, assim doses repetidas ou infusão venosa contínua são necessárias para prolongar seu efeito. Apesar de sua curta duração de ação, TR é uma opção interessante quando comparado com outros opióides, pois produz efeitos adversos leves. Devido a estas propriedades, TR foi selecionado para o desenvolvimento de um novo sistema de liberação modificada com géis poliméricos termorreversíveis de poloxamers (PL). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar e correlacionar o perfil farmacocinético e farmacodinâmico do TR associado à diferentes combinações de PL em coelhos após a injeção subcutânea. Os sistemas PL-TR foram preparados através de dispersão direta do fármaco (20 mg.mL) em soluções com PL 407 (Lutrol® F 127, BASF) e PL 188 (Lutrol® F68, BASF). As formulações utilizadas foram: F1- TR 2% em solução aquosa; F2- PL 407 (20%) + PL 188 (10%) + TR 2%; F3- PL 407 (25%) + PL 188 (5%) + TR 2%; F4- PL 407 (20%) + TR 2%. Foram utilizados 24 coelhos (Nova Zelândia), divididos em 4 grupos (n=6), que receberam F1, F2, F3 ou F4 por via subcutânea (10 µg.kg<sup>-1</sup>). Amostras de sangue (1 mL) foram coletadas após 0, 15, 30, 45,60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420 e 480 minutos da injeção das formulações. As concentrações plasmáticas de TR e O-desmetil-tramadol (M1) foram determinadas por espectrometria de massas (LC-MS/MS). Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados como o programa WinNonlin 5.3 (Pharsight Corporation, CA, US). A avaliação farmacodinâmica foi feita com a medida dos diâmetros pupilares avaliados com um paquímetro nos mesmos tempos de coleta de sangue. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância para medidas repetidas ou análise de variância e comparação pelo teste de Tuckey-Kramer (post-hoc), com nível de significância 5%. As concentrações plasmáticas de TR e M1 foram correlacionadas com os diâmetros pupilares obtidos nos coelhos (Pearson). F2 apresentou maiores concentrações de TR após 180 minutos quando comparado com as outras formulações (p<0,05). Áreas sob a curva (ASC) e clearance obtidas com F2 apresentaram diferenças entre as formulações F1 e F4 (p<0,05). Os valores de CL de F1 foram aproximadamente duas vezes maiores que os obtidos com F2 (p<0,05). Houve correlação significativa (p<0,05) entre a diminuição dos diâmetros pupilares e as concentrações de tramadol e M1 obtidas com a Formulação F2 (p<0,05). Assim, diante dos resultados obtidos, podemos concluir que F2 apresentou perfil farmacocinético característico de liberação sustentada que influenciou uma resposta farmacodinâmica mais favorável que as outras formulações. A formulação F2 aumentou a biodisponibilidade de TR e promoveu efeito biológico mais intenso.

**PALAVRAS CHAVE: Opióide, tramadol, poloxamers, “drug –delivery”.**



## ABSTRACT

Tramadol (TR) is an opioid analgesic widely used for acute and chronic pain. This opioid presents short duration of action and it is necessary repeated doses or continuous infusion for a prolonged analgesic action. Despite the short duration of action, TR may be valuable when compared to other opioids, as it produces mild adverse effects. Due to these properties, TR was selected for the development of a new drug-delivery system formulation with thermoreversible poloxamers (PL). Thus, the purpose of this study was to evaluate the pre-clinical pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD) induced by these new formulations of TR in thermoreversible gels. The poloxamer-tramadol systems were prepared by direct dispersion of the drug (20 mg/mL) in solutions with PL 407 (Lutrol® F 127, BASF), PL 188 (Lutrol® F68, BASF). The formulations used in this study were: F1- TR 2% in aqueous solution; F2- PL 407 (20%) + PL 188 (10%) + TR 2%; F3- PL 407 (25%) + PL 188 (5%) + TR 2%; F4- PL 407 (18.5%) + PL 403 (1.5%) + TR 2%; F5- PL 407 (20%) + TR 2%. New Zealand White rabbits (2500-3000g) were divided in four groups (n=6) and treated by subcutaneous route with F1, F2, F3 or F4 (10 µg.kg<sup>-1</sup>). Blood samples (1 mL) from an ear vein were collected pre dose (0 min) and at 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420 and 480 minutes after the injection of formulations. TR plasma levels were determined using a mass spectrometer (LC-MS/MS). The PK parameters were calculated using WinNonlin software version 5.3 (Pharsight Corporation, CA, US.). PD evaluation was performed with the measurement of both pupils' diameters using calipers in the same periods of blood collection. Data were submitted to statistical (ANOVA/Tukey-Kramer, p<0.05) analysis. TR and M1 plasma levels were correlated (Pearson correlation) with pupils diameter. F2 showed higher TR plasma than all other formulations after 180 minutes and presented lower M1 concentrations at almost all evaluated periods (p<0.05). Areas under the curve (ASC<sub>0-480</sub> e ASC<sub>0-∞</sub>) and clearance of F2 presented differences compared to F1 (p<0.05). F2 presented significant correlation (Pearson correlation) between the enhancement of TR and M1 concentrations and the decrease of pupil size (miosis) (p<0.05). Thus, the association of PL 407 (20%) and PL188 (10%) in F2 was effective to alter pharmacokinetics and pharmacodynamics effects of TR, since this formulation was effective to enhance the bioavailability and this effect was correlated with a more intense biologic effect.

**Keywords: opioid, tramadol, poloxamer and drug –delivery.**

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Opióides e sua seletividade por diferentes receptores opióide.....	<b>26</b>
<b>TABLE 1:</b> $t_{1/2}$ , $C_{max}$ , $AUC_{0-480}$ , $AUC_{0-\infty}$ , $T_{max}$ , $CL$ , $V_d$ , $MRT$ of TR after the injection (SC) of F1, F2, F3 and F4 in rabbits. Data expressed as mean ( $\pm$ SD) .....	<b>50</b>
<b>TABLE 2:</b> $t_{1/2}$ , $C_{max}$ , $AUC_{0-480}$ , $AUC_{0-\infty}$ , $T_{max}$ , $CL$ , $V_d$ , $MRT$ of M1 after the injection (SC) of F1, F2, F3 and F4 in rabbits. Data expressed as mean ( $\pm$ SD) .....	<b>51</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Vias de processamento fisiológico da dor .....	20
<b>FIGURA 2.</b> Receptor endógeno opióide.....	26
<b>FIGURA 3.</b> Estrutura química do Poloxamer (PEO-PPO-PEO) .....	33
<b>FIGURA 4.</b> Representação esquemática da transição sol-gel de copolímeros termorreversíveis da classe dos Poloxamers.....	34

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>GRAPHIC 1.</b> Time-course (min) after the injection of TR formulations in rabbits	<b>48</b>
<b>GRAPHIC 2.</b> Time-course (min) after the injection of M1 formulations in rabbits.....	<b>49</b>
<b>GRAPHIC 3.</b> Time-course (min) of pupil size after the injection of TR formulations in rabbits. Values are expressed as mean $\pm$ SEM.....	<b>54</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>F1</b>	Tramadol 2%
<b>F2</b>	PL 407 (20%) + PL 188 (10%)
<b>F3</b>	PL 407 (25%) + PL 188 (5%)
<b>F4</b>	PL 407 (20%) + TR 2%
<b>IASP</b>	Associação Internacional para o Estudo da Dor
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>AINEs</b>	Anti-inflamatório
<b>AL</b>	Anestésico local
<b>COX</b>	Ciclooxigenase
<b>AMPc</b>	Adenil-ciclase
<b>TR</b>	Tramadol
<b>IM</b>	Intramuscular
<b>PL</b>	Poloxamers
<b>OE</b>	Óxido de etileno
<b>OP</b>	Óxido de propileno
<b>M1</b>	O-desmetiltramadol
<b>Tsol-gel</b>	Temperatura de transição sol-gel
<b>ASC</b>	Área sob a curva
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>TM</b>	Temperatura de micelinização
<b>FC</b>	Farmacocinética pré-clínica
<b>DP</b>	Farmacodinâmica
<b>CMC</b>	Micelar crítica
<b>GC</b>	Glicocorticoide

<b>SC</b>	Subcutâneo
<b>ORL-1</b>	Opioid receptor like
<b>HLB</b>	Balanços hidrófilos - lipófilos
<b>IL-1</b>	Interleucinas – 1
<b>IL-2</b>	Interleucinas – 2
<b>TNF- <math>\alpha</math></b>	Fator $\alpha$ de necrose tumoral
<b>PGs</b>	Prostaglandinas
<b>NMR</b>	Núcleo magno da rafe
<b>PAG</b>	Substância cinzenta periaquedural
<b>SG</b>	Substância gelatinosa

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1.	Controle da dor.....	16
1.2.	Analgésicos opióides.....	24
1.3.	Tramadol (TR).....	29
1.4.	Hidrogéis termorreversíveis de tramadol .....	32
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
<b>3.</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>38</b>
<b>4.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>5.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>60</b>
<b>6.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>69</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Controle da dor:

A dor nas suas diversas facetas é um fenômeno de extrema complexidade, tanto do ponto de vista fisiológico, quanto psicológico. A Agência Americana de Pesquisa e Qualidade em Saúde Pública e a Sociedade Americana de Dor classificaram a dor como o quinto sinal vital, devendo ser avaliado como um dos sinais vitais como temperatura, pulso, frequência respiratória e pressão arterial (TAMBORELLI et al., 2010). Nos últimos anos foram publicados mais de 110.000 artigos sobre dor, o que representa mais de 40 novos artigos por cada dia. Não se pode negar que as modernas técnicas de neurofisiologia, biologia molecular e imagiologia, possibilitaram numerosos e fundamentais avanços do conhecimento em neurociências, na medicina e no estudo da dor (SINGH et al., 2011).

Segundo a *Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP)*, a dor é definida como uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada ou relacionada à lesão real ou potencial nos tecidos (CARPENTER; DICKENSON, 2002; LOVICH-SAPOLA et al., 2015). A dor é uma resposta adaptativa importante que tem como princípio a retirada e proteção do tecido danificado durante o processo de cicatrização, pode ser considerada como um sintoma ou manifestação de uma doença ou inflamação, mas também pode vir a constituir um quadro clínico mais complexo (GRACE et al., 2015). Porém em alguns casos a sensação dolorosa tem duração maior que a resolução da injúria inicial e perde sua função fisiológica, caracterizando-se como dor crônica. A dor clínica é geralmente definida como dor crônica e neste caso os episódios são contínuos ou recorrentes com duração mínima de três meses (FORNASARI, 2014). Na dor crônica, danos teciduais ou neuronais geram um funcionamento fisiológico anormal do sistema nervoso central (SNC) sendo considerada como um processo patológico (CLARK; MALCANGIO, 2012). A expressão da dor varia não somente de um indivíduo para outro, mas também de acordo com as diferentes culturas. Além de gerar estresses físicos e emocionais para os doentes e para os seus cuidadores, a dor é razão de fardo econômico e social para a sociedade. Neste caso, ocorre sinalização bidirecional entre neurônios e células imunocompetentes do SNC como as células da glia que se proliferam e contribuem para sensibilização central (KRAYCHETE et al., 2016).



A dor pode ser classificada como aguda, crônica e recorrente, de acordo com sua duração (CARPENTER; DICKENSON, 2002; LOVICH-SAPOLA et al., 2015). A dor aguda se manifesta transitoriamente durante um período relativamente curto, de minutos a algumas semanas, associada a lesões em tecidos ou órgãos, ocasionadas por inflamação, infecção, traumatismo ou outras causas. Normalmente desaparece quando a causa é corretamente diagnosticada e quando o tratamento recomendado pelo especialista é seguido corretamente pelo paciente. A dor crônica tem duração prolongada, que pode se estender de vários meses a anos e está quase sempre associada a um processo de doença crônica. A dor crônica pode também pode ser conseqüência de uma lesão já previamente tratada, como a dor ocasionada pela artrite reumatóide, dor do paciente com câncer, dor relacionada a esforços repetitivos durante o trabalho, dor nas costas e outras. A dor recorrente apresenta períodos de curta duração que se repetem com frequência, podendo ocorrer durante toda a vida do indivíduo, mesmo sem estar associada a um processo específico, como a enxaqueca.

O componente fisiológico da dor é chamado de nocicepção, que consiste dos processos de transdução, transmissão e modulação de sinais neurais gerados em resposta a um estímulo nocivo externo. De forma simplificada, pode ser considerado como uma cadeia de três-neurônios, com o neurônio de primeira ordem originado na periferia e projetando-se para a medula espinhal, o neurônio de segunda ordem ascende pela medula espinhal e o neurônio de terceira que ascende para o córtex cerebral. O primeiro processo da nocicepção é a decodificação de sensações mecânica, térmica ou química em impulsos elétricos por terminais nervosos especializados denominados nociceptores. Os nociceptores são terminações nervosas livres dos neurônios de primeira ordem, cuja função é preservar a homeostasia dos tecidos, sinalizando uma injúria potencial ou real (KLAUMANN, 2008).

Os neurônios de primeira ordem são classificados em três grandes grupos, segundo seu diâmetro, seu grau de mielinização e sua velocidade de condução. Fibras A $\alpha$  são fibras de maiores diâmetro, mielinizadas, rápida condução nervosa, dor aguda e rápida, presente na musculatura estriada esquelética. Fibras A $\beta$  são fibras de diâmetro grande, são mielinizadas e de condução rápida, presentes na pele e víceras. Fibras A $\delta$  de diâmetro médio, são mielinizadas, a velocidade de condução é intermediária, modulando a primeira fase da dor, presente na pele, SNC e víceras. Fibras C, fibras de diâmetro pequeno, amielinizadas, de lenta condução nervosa, presente na pele e víceras ocas. Na ausência de dano tecidual ou nervoso, as fibras A $\beta$  somente

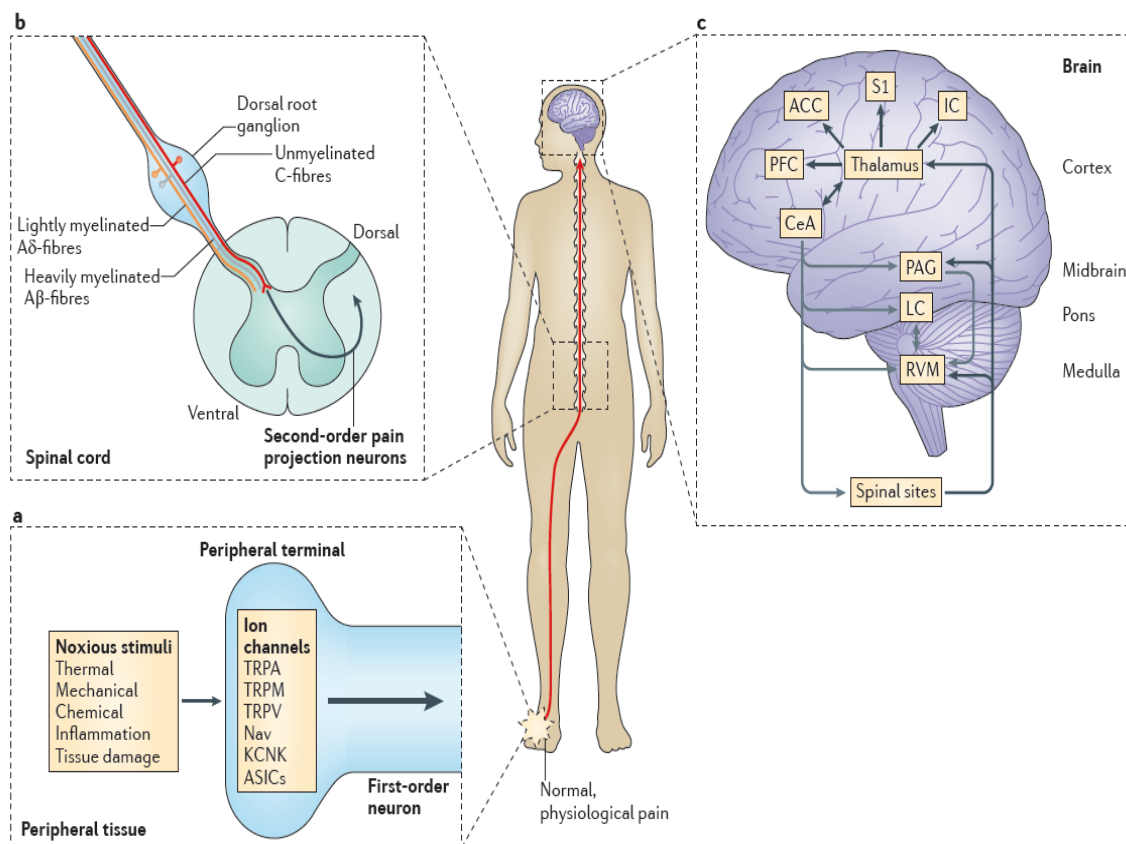
transmitem informação referente a estímulos inócuos, como tato, vibração e pressão. Normalmente, a informação nociceptiva é transmitida por fibras do tipo C e A $\delta$  localizadas na pele, vísceras, vasos sanguíneos, peritônio, pleura, periosteio, tendão, fáscia, cápsula articular e fibras do músculo esquelético (MESSLINGER, 1997; LAMONT et al., 2000; TRANQUILLI, 2000; MUIR et al., 2001). As fibras A $\delta$  são responsáveis pela primeira fase da dor, rápida e forte, do tipo picada são sensíveis a estímulos mecânicos intensos. As fibras C produzem uma segunda fase da dor mais difusa e persistente e formam, na periferia, receptores de alto limiar para estímulos térmicos e/ou mecânicos. Existem também fibras do tipo C polimodais que respondem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos (BESSON, 1997; TRANQUILLI, 2004; PISERA, 2005).

A agressão tecidual resulta no acúmulo de metabólitos do ácido araquidônico. A produção de prostaglandinas e de leucotrienos leva a degranulação de mastócitos e a ativação direta de fibras nervosas, macrófagos e linfócitos. Há liberação de mediadores, como potássio, serotonina, substância P, histamina e cininas. Ocorrem alterações na permeabilidade vascular, no fluxo sanguíneo local e produção dos sinais clássicos inflamatórios de rubor, calor, dor, tumor e impotência funcional. Tem início o processo de sensibilização periférica com conseqüente exacerbação da resposta ao estímulo doloroso (LAI et al., 2002).

Sinais “dolorosos” podem ser amplificados ou diminuídos. Após a estimulação do neurônio primário nociceptivo ocorre geração e condução do estímulo para a medula espinal, passando por vários caminhos até chegar ao córtex cerebral, onde a sensação nociceptiva é detectada e analisada (processo de percepção). O neurônio sensitivo primário faz a sua primeira sinapse no corno posterior da medula e o impulso nervoso sobe pela medula e atinge a parte basal do cérebro, onde faz a segunda sinapse. Os sinais podem se dirigir diretamente para o córtex e também podem estimular o sistema nervoso neuro-vegetativo gerando sudorese, aumento de pressão sanguínea e frequência cardíaca, por exemplo. O estímulo finalmente atinge o córtex, onde acontece a integração da rede neuronal nociceptiva, ocorrendo, então, a percepção e interpretação da dor (KLAUMANN et al., 2008). A interpretação da dor pode ser modulada, os sinais dolorosos podem ser aumentados ou diminuídos pela ação de sistemas inibitórios ascendentes e descendentes. O sistema inibitório descendente da dor consiste em áreas do SNC que se interligam com fibras que partem de sistemas corticais em direção à substância cinzenta periaquedutal (PAG), ricas em encefalinas e receptores opióides e, seguem para áreas do bulbo

rostroventral, especialmente o núcleo magno da rafe (NMR) e os núcleos adjacentes, que, por sua vez, enviam fibras serotoninérgicas e noradrenérgicas, via funículo dorsolateral, para o corno dorsal da medula e o bulbo, terminando principalmente nas lâminas I, II e V, e inibindo os neurônios nociceptivos, interneurônios e tratos ascendentes. Pode-se esperar que o aumento da neurotransmissão de noradrenalina, serotonina e de opióides possa ser eficaz no controle da dor (PIRES, 2010). O sistema inibitório ascendente atua nos cornos posteriores medulares um mecanismo neural que se comporta como uma porta pode controlar a passagem dos impulsos nervosos transmitidos desde as fibras periféricas até o SNC através da atividade das fibras de maior diâmetro ( $A-\alpha$  e  $A-\beta$ ) e menor diâmetro ( $A-\delta$  e C), e também por influências cognitivas. A atividade das fibras grossas estimulam os interneurônios que inibem a transmissão para as fibras finas da dor. (KLAUMANN et al., 2008; PIRES, 2010).

Os sinais nociceptivos são transmitidos da periferia por neurônios sensoriais que estão agrupados aos canais de sódio e canais de potássio. A transdução dos estímulos nocivos é iniciada pela despolarização da membrana através da ativação desses canais iônicos. Os potenciais são conduzidos ao longo dos axônios das fibras  $A\beta$  e C-nociceptivas, através do corpo celular, que formam o elemento pré-sináptico das sinapses centrais da via sensorial para o corno dorsal espinal. Os terminais centrais das fibras  $A\beta$  e C-sinapses com interneurônios e neurônios de projeção nociceptiva de segunda ordem. Os axônios de segunda ordem nociceptiva conduzem o estímulo para um centro de modulação na medula espinhal, através das fibras ascendentes, o estímulo é conduzido para o núcleo de tronco encefálico e talâmico, transferindo informações sobre a intensidade e duração dos estímulos periféricos nocivos. Os neurônios de terceira ordem, na região do tálamo onde ocorre a codificação e a modulação descendente da dor, incluindo a medula ventromedial rostral (Grace et al., 2014). A FIGURA 1 mostra as vias de processamento fisiológico da dor.



**FIGURA 1. Vias de processamento fisiológico da dor** (Retirado de Grace et al., 2014).

Apesar de inúmeras terapias de analgesia, com diferentes medicações (opióides, anti-inflamatórios, barbitúricos e anestésicos locais) (ARAÚJO, 2010; KRAUSE et al., 2016), o controle da dor ainda é um desafio. A maior parte destas modalidades de analgesia apresentam limitações como curta duração de ação, e necessidade de inúmeras administrações (MACINTYRE et al., 2011).

Os anestésicos locais (AL) são classificados como substâncias químicas, capazes de bloquear de forma reversível a transmissão do estímulo nervoso do local de aplicação, inibindo a percepção das sensações, especialmente a dor, e preservando a motilidade e motricidade, sem que ocorram danos ou alterações nos níveis de consciência (KATZUNG, 2007; MASCARENHAS et al., 2011; DE PAULA et al., 2012; VERLINDE et al., 2016). Logo após um estímulo doloroso,

ocorre a abertura rápida dos canais de sódio regulados por voltagem e aumento da condutância do íon  $\text{Na}^+$  através destes canais, despolarizando a membrana neuronal (BEIRANVAND et al., 2016). O AL liga-se a estes canais de sódio e estas ligações impedem a despolarização da membrana neuronal e a propagação do potencial de ação excitatório, o que tem como consequência a paralisação da transmissão do estímulo (GRILLO et al., 2010; PAYANDEL et al., 2012; ISIDORO et al., 2014; CATTERALL; SWANSON, 2015). A maioria dos AL tem ação vasodilatadora, o que aumenta a absorção sistêmica e diminui sua duração de ação. Esta característica diminui sua ação e aumenta sua toxicidade sistêmica, como os AL se ligam aos canais de sódio atuam também no músculo cardíaco e no tecido nervoso, gerando efeitos tóxicos (DRAGOO et al., 2011; WOLFE AND BUTTERWORTH, 2011; KHOSRAVI et al., 2011; SCARPARO et al., 2016). ALs são úteis em bloqueios regionais, na indução de analgesia operatória e/ou pós-operatória, no tratamento da dor aguda e crônica (BECH et al., 2016; HAMILTON et al., 2016; VAN DEN BEUKEN-VAN EVERDINGEN et al., 2016).

Os analgésicos/anti-inflamatórios (anti-inflamatórios não-esteroidais- AINES e glicocorticoides- GC) atuam essencialmente na diminuição da hiperalgesia consequente à liberação de interleucinas, interferons e prostaglandinas. Esses fármacos são úteis no controle da dor de intensidade baixa ou moderada, associada à inflamação ou lesão tecidual (artrites, bursites, cefaléias e dismenorréias).

Estímulos de natureza fisiológica, farmacológica ou patológica, nas membranas celulares, podem ativar receptores de membrana, acoplados a uma proteína G e a partir desta ligação, ativa-se a fosfolipase A2. Faz parte deste complexo ainda, um aumento da concentração de cálcio no meio intracelular. A fosfolipase A2 hidrolisa os fosfolipídios da membrana, liberando o ácido araquidônico. Este ácido é então utilizado como substrato para duas vias enzimáticas, a das cicloxigenases (COX), que desencadeiam a síntese das prostaglandinas (PGS) e dos tromboxanos, e a via das lipoxigenases, responsável pela síntese dos leucotrienos. O local de atividade das COX é um canal hidrofóbico que se encontra associado à membrana. A síntese das PGS inicia-se com as COX catalisando a adição de oxigênio molecular ao ácido araquidônico, formando-se um produto intermediário, a prostaglandina G2 (PGE2). Dois sistemas efetores que atuam a partir da liberação de segundos mensageiros são associados à ação de prostaglandinas. Um é o da adenilato ciclase, cuja ativação estimula a síntese do AMPc (adenosina 3',5'-

monofosfato cíclico). As PGs, ativam a adenilato ciclase aumentando a concentração do AMPc. Outro sistema efetor é o da fosfolipase C, que por ação das PGs, aumenta a formação de diacilglicerol e trifosfato de inositol, resultando na ativação em cascata de proteína quinases, e elevação de cálcio intracelular (PRECLIK, et al., 2008; WELHAM, 2017). As prostaglandinas participam de diversas ações metabólicas, processos fisiológicos e patológicos, vasodilatação ou vasoconstrição, hiperalgesia, contração ou relaxamento da musculatura brônquica e uterina, hipotensão, ovulação, aumento do fluxo sanguíneo renal, proteção da mucosa gástrica e inibição da secreção ácida no estômago, resposta imunológica (inibição da agregação plaquetária), regulação de atividade quimiotática, progressão metastática, função endócrina e outras. As prostaglandinas são ainda produzidas no SNC, em vasos e neurônios, participando dos mecanismos de sono e despertar; recentemente também foram apontados como participantes nos processos de doenças como a esclerose múltipla e o mal de Alzheimer (WELHAM, 2017).

Os AINES atuam através da inibição das enzimas cicloxigenases (COX), impedindo a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, envolvidos no processo inflamatório e na sensibilização dolorosa central e periférica (BAVARESCO, et al., 2005; HAVERY, 2011; WELHAM, 2017). Os AINEs pertencem à classe de medicamentos mais comumente utilizados no tratamento de doenças inflamatórias, uma vez que são eficazes no tratamento da dor, febre (rubor) e edema, sinais que surgem como consequência da liberação dos mediadores inflamatórios (CARVALHO, 1998; FERREIRA, 2002). Esta ação dos AINEs é dose /resposta limitada, ou seja, o aumento na dosagem administrada não proporciona analgesia suplementar, aumentando a incidência de efeitos colaterais (BASSANEZI et al., 2006; BATLOUNI, 2010).

A ação analgésica e antiinflamatória dos glicocorticoides (GCs) ocorre devido à ação inibitória da atividade da fosfolipase A2, enzima responsável pela degradação de ácido araquidônico e consequente produção de prostaglandinas, tromboxano e leucotrienos. Os esteróides antiinflamatórios inibem a fosfolipase A2 indiretamente através da indução da liberação de uma proteína inibitória da fosfolipase. Outro mecanismo de ação dos glicocorticóides é através da ativação de receptores citoplasmáticos para glicocorticóides que regulam a transcrição de alguns genes de resposta primária, incluindo os que expressam uma cicloxigenase (COX-2) e o óxido nítrico sintetase. O complexo esteróide-receptor também é

capaz de promover inibição da transcrição de um grande número de citocinas envolvidas na inflamação crônica, destacando-se principalmente a interleucina-1 (IL-1) e o fator  $\alpha$  de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) (ANTMAN, 2007). Os GC promovem uma repressão da síntese dos receptores das interleucinas-2 (IL-2).

A ação inibitória da liberação de citocinas hiperalgésicas pelos macrófagos e outras células explica a eficácia dos GC no tratamento da distrofia sináptica reflexa e na dor produzida pelo herpes zoster, seja pela administração local, oral ou peridural (PRECLIK et al., 2008). Os glicocorticóides também são utilizados na terapêutica, com várias finalidades, principalmente na terapia de reposição hormonal (problemas no córtex supra-renal), terapias de imunossupressão, terapia antialérgica e antiinflamatória. Nos tratamentos anticâncer, os glicocorticóides, também, têm sido muito utilizados, e associados a outros medicamentos. Inibem manifestações tanto iniciais quanto tardias da inflamação, isto é, não apenas a vermelhidão, o calor, a dor e o edema iniciais, mas também os estágios posteriores de cicatrização e reparo de feridas na inflamação crônica. Este fármaco possui atividade sobre todos os tipos de reações inflamatórias, sejam elas causadas por patógenos, por estímulos químicos ou físicos ou na doença auto-imune. Seu uso também é aplicado para suprimir a rejeição de enxertos, os glicocorticóides suprimem o desencadeamento e a produção de uma nova resposta imune mais efetiva do que uma resposta já estabelecida, na qual já ocorreu proliferação clonal (BAVARESCO et al., 2005).

Apesar de serem ferramentas terapêuticas úteis, os GC apresentam efeitos adversos, como ganho de peso, acúmulo de gordura principalmente em região abdominal, baixa imunidade, aumento da pressão arterial, fraqueza muscular, (LONGUI, 2007) o que limita seu uso (CAMPAGNOLO, 2008). Estes efeitos adversos ocorrem pela interferência dos GCs no metabolismo geral do organismo, estes são capazes de reduzir a captação e utilização da glicose e aumentar a gliconeogênese, desencadeando aumento de glicemia, com conseqüente glicosúria, além de aumentar o catabolismo e reduzir o anabolismo protéico. Outros efeitos adversos da terapia com glicocorticóides são a redução da absorção de cálcio no trato gastrointestinal e o aumento da excreção deste cátion pelos rins, podendo contribuir para que ocorra a osteoporose. Alteram o metabolismo e a redistribuição das gorduras, característica da síndrome de Cushing, um freqüente efeito adverso da terapia com glicocorticóides (PUNCHARD, 2004; BAVARESCO et al., 2005).

## 1.2 Analgésicos opióides

Os opiáceos são substâncias obtidas do ópio, a partir do suco extraído da planta *Papaver Somniferum*. Podem ser classificados como: opiáceos naturais (quando não sofrem nenhuma modificação como a morfina, codeína), opiáceos semi-sintéticos (quando são resultantes de modificações parciais das substâncias naturais (como a heroína) ou opióides quando são totalmente sintéticas. Todas elas têm um efeito analgésico e um efeito hipnótico (MANCHIKANTI et al., 2011). Por ter estes dois efeitos estes fármacos também são chamados de narcóticos. Podem ser administrados por via oral, ou ainda são usados por injeção intramuscular, intravenosa ou peridural. As formas injetáveis são de uso restrito hospitalar (SINGH et al., 2011). Estes fármacos, também podem ser classificados como: agonistas opióides puros (morfina, heroína e a codeína), agonistas parciais (nalorfina e levalorfan) e antagonistas opióides (naloxona) (KIMURA et al., 2012; SZKUTNIK-FIEDLER et al., 2014).

Os analgésicos opióides exercem seu efeito terapêutico através da ligação com receptores opióides. Desde sua identificação, diversas denominações foram utilizadas para os receptores opióides. A nomenclatura atual, aprovada pela “União Internacional de Farmacologia”, para a identificação dos receptores opióide é a seguinte, MOP (receptor peptídico opióide mu), KOP (receptor peptídico opióide kappa), DOP (receptor peptídico opióide delta) e NOP (receptor peptídico FQ de nociceptinas orfanina). O receptor sigma não preenche todos os critérios para ser considerado um receptor opióide, por isso, atualmente não pertence a essa classe. Existem diversos subtipos de receptores opióides, sendo dois MOP, três KOP e dois DOP (NAKAMURA et al., 2005).

Opióides naturais são encontrados em plantas (morfina) ou produzidos pelo corpo humano (opióides endógenos). Esses opióides endógenos são peptídeos que apresentam diferentes potências e afinidades para cada grupo de receptores opióides. Suas ações incluem a modulação da dor e controle do sistema cardiovascular, principalmente em situações críticas. Embora a compreensão de sua farmacologia seja importante, os opióides endógenos não possuem destaque clínico (MINAMI et al., 2015). Opióides sintéticos e semi-sintéticos são amplamente utilizados na prática clínica, especialmente pela sua ação analgésica. Os peptídeos opióides endógenos e os



fármacos derivados de opióides apresentam diferentes afinidades com os diferentes tipos de receptores opióides de acordo com a TABELA 1 (LEPPERT, 2011).

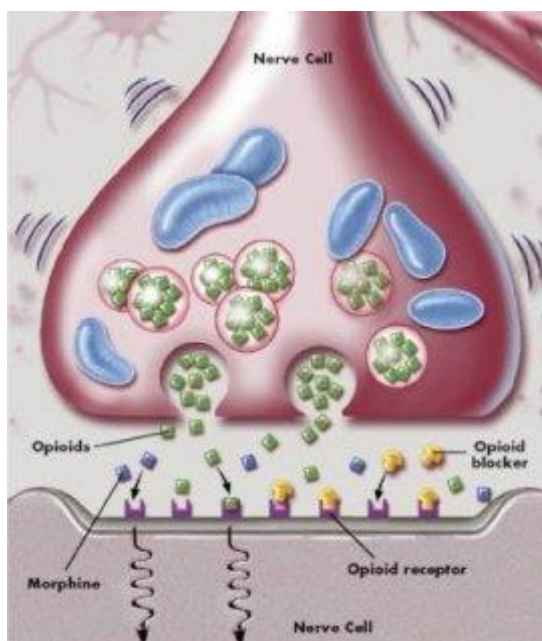
**TABELA 1:** Opióides e sua seletividade por diferentes receptores opióide.

<b>OPIÓIDES</b>	<b>MOP</b>	<b>KOP</b>	<b>DOP</b>	<b>NOP</b>
<b>Endógeno</b>				
Beta-endorfina	+++	+++	+++	-
Encefalina	+	-	+++	-
Dinorfina A e B	++	+++	++	-
Nociceptina/orfanina FQ	-	-	-	+++
<b>Drogas Clínicas</b>				
<b>Agonistas</b>				
Morfina	+++	+	+	-
Petidina	+++	++	-	-
Dimorfina	+++	++	-	-
Fentanil	+++	+	-	-
<b>Agonistas parciais</b>				
Buprenorfina	+++	+	-	-
Pentazocina	-	++	-	-
<b>Antagonistas</b>				
Naloxone	+++	++	++	-
Naltrexone	+++	++	++	-

+ baixa afinidade; ++ afinidade moderada; +++ alta afinidade; - ausência de afinidade (SATOY; MINAMI, 1995; MARTINS et al., 2012).

Os opióides são os medicamentos mais prescritos para tratamento de dor de intensidade moderada a severa, seu uso é bem aceito em casos de dor aguda e dor crônica (MANCHIKANTI et al., 2011; DAVIS; MEHTA, 2016). Os analgésicos opióides exercem seu efeito terapêutico mimetizando a ação de peptídeos opióides endógenos (encefalinas, dinorfinas e  $\beta$ -endorfinas) sobre receptores opióides ligados à proteína G inibitória, estão presentes em tecidos como

musculatura lisa, sistema nervoso periférico e em diversas áreas do sistema nervoso central (medula espinal, núcleo caudado e amígdala), que modulam as atividades sensitivas, motoras e psíquicas (SATOH; MINAMI, 1995). O mecanismo de analgesia consiste na ligação da proteína G acoplada ao recetor. Esta ligação induz a inibição da ação da adenilciclase inibindo a síntese de ATP ciclico intracelular, e por isso aumenta a condutância do potássio para dentro da célula levando à inativação dos canais de cálcio. Estas ações resultam na redução da libertação de neurotransmissores, conforme ilustrado na FIGURA 2 (PRZEWLOCKI, R. 2001).



**FIGURA 2. Receptor endógeno opióide.** (Retirado MULLER, JACOBSON, 2011).

A analgesia é uma consequência de ações diferentes que ocorrem no SNC e periférico. A ação de fármacos opióides, inibe a transmissão nociceptiva na medula espinal, por atuarem nas terminações pré-sinápticas, impedindo a liberação de neurotransmissores excitatórios. Além disso, os analgésicos opióides modulam a liberação de dopamina nos núcleos da base e tronco encefálico, ativam o sistema inibitório rostrocaudal (que modula a aferência nociceptiva na medula espinal), bem como modificam as reações emocionais e os processos cognitivos relacionados à dor no sistema límbico e no córtex cerebral (EGUCHI, 2004).

A administração de fármacos opióides é útil para tratamento de diferentes condições dolorosas como no controle paliativo de dor de neoplasias, dores agudas pós-operatórias, traumatismos, queimaduras ou crises agudas de doenças crônicas de origem benignas (hérnias disciais, artroses, artrites, fibromialgia, bursites) (STOICEA, 2015; SACHAEFE, 2016; YESILYURT, 2016). As dores neuropáticas podem ser resistentes, porém os pacientes referem discreta redução na intensidade e melhora em relação ao desconforto gerado pela dor, o alívio da dor pode ocasionar o sono (CARACENI et al., 2012). Apesar de serem ferramentas úteis para o controle de dor, os efeitos adversos desta classe de medicamentos podem limitar o seu uso.

Os efeitos adversos mais comuns induzidos por analgésicos opióides são desconfortos gastrintestinais (como êmese), depressão respiratória, tolerância e dependência (SMITH; MEEK, 2011). Além disso, o uso crônico de opióides (por mais de 03 meses) promove sérios efeitos adversos como dependência, depressão, diminuição da capacidade cognitiva, hipogonadismo central, desordens de respiração durante o sono, infecções e diminuição da capacidade de cicatrização (DAVIS; MEHTA, 2016).

A tolerância e dependência ocorrem pelo aumento da atividade da adenilato ciclase no SNC, o que compensa seu efeito inibitório agudo sobre a formação de AMPc e produz um efeito de rebote de aumento desta substância. A administração prolongada de opióide aumenta a quantidade, não somente da adenilato ciclase como também de outros mecanismos de sinalização como, proteína G e canais iônicos. Desta forma, o uso de opióides, é acompanhado de efeitos de tolerância e dependência do fármaco (DAHLMAN, 2011).

No sistema respiratório pode ocorrer depressão respiratória mediada pelos receptores MOP localizados no centro respiratório do tronco cerebral. Ocorre a diminuição na frequência respiratória e a dessensibilização dos quimiorreceptores centrais às alterações de pressão parcial de dióxido de carbono. Os quimiorreceptores periféricos mantêm sua sensibilidade à hipoxemia, (SATO; MINAMI, 1995). Supressão do reflexo da tosse. Morfina e diamorfina são utilizadas no tratamento da dispnéia paroxística noturna por causarem sedação, reduzirem a pré-carga e reduzirem o drive respiratório anormal. A codeína suprime a tosse tanto quanto a morfina, porém possui menor potência analgésica (CHOY et al., 2011).

No sistema gastrointestinal o aumento do tônus da musculatura lisa e redução da motilidade, resultam em retardo na absorção, aumento da pressão no sistema biliar (espasmo do esfíncter de Oddi) e constipação. Além disso, a ativação de receptores opióides localizados na zona quimiorreceptora de gatilho bulbar pode desencadear náuseas e vômitos. Os efeitos no sistema endócrino incluem a inibição da secreção de ACTH, prolactina e hormônios gonadotróficos, além do aumento na secreção de ADH (GROND; SABLLOTZKI, 2004).

No sistema cardiovascular podem apresentar discreta bradicardia pela redução do tônus simpático e efeito direto sobre o nó sinoatrial, vasodilatação periférica causada pela liberação de histamina e redução do tônus simpático que pode levar à hipotensão, principalmente em casos de hipovolemia (FODA et al., 2011).

Efeitos oftalmológicos a estimulação do núcleo do nervo oculomotor mediada pelos receptores MOP e KOP leva à miose. Alguns opióides desencadeiam a liberação de histamina por mastócitos resultando em urticária, prurido, broncoespasmo e hipotensão. O prurido, que se manifesta principalmente em face, nariz e dorso, é um sintoma mediado pelo SNC e sua incidência aumenta quando opióides são administrados por via intratecal. Altas doses de opióide podem ocasionar rigidez muscular generalizada, especialmente na musculatura da parede torácica o que pode interferir na ventilação (MINAMI et al., 2015).

Os opióides possuem diferentes propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, portanto a utilização dessas drogas deve ser individualizada. Em solução, os opióides se dissociam em fração ionizada e não ionizada em proporção dependente do pH do meio e do pKa do opióide. A fração não ionizada é mais difusível que a ionizada. Em meios ácidos, como o estômago, os opióides apresentam alto grau de ionização e baixa absorção. Em contrapartida, em meios básicos, como intestino delgado, ocorre predomínio da forma não ionizada dos opióides e alta absorção. Porém, muitos opióides sofrem metabolismo de primeira passagem hepática e intestinal, resultando em baixa biodisponibilidade oral (FORNASARI, 2014). A elevada lipossolubilidade dos opióides facilita a sua disponibilidade para a biofase (sítio efetivo), assim quanto maior a lipossolubilidade, mais rápido o início de ação. Drogas com elevada lipossolubilidade, maior fração não ionizada (baixo pKa) e baixo grau de ligação protéica apresentam maior volume de distribuição (SATO; MINAMI, 1995). A maioria dos opióides

apresenta volume de distribuição muito acima do volume de água corporal. O breve efeito de baixas doses endovenosas de opióides de curta duração (alfentanil, fentanil, sufentanil) se deve à rápida redistribuição da droga, que leva à queda da concentração plasmática e cerebral a níveis abaixo do seu limiar de ação. Maiores doses de opióides produzem ação prolongada no organismo porque, mesmo após a redistribuição da droga, os níveis plasmáticos são mantidos acima do limiar de ação da droga e somente após o processo de metabolização e eliminação os efeitos serão reduzidos. Os opióides são metabolizados no fígado em metabólitos ativos e inativos que são excretados na urina e bile. Alguns opióides, como a morfina, são excretados em parte pela bile, pois são glucoronídeos hidrossolúveis. A flora intestinal metaboliza esses glucoronídeos em compostos que podem ser reabsorvidos e direcionados para a circulação entero-hepática. Os opióides com alta lipossolubilidade, como o fentanil, podem então se difundir para o estômago onde o baixo pH leva ao aumento da concentração da fração iônica (DUARTE, 2005). Mais tarde, esse opióide pode ser reabsorvido para a circulação e haverá um segundo pico de ação. Alguns opióides podem sofrer metabolização extra-hepática, como a morfina que também é conjugada pelos rins e o remifentanil que é metabolizado pelas esterases plasmáticas e teciduais. O tempo de ação dos opióides é variável, porém essas variações não podem ser justificadas apenas pelo clearance e meia vida destas drogas (MINAMI, 2015).

### **1.3 Tramadol (TR)**

Embora não seja um analgésico opióide novo, o tramadol tem sido redescoberto na terapia tanto da dor aguda quanto crônica devido ao seu mecanismo de ação particular, que associa analgesia eficaz (porém de curta duração) e baixa incidência de efeitos adversos em relação aos analgésicos opióides clássicos, como a morfina e fentanil (DOS SANTOS et al., 2015). O tramadol é utilizado com frequência para tratar dor aguda e crônica, como dor pós-operatória e oncológica e dor de intensidade moderada e severa (KIMURA et al., 2012; SZKUTNIK-FIEDLER et al., 2014).

O cloridrato de tramadol (TR) é um opióide sintético, análogo 4-fenil piperidina sintético da codeína do grupo aminociclohexano e os seus efeitos analgésicos são resultantes de um mecanismo de ação atípico quando comparado aos outros fármacos da classe. O TR apresenta afinidade moderada por receptores  $\mu$  e fraca afinidade por receptores  $\kappa$  e  $\delta$ . Este analgésico é considerado um agonista opióide relativamente fraco, apresentando afinidade por

receptores  $\mu$  10 vezes menor que a da codeína e 6000 vezes menor que a da morfina. O metabolito ativo do tramadol M1 (O-desmetil tramadol) apresenta afinidade de ligação com o receptor  $\mu$  300 vezes maior que o composto original, no entanto, esta afinidade ainda é bem menor que a apresentada pela morfina. Além disso, o TR aumenta o limiar de dor e é parcialmente bloqueado por naloxana ao contrário de outros compostos da classe. Assim, a ativação de receptores opióides parece ser somente um dos componentes do mecanismo de ação do TR (MINAMI, 2007).

O analgésico opióide TR é um fármaco de ação central que possui propriedades agonista opióide além de inibição da recaptção de serotonina e noradrenalina, bloqueando as aferências nociceptivas medulares, promovendo contribuição significativa à ação analgésica dessa droga. A inibição da recaptção da noradrenalina liberada (Captação 1) realizada pelo TR aumenta os efeitos da atividade nervosa simpática e da noradrenalina circulante (SOUSA, 2008; SANTOS, 2010). A atuação na recaptção de serotonina e noradrenalina são responsáveis, pelo segundo mecanismo de ação analgésico deste opióide, ou seja, seu efeito no sistema inibitório descendente (SANTOS, 2010; LEPPERT, 2011; TAKHTFOOLADI, 2015).

As ações do tramadol nos receptores opióides  $\mu$  e sobre as monoaminas são sinérgicas no efeito analgésico. Tem sido observado em estudos clínicos que o TR é uma mistura racêmica que atua de maneira sinérgica para promover analgesia sem que ocorra o aumento dos efeitos adversos, (-) TR inibe mais eficientemente a recaptção de noradrenalina, enquanto que o (+) TR inibe preferencialmente a recaptção de serotonina. Apesar da ligação com receptores opióides e seu efeito na recaptção de serotonina e noradrenalina estarem bem definidos (SANTOS, 2010; TAKHTFOOLADI, 2015), o TR ainda exerce seu efeito através da ligação com diversos receptores acoplados à proteína G, inibem adenilciclase e reduzem AMPc, promovem a abertura dos canais de  $K^+$  e inibem os de canais iônicos de Ca na membrana, diminuindo assim atividade neuronal ou aumentam quando inibem sistemas inibitórios, diminuem liberação de neurotransmissores. O efeito analgésico do tramadol também é influenciado por sua ação em receptores  $\alpha_2$ - adrenérgicos, receptores de 5-HT e receptores de adenosina A1, receptores nicotínicos e receptores NMDAR (MINAMI et al., 2015). Além disso, estudos clínicos relatam que TR possui efeito anestésico local quando administrado por via subcutânea, diminuindo a dor da administração do propofol e aumentando efetivamente o tempo de bloqueio do plexo braquial quando adicionado ao anestésico local que pode ter sua dose diminuída (SANTOS, 2008).

Mesmo com estas diferenças de mecanismo de ação, a potência e a duração da analgesia clínica após o tratamento com TR é tão eficaz quando comparada a codeína, pentazocina ou dextropropoxifeno (RAFFA et al., 1992; NICHOLSON, 2009). O TR é classificado como um fármaco de classe II, de acordo com a escala de dor da Organização Mundial de Saúde é o segundo fármaco mais utilizado no controle de dor oncológica (CARACENI et al., 2012).

O tramadol pode ser usado por diversas vias de administração: oral, subcutânea, intravenosa, intramuscular, retal e espinal (GROND; SABLITZKI, 2004). A incidência de tolerância e dependência do TR é considerada baixa mesmo em tratamento prolongado, os efeitos colaterais graves, como depressão respiratória, taquicardia tem baixa incidência. Porém, apesar de ocorrerem apenas uma pequena porcentagem de pacientes, estes efeitos são sérios e não podem ser desconsiderados. Os efeitos adversos promovidos pelo TR com maior frequência de relatados pelos pacientes são: náuseas, vômitos, sedação, sudorese, tontura, constipação e dor de cabeça (LEPPERT 2009; TANAKA et al., 2016).

Com relação à farmacocinética, o TR apresenta apenas cerca de 20% ligação com proteínas plasmáticas. A biotransformação ocorre no citocromo P450 (CYP2D6, CPY3A4 e CPY2B6), as principais reações são O e N-desmetilação (fase I), ocorre formação de vários metabólitos e, dentre eles o metabólito ativo O-desmetiltramadol (M1). A biotransformação hepática do tramadol resulta em vários metabólitos, porém apenas o metabólito ativo M1, possui atividade analgésica, pois têm afinidade pelos receptores opióides  $\mu$  (SOUSA et al., 2008; TANAKA et al., 2016).

O metabólito do tramadol O-desmetil tramadol (M1) apresenta atividade analgésica 2 - 4 vezes maior que a do tramadol. Além disso, o M1 possui maior afinidade para o receptor opióide  $\mu$  do que o tramadol. Assim, os efeitos analgésicos do TR são, em grande parte, modulados pelo metabólito M1 (MINAMI, 2011; COLLIER et al., 2012).

O tempo de meia-vida de eliminação é de aproximadamente 5-6 horas para o TR e de 8 horas para o seu M1, a maior parte da excreção ocorre por via renal (90%). Em relação ao volume de distribuição após da administração por via oral e via intravenosa é de 306 e 203L, apresentando uma alta afinidade pelos tecidos (LEPPERT, 2009; LEPPERT, 2011; VAZZANA et al., 2015). Após a administração oral é rapidamente absorvido, sendo os picos de concentrações plasmáticas alcançadas cerca de 2 horas e efeito analgésico máximo de 1 a 4 horas

após a administração do fármaco, porém permanecendo por apenas 3 a 6 horas (MATTIA; COLUZZI, 2005). A biodisponibilidade após o uso por via oral é de cerca de 70% e a farmacocinética é linear na faixa terapêutica de 100 a 300 ng/mL (SZKUTNIK-FIEDLER, et al., 2014).

Apesar de apresentar baixa incidência de reações adversas, o uso de TR ainda é limitado por sua curta duração de ação, sendo necessárias várias doses repetidas (a cada 6 horas) ou infusões contínuas para uma analgesia na duração de ação eficiente (SALMAN et al, 2003; DOS SANTOS et al., 2015).

#### **1.4 Hidrogéis termorreversíveis de Tramadol**

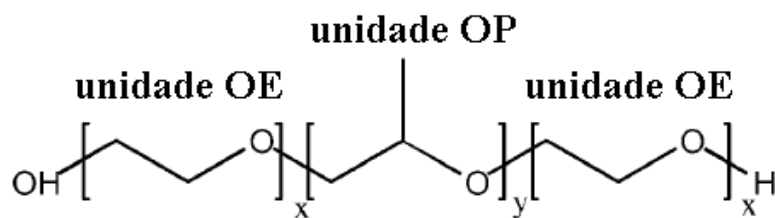
Recentemente vários sistemas de administração de fármacos foram desenvolvidos com a finalidade de melhorar absorção, aumentar a estabilidade e duração de ação dos efeitos dos fármacos. Várias formulações de liberação modificada contendo TR foram desenvolvidas para uso oral, transdérmico, parenteral e como implantes biodegradáveis (SALMAN et al., 2003; VARSHOSAZ et al., 2006; FODA et al., 2007; KUMAR et al., 2009; AMMAR et al., 2009; MORALES et al., 2010). No entanto, estas formulações apresentam limitações farmacotécnicas relacionadas com manutenção da homogeneidade e estabilidade dos sistemas. Canadá e Estados Unidos da América (EUA) possuem algumas formulações de liberação sustentada de tramadol por via oral, que já são comercializadas. Estas formulações são: Zytram XL® (2006; Purdue Pharma, Canadá), Ralivia™ (2007; Valeant Pharmaceuticals, Canada; Ultram® ER nos EUA), Tridural® (2007; Labopharm Inc., Canadá) e Durela® (2012, Cipher Pharmaceuticals, Canadá; Conzip™ nos EUA), (Cipher Pharmaceuticals Inc., Canada) (KIZILBAS; NGÔ-MINH, 2014).

O uso de polímeros como sistemas de liberação modificada promove o aumento da biodisponibilidade do fármaco, promovendo uma baixa toxicidade, diminuição das reações adversas e redução das dosagens diárias (BATRAKOVA; KABANOV, 2008; GRILLO et al., 2010). Dentre os polímeros utilizados em formulações de liberação modificada podemos citar os poloxamers.

Poloxamers (PL) (Lutrol®, Pluronic®, Synperonic®, Tetronic®) são co-polímeros constituídos por unidades de óxido de etileno (OE) e óxido de propileno (OP). Estas unidades são



organizadas em uma estrutura do tipo OEx – OPy – OEx e o número de unidades hidrofílicas (OE) e hidrofóbicas (OP) é o que determina o caráter anfifílico dos poloxamers, caracterizando-os por diferentes valores de balanço hidrofílico-lipofílico. A FIGURA 3, representa um copolímero anfifílico, não-iônico, de grande massa molar (DUMORTIER et al., 2006;DUARTE, 2005; COLLER, 2012; KRAYCHETE; SAKATA, 2012).



**FIGURA 3. Estrutura química do Poloxamer (PEO-PPO-PEO)** (Retirado GRATIERI, 2010).

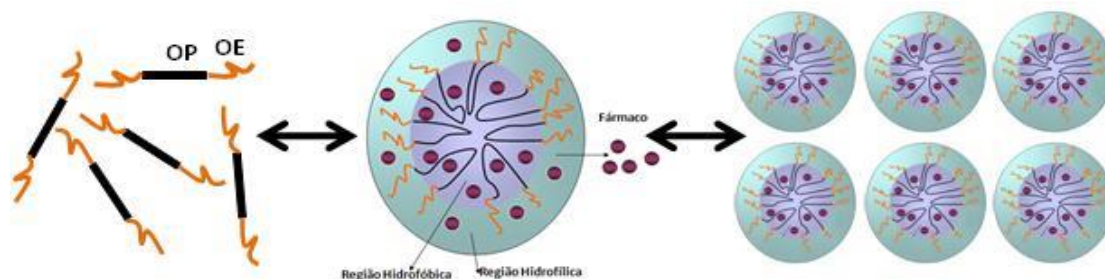
Os monômeros de OE e OP apresentam a capacidade de organizarem em solução aquosa, acima de uma determinada concentração, denominada concentração micelar crítica (CMC). As micelas poliméricas apresentam uma porção hidrofóbica (unidades de OP) e uma porção hidrofílica (unidades de OE) e por esta razão, são úteis na incorporação de compostos hidrofóbicos e hidrofílicos (por interações químicas, físicas ou eletrostáticas). Estas características são altamente dependentes do comprimento das cadeias de OE-OP-OE, do número de moléculas de polímero e, especialmente, da temperatura da solução. Hidrogéis são cadeias tridimensionais de polímeros ou copolímeros hidrofílicos que, apesar da sua afinidade com a água, são insolúveis devido à presença de ligações cruzadas na sua estrutura. Outra característica dos hidrogéis é que, devido as suas propriedades físico-químicas, apresentam sensibilidade a estímulos externos, como por exemplo, à temperatura e ao pH (DUMORTIER et al., 2006).

Em baixas temperaturas (abaixo de 15°C), tanto as unidades de OE quanto de OP são solúveis em água, mas com o aumento da temperatura as unidades hidrofóbicas de OP são desidratadas, e se agregam (core), enquanto as unidades hidrofílicas de OE (coroa) permanecem hidratadas. Logo após, estas micelas se organizam (“empacotamento”) em fases cúbico-ordenadas, formando estruturas parcialmente rígidas com alto teor de viscosidade. Esse fenômeno

reversível é a termogelação, e ocorre em uma faixa de temperatura de transição sol-gel ( $T_{sol-gel}$ ). Portanto, abaixo dessa temperatura o material fica fluído e acima se apresenta semi-sólido (gel), por esta característica recebe a denominação de hidrogéis termorreversíveis (YU; DING, 2008; KLOUDA; MIKOS, 2008; SANTOS, 2015). Assim, abaixo dessa temperatura, os sistemas permanecem como fluidos e podem ser utilizados em formulações injetáveis, e próximos a temperatura fisiológica permanecem como semi-sólidos e promovem liberação modificada de fármacos.

PL podem ser usados como sistemas carreadores de fármacos justamente por sua capacidade de responderem a estímulos no próprio local de administração (DUMORTIER et al., 2006). De acordo com a temperatura de transição sol-gel apresentam fluidez antes da administração em baixas temperaturas, e, após a administração se tornam gel no local injetado, em condições fisiológicas sem a interferência de agentes químicos. Esta característica torna os PL eficientes para a administração parenteral e para liberação lenta e sustentada de fármacos (YU; DING, 2008).

A FIGURA 4 representa a propriedade que torna os poloxamers bases eficazes para formação de géis e emulsões que aumentam a solubilização e a estabilidade de fármacos. As propriedades de gelação térmica desses polímeros são úteis para administração por vias injetáveis e, eficazes para controlar a liberação de fármacos por períodos prolongados, na temperatura corporal (KABANOV, et al., 2002; DUMORTIER, et al., 2006 SHARMA *et al.*, 2008).



**FIGURA 4. Representação esquemática da transição sol-gel de copolímeros termorreversíveis da classe dos poloxamers (SHARMA et al., 2008)**

As características associadas à biocompatibilidade de PL são essenciais para o desenvolvimento de sistemas binários para o controle efetivo da dor. Estes sistemas podem

melhorar o perfil farmacocinético de fármacos, como o TR, através do aumento na duração de ação e a absorção reduzida. O uso de PL com diferentes balanços hidrófilos-lipófilos, como PL 407 e PL 188, como sistemas binários pode ser vir à ser uma alternativa bastante interessante para melhorar o perfil farmacêutico das formulações convencionais para tratamento de dor (DOS SANTOS, 2015).

Uma das grandes motivações para utilização do PL 407, a sua alta biocompatibilidade, sendo aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para uso clínico (SINGH-JOY; MCLAIN, 2008). Apesar de ser um agente seguro, o PL 407 pode induzir alterações no metabolismo lipídico e na capacidade de filtração renal, quando usado em altas doses (0,5 a 1 g/kg, por via intraperitoneal) (BLONDER et al., 1999; DUMORTIER et al., 2006). PL 407 apresenta outras propriedades benéficas, como imunomodulação (JACKSON et al., 2000), indução de crescimento de fibroblastos e cicatrização após procedimentos cirúrgicos odontológicos (HOKETT et al., 2000).

Os aspectos físico-químicos, os perfis de dissolução-liberação, citotoxicidade, genotoxicidade e desempenho farmacológico *in vivo* de sistemas binários baseados em poloxamer (PL) foram estudados e os resultados foram demonstrados no trabalho de Santos e colaboradores (2015). Neste estudo, TR (20 mg. mL<sup>-1</sup>) foi disperso em diferentes soluções contendo PL 407 sozinho ou em sistemas binários com PL 188. A caracterização físico-química mostrou, que a formação de sistemas binários compostos de PL 407 e PL 188 alteram a micelização e temperatura de Sol-gel. A temperatura de micelinização (T<sub>m</sub>) para o sistema binário esta próxima de 11 a 12 ° C e apresenta discreta variação quando comparada com hidrogéis de PL 407 (T<sub>m</sub> cerca de 9-14 ° C). O sistema PL 407 (20%) apresenta T<sub>sol-gel</sub> em torno de 30 ° C. Os sistemas binários PL 407-PL 188 (20:10 e 25: 5) mostraram-se T<sub>sol-gel</sub> variando de 32 ° C-38 ° C, ou seja, estes sistemas permanecem como semi-sólidos após a injeção em temperatura corpórea. Os perfis de liberação de TR nas formulações com PL 407 (20%) e com os sistemas binários PL 407-PL 188 (20:10 e 25: 5) ao longo de 24 horas foram de 65,6% ± 1,4%; 72,6% ± 8,6% e 45,1% ± 2,5%, respectivamente, enquanto que a solução de TR, obteve 100% de libertação após 4 horas. As formulações com PL reduziram a citotoxicidade em relação à TR e não apresentaram efeitos genotóxicos. Os ensaios de atividade analgésica demonstraram que PL 407 e os seus sistemas

binários com PL 188 são eficazes para prolongar a liberação de TR durante 48-72 horas após injeção subcutânea (SANTOS et al., 2015).

Os dados obtidos por SANTOS e Colaboradores (2015) demonstraram diversas vantagens da associação de TR em hidrogéis de poloxâmeros. Dentre as várias formulações testadas neste trabalho, três formulações se destacaram e apresentaram melhor desempenho quanto aos aspectos físico-químicos, citotoxicidade e efeito farmacológico conforme o descrito anteriormente. Assim, estas três formulações foram selecionadas para uma avaliação farmacocinética- farmacodinâmica em coelhos. Este estudo é importante para corroborar o futuro uso clínico destas formulações, que podem apresentar a vantagem de uma maior duração do efeito analgésico, de não necessitarem de administrações repetidas e da diminuição da absorção sistêmica e dos efeitos colaterais.

## 2. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

- Determinar o perfil farmacocinético e farmacodinâmico do tramadol associado à poloxamers comparando-o com o fármaco livre, administrados por via subcutânea em coelhos.
- Correlacionar os níveis plasmáticos de TR e M1 com os efeitos farmacológicos obtidos com o tramadol associado à poloxamers e livre, após a administração em coelhos.

### 3. ARTIGO CIENTÍFICO

**“Pharmacokinetics and pharmacodynamics evaluation of tramadol in thermoreversible gels.” Submetido no International Journal of Nanomedicine (9/11/2016).**

O presente estudo teve como objetivo a avaliação pré-clínica de três novas formulações de tramadol associadas à poloxamers. Estes polímeros termorreversíveis formam géis em temperaturas próximas à temperatura corpórea, o que possibilita a liberação modificada de fármacos incorporados a estas substâncias. Estas novas formulações foram caracterizadas e testadas previamente e os resultados foram demonstrados no trabalho de dos Santos e colaboradores (2015) publicado no International Journal of Nanomedicine. Os resultados obtidos demonstraram vantagens destas novas formulações em relação ao fármaco livre. Diante destes resultados promissores e da perspectiva de futuro uso clínico destas novas formulações, é necessário realizar estudos de farmacocinética e farmacodinâmica em modelos animais. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a farmacocinética e a farmacodinâmica de três novas formulações em coelhos após a aplicação subcutânea. Os resultados demonstram que uma das quatro formulações testadas apresentou melhor perfil farmacocinético e farmacodinâmico quando comparada com o fármaco livre e com as outras formulações. Esta formulação com associação de dois polímeros (poloxamer 407 - 20% e poloxamer 188- 10%) promoveu maior biodisponibilidade após a administração subcutânea e também uma intensificação dos efeitos biológicos do tramadol correlacionada a maior concentração do fármaco na circulação sanguínea, caracterizando liberação modificada e prolongada de tramadol. Este resultado demonstra que o uso desta associação de poloxamers pode diminuir a principal limitação de uso deste fármaco para o controle da dor, que é a sua curta duração de ação.

**Pharmacokinetics and pharmacodynamics evaluation of tramadol in thermoreversible gels.**

Juliana Zampoli Boava Papini<sup>1</sup>, Cíntia Maria Saia Cereda<sup>2</sup>, José Pedrazzoli Júnior<sup>1</sup>, Silvana Aparecida Calafatti<sup>1</sup>, Daniele Ribeiro de Araújo<sup>3</sup>, Giovana Radomille Tofoli<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> São Francisco University, Av. São Francisco de Assis 218, 12916-900, Bragança Paulista, São Paulo, Brazil.

<sup>2</sup> Institute and Research Center São Leopoldo Mandic, Rua José Rocha Junqueira 13, 13045-75, Campinas, São Paulo, Brazil.

<sup>3</sup> Federal University of ABC, Rua Santa Adélia 166, 09210-170, Santo André, São Paulo, Brazil.

Corresponding Author: Dr. Giovana R. Tofoli. Institute and Research Center São Leopoldo Mandic.

Rua José Rocha Junqueira 13, 13045-75, Campinas, São Paulo, Brazil. Phone: +55 19 3211 3600.

E-mail: giovana.tofoli@slmandic.edu.br

**ABSTRACT:**

The purpose of this study was to evaluate in rabbits pre-clinical pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD) induced by new formulations of tramadol (TR) in thermoreversible gels. The poloxamer (PL)-tramadol systems were prepared by direct dispersion of the drug ( $20 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) in solutions with PL 407 and PL 188. The formulations used in this study were: F1- TR 2% in aqueous solution; F2- PL 407 (20%) + PL 188 (10%) + TR 2%; F3- PL 407 (25%) + PL 188 (5%) + TR 2%; F4 - PL 407 (20%) + TR 2%. New Zealand White rabbits (2500-3000g) were divided in four groups (n=6) and treated by subcutaneous route with F1, F2, F3 or F4 ( $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ). Blood samples (1 mL) from an ear vein were collected pre dose (0 min) and at 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420 and 480 minutes after the injection of formulations. TR and M1 (O-desmethyl tramadol) plasma levels were determined using a triple stage quadrupole mass spectrometer (LC-MS/MS), equipped with an API electrospray source. PD evaluation was performed with the measurement of both pupils' diameters using calipers in the same periods of blood collection. F2 showed higher TR plasma concentration than all other formulations after 180 minutes and presented lower M1 concentrations at almost all evaluated periods ( $p < 0.05$ ). Areas under the curve ( $ASC_{0-480}$  e  $ASC_{0-\infty}$ ) and clearance of F2 presented differences compared to F1 ( $p < 0.05$ ). F2 presented significant correlation (Pearson correlation) between the enhancement of TR and M1 concentrations and the decrease of pupil size (miosis) ( $p < 0.05$ ). Thus, the association of PL 407 (20%) and PL188 (10%) in F2 was effective to alter pharmacokinetics and pharmacodynamics effects of TR, since this formulation was effective to enhance the bioavailability and this effect was correlated with a more intense biologic effect.

Keywords: tramadol, poloxamers, pharmacokinetics, pharmacodynamics, drug delivery.

Running header: Pre clinical evaluation of new tramadol formulations.



## INTRODUCTION:

Tramadol (TR) is an analgesic opioid widely used to treat moderate, severe, and chronic pain, such as oncologic and post operative pain<sup>1, 2</sup>. It acts as an opioid  $\mu$ 1 receptor agonist, monoamine reuptake inhibitor and as a target for some protein coupled receptor and ligand-gated ion channels<sup>3,4</sup>. The common adverse effects of tramadol are somnolence, nausea, and vomiting<sup>4</sup>. TR usually evokes a low incidence of adverse effects when compared to classical opioids, such as morphine and fentanyl<sup>5</sup>. Despite these advantages, TR presents short duration of action and it is necessary repeated doses or continuous infusion for a prolonged analgesic action<sup>6,7</sup>.

In this context, our research group developed drug deliveries systems with TR and poloxamer (PL) thermoreversible hydrogels<sup>5</sup> for future treatment of post operative pain. Poloxamers are copolymers composed by basic units of ethylen oxides and propylene oxides. The different number of these basic units in PL allows the formation of micelles with a hydrophobic core surrounded by a hydrophilic corona. PL have the ability, in concentrated solutions, of forming gels close to corporal temperatures because when the temperature rises, propylene oxides units are dehydrated and aggregate (micellar core), while the hydrophilic ethylen oxides units (micellar corona) remain hydrated. Thus, in low temperatures the system remains fluids and this property can be used for parenteral administration of drugs and in high temperatures (close to corporal) it remain as semisolids and allows drug delivery for long periods of time<sup>8,9,10</sup>.

Physicochemical aspects, dissolution-release profiles, cytotoxicity, genotoxicity, and *in vivo* pharmacological performance of poloxamer (PL)-based binary hydrogels were studied by

our research group and results were showed at the work of Santos and colleagues (2015)<sup>5</sup>. In this study, TR (20 mg·mL<sup>-1</sup>) was dispersed in different solutions containing PL 407 alone or in binary systems with PL 188. Physicochemical characterization showed that the formation of binary systems composed of PL 407 and PL 188 alters the micellization and sol-gel transition processes. The temperature of micellization temperature ( $T_m$ ) for the binary system was nearby 11 to 12°C and presents discrete variation when compared to PL 407 hydrogels ( $T_m$  about 9-14°C). The sol-gel transition temperature ( $T_{sol-gel}$ ) was lower for PL 407 (from 22 to 24°C) in high concentrations (30 and 35%, w/w%) which unable the use of this systems for parenteral injection. The PL 407 system (20%) presents  $T_{sol-gel}$  around 30°C. The PL 407–PL 188 binary systems (20:10 and 25:5) showed  $T_{sol-gel}$  in a range of 32°C–38°C, thus in temperatures close to corporal these systems remain as semisolids. For TR solution 100% of release was achieved after 4 hours. The release profiles of TR in the formulations with PL 407 (20%) and the PL 407–PL 188 binary systems (20:10 and 25:5) over 24 hours were 65.6%±1.4%; 72.6%±8.6% and 45.1%±2.5% respectively. The formulations with PL reduced the cytotoxicity compared to TR and did not present genotoxic effects. Analgesic activity assay demonstrated that PL 407 and its binary systems with PL 188 are effective hydrogels for controlling and prolonging TR release for 48–72 hours after subcutaneous injection<sup>5</sup>.

Data obtained by dos Santos et al., 2015<sup>5</sup> supported the advantages of the association of TR in poloxamers hydrogels. Among the various formulations tested by dos Santos and co-workers (2015)<sup>5</sup> we select three of them which presented the best performance regarding physicochemical aspects, cytotoxicity and *in vivo* pharmacological evaluation. Thus, the purpose of this study was to evaluate the pre-clinical pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD)

induced by these new formulations of TR in thermoreversible gels to support its future clinical use.

## **Material and methods:**

### **Chemicals and reagents**

TR hydrochloride (attested purity of 98.5%) was donated by Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. (Itapira, Brazil). O-desmethyltramadol (M1), Poloxamer 407 (Pluronic® F127) and Poloxamer 188 (Pluronic® F68) were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA). All other reagents were of analytical grade and deionized water from a Purelab Option-Q (ELGA LabWater, High Wycombe, UK) water system was used for all experiments.

### **Hydrogels preparations**

The formulations used in this study were: F1- TR 2% in aqueous solution; F2- PL 407 (20%) + PL 188 (10%) + TR 2%; F3- PL 407 (25%) + PL 188 (5%) + TR 2% and F4- PL 407 (20%) + TR 2%. The hydrogels were prepared in the same conditions as described by Santos et al. (2015). TR (2%) was dispersed in different solutions containing PL 407 alone or with PL 188 at 4°C under magnetic stirring (100 rpm). The PL concentrations were selected in order to obtain the three formulations tested in our study.

### **Animal protocol: PK-PD study**

The experimental protocol was approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Research of São Francisco University (protocol # n.002.04.2013). Animals were housed 1 per cage and received water and food ad libitum with a 12:12 hour light-dark cycle, at  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ . This randomized blind study was conducted with 24 male New Zealand White rabbits (2.50-3.00 kg) divided in four groups (n=6). Animals were treated by subcutaneous route with one of the formulations described above ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). The TR dosage was based in previous work of Souza and coworkers (2008)<sup>11</sup> and the recommendations of Barter (2011)<sup>12</sup>, also the dosage was evaluated in a pilot study (data not shown). Rabbits received the injection in the subcutaneous tissue in the unattached skin around their neck and the needle was a 25 G x 1 in. (BD®). The needle was inserted with a  $45^\circ$  angle.

An intravascular catheter was inserted in the ear vein of the animals and blood samples (1 mL) were collected via a heparinized cannula pre dose (0 min) and at 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420 and 480 minutes after the injection of formulations. These intervals were defined to provide ten samples between the base line (0 min) and approximately 4 times the  $t_{1/2}$  (half-life time) of TR (approximately 2 h)<sup>11</sup>. Immediately after each blood collection plasma was separated and stored at  $-70^\circ\text{C}$  until analysis<sup>13</sup>.

In order to assess the efficacy of these new formulations, animals had their pupils size assessed in millimeter based by a digital callipers (Digimatic callipers, Mitutoyo, Tokyo, Japan) at the same periods of blood sample collection. Both pupils were measured and the mean value was used as reference. The measurements occurred in the same location and under similar brightness of light at all evolution times<sup>14</sup>.

### LC-MS/MS assay: Apparatus and Chromatographic Conditions

A Shimadzu LC 20 AD system coupled with a Micromass Quattro LC® triple stage quadrupole mass spectrometer (LC-MS-MS), equipped with an API electrospray source, was used to determine the TR and O-desmethyltramadol (M1) plasma levels.

The chromatographic conditions were determined after validation of the analytical method for TR and M1. In order to validate the method, quality control samples of TR (QC-2400.0, 1200.0, and 6.0 ng.mL<sup>-1</sup>), were prepared by mixing drug-free plasma with appropriate volumes of working solutions. For M1 we used QC samples in different concentration as follows: 40.0, 25.0, and 3.0 ng.mL<sup>-1</sup>.

TR analytical method used a Synergi Fusion (150 x 2 mm id, 4µm particle size) for all separations. The mobile phase was 85% acetonitrile and 15% water with 01 mL of formic acid (pH=3.5). The total run time was 3.5 minutes, retention time for TR was 0.72 min. The mass spectrometer was run in the positive mode (ES+) and set for multiple reaction monitoring (MRM). The full-scan single-mass spectrum and the daughter ion-mass spectrum for TR and diazepam (internal standard – IS) were (m/z) 264.14>58.28 and 285.20>193.00, respectively. Sample preparation for TR was carried out after frozen plasma samples (200.0 µL) were thawed at room temperature, followed by the addition of 50 µL of IS work solution (5 µg.mL<sup>-1</sup>). One thousand microliters of dichloromethane (1:1; V/V) were added and then the sample was vortexed for five minutes and centrifuged at 1200×g, for 10 min at -4°C. The organic liquid (0.7 µL) layers were transferred to microtubes and the samples were dried under nitrogen flow, samples were reconstituted in 200 µL mobile phase, vortexed for three minutes and 150µL were transferred to LC-MS/MS system vials, for further injection (5.0 µL).

For M1 detection all separations were carried out with a C18 Luna (100 x 6 mm id, 5  $\mu\text{m}$  particle size). The same volume of frozen plasma samples (200  $\mu\text{L}$ ) were thawed at room temperature and also 50  $\mu\text{L}$  of internal standard (IS) (diazepam, 200  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) were added. The other procedures were the same used in TR quantification. But for M1, the samples were reconstituted in 100  $\mu\text{L}$  mobile phase (acetonitrile and ammonium acetate (5 mM); 95:5 V/V). The total run time was 5.0 minutes, retention time for M1 was 1.48 min. The full-scan single-mass spectrum and the daughter ion-mass spectrum for M1 was (m/z) 250.64>58.50.

The data were integrated using the MassLynx 4.1 (Waters®) software in both analytical methodologies. Precision and accuracy of the analytical method were controlled by calculating the intra-batch and inter-batch variation at three concentrations of QC in five replicates (n=5). Three calibration curves were plotted in the range of 2.0-3000.0  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  for TR and for M1 the range was 2.0-3000.0  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The limit of quantification (LQ) was defined as the lowest concentration at which precision and accuracy were within 20% of the true value for both M1 and TR.

### **Statistical Analysis**

The concentration-time data were analyzed by the noncompartmental approach. The pharmacokinetic parameters were calculated using WinNonlin software (WinNonlin version 5.3, Pharsight Corporation, CA, US). The plasma TR and M1 concentrations were analyzed by one-way ANOVA and the Tukey-Kramer test (post-hoc) considering each period of time separately ( $\alpha=0.05$ ). The pharmacokinetic parameters of both compounds (M1 and TR) were also analyzed using one-way ANOVA and the Tukey-Kramer test (post-hoc) ( $\alpha=0.05$ ). Plasma concentrations

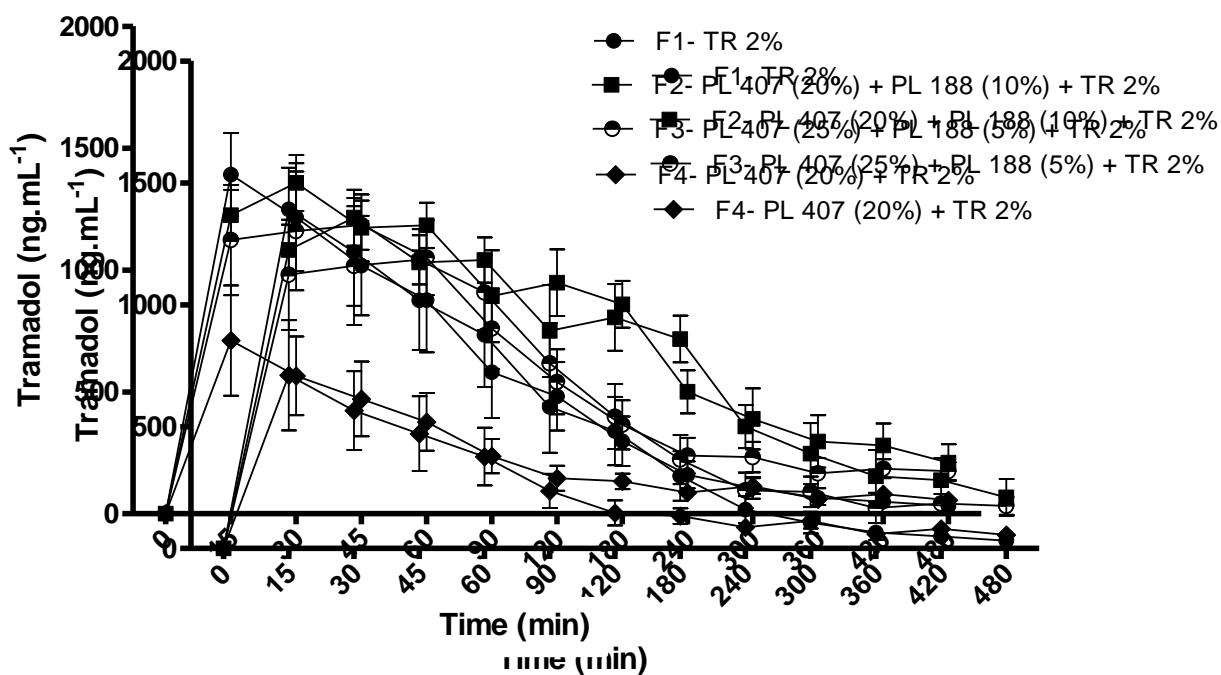
of TR and M1 were correlated with the pupil's diameters using Pearson correlation. For the analysis we used Graph Pad InStat and Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

## **RESULTS AND DISCUSSION:**

In the present study we aimed to evaluate pre-clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of a new TR formulation. Pre-clinical evaluation is an important (and mandatory) part on new formulations development, since the *in vitro* results may not be replicable during *in vivo* studies. Rabbits are good options to perform pharmacokinetic studies, especially because these animals present a higher volume of blood and easy ways to collect it when compared to rats. Their ear vein can be easily cannulated with a simple puncture technique to collect multiple plasma samples. Also, we decided to use “large experimental animal models” to observe extensive whole-body pharmacokinetics in a context comparable to patient physiology<sup>15, 16</sup>. In our study, we also evaluated M1, the main TR metabolite, levels and its PK parameters since it has about 300-fold higher affinity for the  $\mu$  receptor than TR<sup>4</sup>.

In order to evaluate the pharmacokinetics parameters we have to determine TR and M1 concentration in plasma. To achieve this goal we developed an analytical methodology which presented reliable and reproducible results within its analytical range for both TR and M1. The analysis of TR and M1 did not presented neither interfering compounds nor ion suppression. The assays were linear for TR and M1 and coefficients ( $r^2$ ) were greater than 0.99 for all the calibration curves. Intra and inter- batch accuracy of QC TR plasma samples ranged from 85.14 to 109.03% and precision ranged from 1.05 to 5.58%. M1 accuracy and precision ranged from 98.18 to 111.86% and from 4.32 to 17.44%, respectively. The LQ for TR was 2.00 ng.mL<sup>-1</sup> and for M1 was 1.00 ng.mL<sup>-1</sup>.

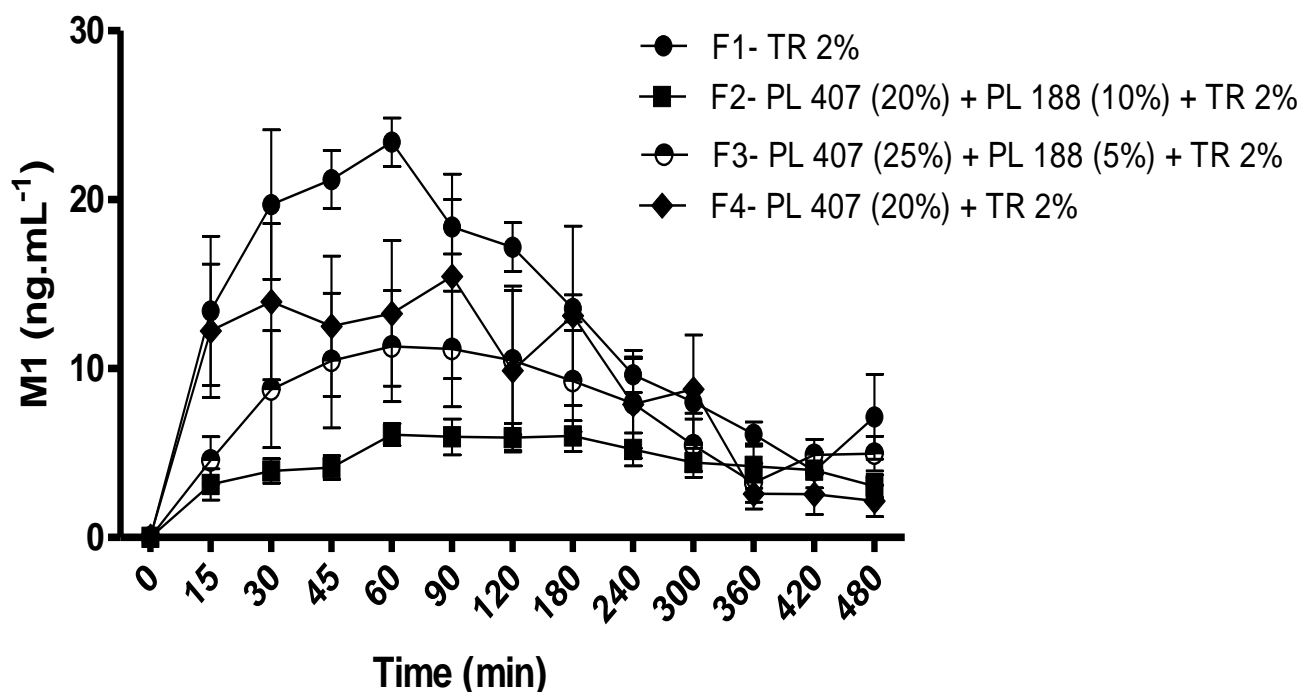
After 15 minutes of the subcutaneous administration of all the formulations in rabbits, all animals presented TR in the systemic circulation. Thirty to sixty minutes after the injections F4 (PL407 (20%) + TR 2%) presented lower plasma concentrations when compared to all other formulations (F1- TR 2%; F2 -PL 407 (20%) +PL 188 (10%) + TR 2% and F3- PL 407 (25%) +PL 188 (5%) + TR 2%) ( $p<0.05$ ). F4 still presented lower concentrations than F2 and F3 ( $p<0.05$ ) after 90 minutes. After 120 minutes, F2 presented higher concentrations than F4 e F1 and 60 minutes later the differences were among F2 and all the other formulations ( $p<0.05$ ). Two hundred and forty minutes after the injections there were no differences between all tested formulations (GRAPHIC 1).



**GRAPHIC. 1.** Time-course (min) after the injection of TR formulations in rabbits. Values are expressed as mean  $\pm$  SD. (ANOVA/ Tukey-Kramer). Statistical Analyses: F4<F1, F2 and F3 after 30 to 60 min ( $p<0.05$ ); F4< F2 and F3 after 90 min ( $p<0.05$ ). F2 > F1 and F4 after 120 min and after 180 min F2> F1, F3 and F4 ( $p<0.05$ ).



M1 plasma concentrations were lower when TR concentrations were higher and vice-versa. For example, F2 presented lower M1 concentrations and higher TR concentrations at almost all evaluated periods. M1 concentrations after the injection of F2 were lower than F1's until 120 minutes after the injection. F4 presented higher concentrations for M1 when compared to F2 at 15, 30 and 90 minutes after the injections ( $p < 0.05$ ) (Graphi 2).



**GRAPHIC 2.** Time-course (min) of M1 after the injection of TR formulations in rabbits. Values are expressed as mean  $\pm$  SD. (ANOVA/ Tukey-Kramer). Statistical Analyses: F2 < F1 until 120 minutes ( $p < 0.05$ ); F4 < F2 after 15, 30 and 90 minutes ( $p < 0.05$ ).

Maximum plasma concentration ( $C_{max}$ ) of F4 was approximately 50% smaller and Volume of distribution ( $V_d$ ) was two to three times bigger than the others formulations ( $p < 0.05$ ). F2 values for areas under the curve ( $AUC_{0-480}$  and  $AUC_{0-\infty}$ ) presented differences between F1 and F4 ( $p < 0.05$ ). Clearance (CL) of F2 was approximately half of F1 ( $p < 0.05$ ).  $T_{max}$  (time to reach

maximum concentration) and  $t_{1/2}$  (half-life time) did not show any statistical differences between the formulations. MRT (Mean residence time) values for F4 were twice of the values for F1 ( $p < 0.05$ ) (Table 1).  $t_{1/2}$ ,  $T_{max}$  and MRT of M1 did not present any statistical differences.  $C_{max}$  and  $AUC_{0-\infty}$  values of M1 for F1 were bigger than F2 ( $p < 0.05$ ).  $V_d$  was bigger for F2 than F1 ( $p < 0.05$ ) (Table 2).

**TABLE 1:**  $t_{1/2}$ ,  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-480}$ ,  $AUC_{0-\infty}$ ,  $T_{max}$ , CL,  $V_d$ , MRT of TR after the injection (SC) of F1, F2, F3 and F4 in rabbits. Data expressed as mean ( $\pm$  SD)

TR	F1	F2	F3	F4
$t_{1/2}$ (h)	1.41 $\pm$ 0.31	2.46 $\pm$ 0.86	2.35 $\pm$ 1.28	7.55 $\pm$ 11.52
$T_{max}$ (h)	0.45 $\pm$ 0.20	0.750 $\pm$ 0.671	0.54 $\pm$ 0.18	1.83 $\pm$ 2.45
$C_{max}$ (ng.mL <sup>-1</sup> )	1563.82 $\pm$ 404.77	1452.95 $\pm$ 200.34	1374.93 $\pm$ 314.63	756.81 $\pm$ 490.89 b**, c*, d*
$AUC_{0-480}$ (ng-h.L <sup>-1</sup> )	2581.86 $\pm$ 417.41	4971.81 $\pm$ 695.77 a*, c***	3320.01 $\pm$ 445.91	1307.32 $\pm$ 704.39
$AUC_{0-\infty}$ (ng-h.L <sup>-1</sup> )	2658.33 $\pm$ 498.56	5894.02 $\pm$ 791.82 a*, c**	4533.81 $\pm$ 267.25	1992.07 $\pm$ 117.42
$V_d$ (L)	10.13 $\pm$ 6.01	6.24 $\pm$ 0.70	7.14 $\pm$ 2.31	16.81 $\pm$ 2.48 b, c***, d**
CL (L.h <sup>-1</sup> )	5.33 $\pm$ 3.62 a*	1.95 $\pm$ 0.69	2.41 $\pm$ 0.97	5.03 $\pm$ 0.29
MRT (h)	1.65 $\pm$ 0.60	2.72 $\pm$ 0.42	2.66 $\pm$ 0.71	2.96 $\pm$ 1.18 b*

Statistical analysis: a- F1 vs. F2; b-F1 vs. F4; c- F2 vs. F4; d- F3 vs. F4;  $p < 0.001$  [\*\*\*],  $p < 0.01$  [\*\*],  $p < 0.05$  [\*] -ANOVA/Tukey-Kramer.  $C_{max}$ -Maximum plasma concentration;  $V_d$ -Volume of distribution;  $AUC_{0-480}$  and  $AUC_{0-\infty}$  - Areas under the curve; CL-Clearance;  $T_{max}$ -time to reach maximum concentration;  $t_{1/2}$ - half-life time; MRT - Mean residence time.

**TABLE 2:**  $t_{1/2}$ ,  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-480}$ ,  $AUC_{0-\infty}$ ,  $T_{max}$ ,  $CL$ ,  $V_d$ ,  $MRT$  of M1 after the injection (SC) of F1, F2, F3 and F4 in rabbits. Data expressed as mean ( $\pm$  SD)

M1	F1	F2	F3	F4
$t_{1/2}$ (h)	2.64 $\pm$ 0.86	4.55 $\pm$ 1.44	4.02 $\pm$ 2.48	5.57 $\pm$ 8.36
$T_{max}$ (h)	0.70 $\pm$ 0.27	2.70 $\pm$ 2.04	2.95 $\pm$ 2.70	1.58 $\pm$ 1.75
$C_{max}$ (ng.mL <sup>-1</sup> )	27.00 $\pm$ 2.69 a**	7.82 $\pm$ 2.23	15.17 $\pm$ 9.96	21.89 $\pm$ 11.81
$AUC_{0-480}$ (ng-h.L <sup>-1</sup> )	89.28 $\pm$ 5.26	37.82 $\pm$ 11.93	56.18 $\pm$ 39.59	65.79 $\pm$ 50.29
$AUC_{0-\infty}$ (ng-h.L <sup>-1</sup> )	121.71 $\pm$ 34.00 a*	48.92 $\pm$ 6.31	109.06 $\pm$ 3.35	83.57 $\pm$ 53.82
$V_d$ (L)	310.97 $\pm$ 53.25 a***	1325.73 $\pm$ 320.55	611.87 $\pm$ 379.42	286.80 $\pm$ 96.56
$CL$ (L/h)	86.71 $\pm$ 20.70	207.10 $\pm$ 26.48	120.02 $\pm$ 81.57	111.78 $\pm$ 48.61
$MRT$ (h)	2.99 $\pm$ 0.26	3.71 $\pm$ 0.43	3.85 $\pm$ 1.23	3.02 $\pm$ 1.02

Statistical analysis: a- F1 vs. F2;  $p < 0.001$  [\*\*\*],  $p < 0.01$  [\*\*],  $p < 0.05$  [\*] -ANOVA/Tukey-Kramer.  $C_{max}$ -Maximum plasma concentration;  $V_d$ - Volume of distribution;  $AUC_{0-480}$  and  $AUC_{0-\infty}$  - Areas under the curve;  $CL$ -Clearance;  $T_{max}$ -time to reach maximum concentration;  $t_{1/2}$ - half-life time;  $MRT$  - Mean residence time.

Extended release formulations can produce distinct PK profiles and drug-release pattern to provide a drug concentration in a sustained or controlled manner. These formulations might produce a lag time in drug absorption or presents a plasma concentration with a sharp initial slope followed by a sustained release phase. In both cases, the fluctuations in plasma concentrations of the drug associated with unpredictable effects of the conventional formulations can be avoided<sup>17</sup>.

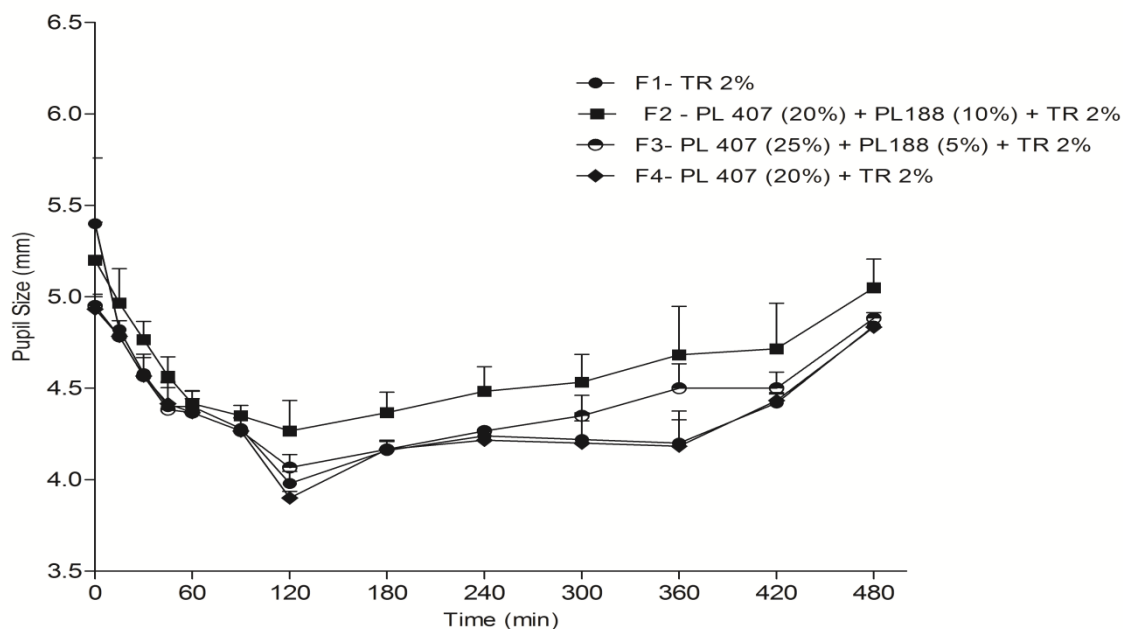
In our study, F2 (PL 407 (20%) + PL 188 (10%) + TR 2%) and F4 (PL 407 (20%) + TR 2%) presented features that can be observed in typical drug-delivery formulations. F4 presented

more constant and lower TR plasma concentrations in almost all periods of time, a small C<sub>max</sub> and a higher MRT when compared to the free drug. These alterations (reduced absorption and maintaining constant drug concentration) are similar to the *in vitro* findings for this formulation (release of 65% of TR in 24 hours)<sup>5</sup>. Also these findings are similar to the pattern observed by commercial formulation of sustained release of TR, Zytram XL®, available at USA and Canada for oral administration. The pharmacokinetic profile of a 200 mg tablet Zytram XL® shows that the C<sub>max</sub> was 34% lower when compared to a 100 mg dose of Tramadol given as an oral solution<sup>17</sup>. However, our formulation, F4 did not present differences in T<sub>max</sub> and t<sub>1/2</sub>.

F2 produced higher and more constant concentrations than the others formulations and after 180 minutes it still presents higher plasma levels. Also F2 was effective to enhance the bioavailability (higher AUCs values) and to reduce the TR clearance. These alterations are similar to the pattern observed by commercial formulation Tridural® available at Canada for oral administration. In both situations it's possible to observe a sharp initial slope followed by a sustained release phase and a higher bioavailability<sup>17</sup>. The *in vitro* evaluation for this formulation also showed that slow release of TR (around 70% in 24 hours)<sup>5</sup>.

Usually, efficacy of opioids is demonstrated based in their antinociception and analgesic activity<sup>18</sup>. However, in large animals models, like the one used in our study, this can be difficult to achieve. The degree of pain in rabbits can vary importantly between animals and there are no objective criteria for this evaluation. As a prey species, rabbits may hide their pain by remaining motionless. Thus, rabbits appear to respond to pain in an opposite fashion of mice or rats, and have little activity or behaviour to be assessed<sup>12</sup>. The lack of pain behaviour in rabbits, lead to the use of pupil size to determine the opioid efficacy. Pupil size can be used to determine the biologic effects of opioids<sup>19, 20, 21</sup>, since these drugs produces miosis in rabbits<sup>22</sup>.

Pupil size values were statistical analysed separately in a three way fashion. First, initial values of all animals were compared to observe regularity between the animals. The basal values ( $5.08 \pm 0.21$  mm) did not present statistical differences among the four tested groups ( $p > 0.05$ ; ANOVA/Tukey-Kramer). Second, a time-course of pupil size variations were analyzed (Figure 3). After 30 minutes F3 promoted smaller pupil size when compared to the basal measures before the injections ( $p > 0.05$ ; ANOVA/Tukey-Kramer). Considering F2 and F4 this difference occurred only after 45 minutes ( $p > 0.05$ ; ANOVA/Tukey-Kramer). Our previous work reported that time for hydrogel formation was less than 20s, and, this can explain the longer onset time for the depot formulations. However, these onset time is not a disadvantage and are still comparable with oral TR formulation that shows the disadvantage of short duration of action (from 3 to 6 hours) (Colluzi & Mattia, 2007). Finally, we correlated (Pearson correlation) each measurement of pupil's size with TR and M1 plasma concentration in order to evaluate if the enhancement of plasma concentrations of TR and M1 evoked biologic effect. Correlation was observed only with F2, that promoted TR plasma concentrations weak correlation with pupil's size ( $r = -0.315$ ) and M1 concentration presented moderate correlation ( $r = -0.409$ ). These results indicate that the boost of TR and M1 plasma concentration is correlated with the occurrence of miosis in rabbits after F2 administration.



**GRAPHIC 3.** Time-course (min) of pupil size after the injection of TR formulations in rabbits. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. (ANOVA/ Tukey-Kramer).

Drugs prescribed for the management of chronic pain should present fast onset and regular absorption, as well as significant plasma levels to be able to provide adequate pain relief<sup>17</sup>. In our study one formulation (F2- PL 407 (20%) + PL 188 (10%) + TR 2%) presented fast onset (observed with pupil size) and high plasma levels at the end of the dosing interval. Thus, the association of PL 407 (20%) and PL188 (10%) in formulation 2 (F2) was effective to alter pharmacokinetics and pharmacodynamics effects of TR. F2 was effective to enhance the bioavailability and this effect was correlated with a more intense biologic effect. These results encourage the use of this new formulation as a safe and effective option for subcutaneous application of TR.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Cristália Produtos Quím. Farm. Ltda (SP, Brazil) for the donation of TR and FAPESP (# 2012/16822-7) for the financial support. The authors also thank Mr. Edvaldo C. Coelho for his contribution in the pharmacokinetics analysis. Juliana Z. B. received a scholarship from CAPES.

## Disclosure:

The authors report no conflict of interest in this work.

## REFERENCES:

1. Kimura M, Obata H, Saito S. Antihypersensitivity effects of tramadol hydrochloride in a rat model of postoperative pain. *Anesth Analg.* 2012;115(2):443-9.
2. Szkutnik-Fiedler D, Balcerkiewicz M, Sawicki W, Grabowski T, Grześkowiak E, Mazgalski J, Urjasz H. In vitro - in vivo evaluation of a new oral dosage form of tramadol hydrochloride--controlled-release capsules filled with coated pellets. *Acta Pol Pharm.* 2014;71(3):469-75.
3. Minami , Sudo Y, Miyano K, Murphy RS, Uezono Y.  $\mu$ -Opioid receptor activation by tramadol and O-desmethyltramadol (M1). *J Anesth,* 2015; 29: 475-9.
4. Tanaka H, Naito T, Mino Y, Kawakami J. Validated determination method of tramadol and its desmethylates in human plasma using an isocratic LC-MS/MS and its clinical application to

patients with cancer pain or non-cancer pain. *J Pharm Health Care Sci.* 2016; 4:2:25. eCollection 2016.

5. dos Santos AC, Akkari AC, Ferreira IR, Maruyama CR, Pascoli M, Guilherme VA, de Paula E, Fraceto LF, de Lima R, Melo Pda S, de Araujo DR. Poloxamer-based binary hydrogels for delivering tramadol hydrochloride: sol-gel transition studies, dissolution-release kinetics, in vitro toxicity, and pharmacological evaluation. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:2391-401.

6. Nicholson B. Benefits of extended-release opioid analgesic formulations in the treatment of chronic pain. *Pain Pract.* 2009;9(1):71–81.

7. Salman M.A. et al. Tramadol encapsulated into polyhydroxybutyrate microspheres: in vitro release and epidural analgesic effect in rats, *Acta Anaesthesiol Scand*, 2003; 47: 1006-1012.

8. Fisher A, Watling M, Smith A, Knight A. Pharmacokinetic comparisons of three nasal fentanyl formulations; pectin, chitosan and chitosan-poloxamer 188. *Int. J. Clin. Pharmacol.* 2010: 138-145.

9. Dumortier G, Grossoid JL, Agnely F, Chaumeil JC. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm Res.* 2006; 23(12): 2709–2728.

10. Klouda L, Mikos AG. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008; 68(1):34–45.

11. Souza MJ, Greenacre CB, Cox SK. Pharmacokinetics of orally administered tramadol in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Am J Vet Res.* 2008; 69(8):979-82.

12. Barter LS. Rabbit analgesia. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 2011;14(1):93-104.



13. Calafatti SA, de Macedo M, Papini JZB, Coelho E, Cereda CMS, Pedrazzoli Júnior J, de Paula E, de Araujo DR, Tofoli GR. Pre-Clinical Pharmacokinetics of Sufentanil-2-Hydroxypropyl-B-Cyclodextrin Inclusion Complex. *Int J Anesthetic Anesthesiol*, 2016; 3:049
14. Moshiri M, Mohammadpour AH, Vahabzadeh M, Etemad L, Memar B, Hosseinzadeh H. Evaluating the effects and safety of intravenous lipid emulsion on haloperidol-induced neurotoxicity in rabbit. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:949262.
15. Hayashida M, Fukunaga A, Hanaoka K. An animal model for surgical anesthesia and analgesia: characterization with isoflurane anesthesia and remifentanil analgesia. *Anesth Analg*. 2003; 97(5):1340-6.
16. Mather LE, Copeland SE, Ladd LA. Acute toxicity of local anesthetics: underlying pharmacokinetic and pharmacodynamic concepts. *Reg Anesth Pain Med*. 2005; 30(6):553-66.
17. Kizilbash A, Ngô-Minh CT. Review of extended-release formulations of Tramadol for the management of chronic non-cancer pain: focus on marketed formulations. *J Pain Res*. 2014; 24(7):149-61.
18. Martini C, Olofsen E, Yassen A, Aarts L, Dahan A. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling in acute and chronic pain: an overview of the recent literature. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2011; 4(6):719-28.
19. Dershwitz M, Walsh JL, Morishige RJ, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled versus intravenous morphine in healthy volunteers. *Anesthesiology* 2000; 93:619–628.

20. Lötsch J, Skarke C, Schmidt H, et al. The transfer half-life of morphine-6-beta-glucuronide from plasma to effect site assessed by pupil size measurement in healthy volunteers. *Anesthesiology* 2001; 95:1329–1338.
21. Skarke C, Darimont J, Schmidt H, et al. Analgesic effects of morphine and morphine-6-glucuronide in a transcutaneous electrical pain model in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 2003;73:107–121.
22. Larson MD. Mechanism of opioid-induced pupillary effects. *Clinical Neurophysiology* 2008; 119: 1358–1364.

#### 4. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, podemos concluir que F2 (TR 2% + PL 407 20% + PL 188 10%), apresentou melhor perfil farmacocinético e farmacodinâmico que as outras formulações. A formulação F2 apresentou maiores concentrações plasmáticas por período mais longo que as outras formulações, e, estas concentrações têm correlação com a intensidade do efeito biológico do tramadol medido pela miose. O perfil farmacocinético de F4 (TR 2% + PL 407 20%) também foi característico de liberação sustentada, porém não houve correlação entre concentrações plasmáticas de TR e M1 e efeito biológico mais acentuado.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMMAR HO, GHORAB M, EL-NAHHAS SA, KAMEL R. Design of a transdermal delivery system for aspirin as an antithrombotic drug. **Int J Pharm**, v.327, n.1-2, p.81-8, 2006.

ANDRADE, V.É.; BARBOSA, H. H.; BARICHELO, E. Avaliação da dor em pós-operatório de cirurgia cardíaca. **Acta Paul Enferm.**, v. 23, n.2, p. 224-9, 2010.

ANTI, S. M. A., GIORGI, R. D. N., CHAHADE, W.H., Steroidal antiinflammatory drugs: glucocorticoids. **Einstein**.v.6 n. 1, p.159-65, 2008.

ANTMAN, E.M, BENNETT, J.S, DAUGHERTY, A, FURBERG, C, ROBERTS, H, TAUBERT, K.A. Use of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update for clinician a scientific statement from **the American Heart Association**. v. 115, p.1634-1642, 2007.

ANUMOLU SS, SINGH Y, GAO D, STEIN S, SINKO PJ. Design and evaluation of novel fast forming pilocarpine-loaded ocular hydrogels for sustained pharmacological response. **J Control Release**. V.137, n.2, p.152-9, 2009.

ARAÚJO, G. L.; LIMA, F. M. D. ; SAMPAIO, F. R.; PEREIRA, M. S.L. Escala de Locus de controle da dor: adaptação e confiabilidade para idosos Pain Locus of control scale: adaptation and reliability for elderly. **Rev Bras Fisioter.**, v. 14, n. 5, p. 438-45, 2010.

BARTER LS. Rabbit analgesia. **Vet Clin North Am Exot Anim Pract**. v. 14 n. 1 ,p. 93-104, 2011.

BASSANEZI, B. S. B.; FILHO, O. G. A. Analgesia pós-operatória. **Rev. Col. Bras.**, v.33, n.2, p. 116-122, 2006.

BATRAKOVA EV, KABANOV AV. Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. **J Control Release**. v.130, n. 2, p.98-106, 2008.

BAVARESCO, L; BERNARDI, A; BATTASTINI, A. M. O. Glicocorticóides: usos clássicos e emprego no tratamento do câncer. **Infarma**. v.17, p. 7- 9, 2005.

BECH,N.H., HULST,A.H., SPUIJBROEK,J.A., VANLEUKEN,L.L., Perioperative pain management in hip arthroscopy; what options are there?. **J Hip Preserv Surg**. v.3, n.3, p.181-9, 2016.

BESSON, J.M. The complexity of physiopharmacologic aspects of pain. **Drugs**. v. 53, n. 2, p.1-9, 1997.

BLONDER JM, BAIRD L, FULFS JC, Rosenthal GJ. Dose-dependent hyperlipidemia in rabbits following administration of poloxamer 407 gel. **Life Sci.** v.65, n.21, p.261-6, 1996.

CALAFATTI SA, DE MACEDO M, PAPINI JZB, COELHO E, CEREDA CMS, PEDRAZZOLI JÚNIOR J, DE PAULA E, DE ARAUJO DR, TOFOLI GR. Pre-Clinical Pharmacokinetics of Sufentanil-2-Hydroxypropyl-B-Cyclodextrin Inclusion Complex. **Int J Anesthetic Anesthesiol**, v. 3, p.049, 2016.

CAMPAGNOLO, A.M., TSUJI, D.H., SENNES, L.H., IMAMURA, R. Injeção de corticosteróide em patologias vocais inflamatórias crônicas, revisão da literatura. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.** v.74, n.6, 2008.

CARACENI A ET AL. Use of opioid analgesics in the treatment of cancer pain: evidence-based recommendations from the EAPC. **Lancet Oncol.** v.13,n. 2, p.58-68, 2012.

CARPENTER KJ, DICKENSON AH. Molecular aspects of pain research. **The Pharmacogenomics.** v. 2, p.87-95, 2002.

CARVALHO, W. A; LEMÔNICA, L. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória. Modulação periférica e avanços terapêuticos. **Rev Bras Anesthesiol.** v. 48, n. 2, p. 137 – 158, 1998.

CHOY YB, PATEL SR, PARK JH, MCCAREY BE, EDELHAUSER HF, PRAUSNITZ MR. Mucoadhesive microparticles in a rapidly dissolving tablet for sustained drug delivery to the eye. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v. 52, n.5, p.2627-33, 2011.

CLARK, A.K., MALCANGIO, M. Microglial signalling mechanisms: Cathepsin S and Fractalkine. **Exp Neurol.** v. 234, n.2, p. 283-92, 2012.

COLLER, J. K, MICHALAKAS, J. R, JAMES, H. M, FARQUHARSON, A.A.R.O.L. Inhibition of CYP2D6- mediated tramadol O-demethylation in methadone but not buprenorphine maintenance patients. **Journal of Clinical Pharmacology.** v. 74, n. 5, p. 835–841-835, 2012.

DAHLMAN D, ABRAHAMSSON T, KRAL AH, HAKANSSON A. Nonmedical Use of Antihistaminergic Anxiolytics and Other Prescription Drugs among Persons with Opioid Dependence. **Rev Bras Anesthesiol.** v. 61, n. 2, p. 202 – 210, 2011.

DAVIS, M.P., MEHTA, Z. Opioids and Chronic Pain: Where Is the Balance? **Curr Oncol Rep.** v.18, n.12, p.71, 2016.

DELLAROZA, G. S.; FURUYA, K. R.; CABRERA, S. A. M.; MATSUO, T.; TRELHA, C.; YAMADA, K.; PACOLA, L. Caracterização da dor crônica e métodos analgésicos analgésicos utilizados utilizados por idosos da comunidade. **Rev Assoc Med Bras.**, v.54, n.1, p. 36-41, 2008.

DERSHWITZ M, WALSH JL, MORISHIGE RJ, ET AL. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled versus intravenous morphine in healthy volunteers. **Anesthesiology** v.93, p.619–628, 2000.

DOS SANTOS AC, AKKARI AC, FERREIRA IR, MARUYAMA CR, PASCOLI M, GUILHERME VA, DE PAULA E, FRACETO LF, DE LIMA R, MELO PDA S, DE ARAUJO DR. Poloxamer-based binary hydrogels for delivering tramadol hydrochloride: sol-gel transition studies, dissolution-release kinetics, in vitro toxicity, and pharmacological evaluation. *Int J Nanomedicine*. v. 10, p. 2391-401, 2015.

DUARTE, D. F. Opium and Opioids: A Brief History. **Rev Bras Anesthesiol**. v. 55, n. 1, p. 135 – 146, 2005.

DUMORTIER G, GROSSIORD JL, AGNELY F, CHAUMEIL JC. A review of poloxamer 407

EGUCHI M. Recent advances in selective opioid receptor agonists and antagonists. **Med. Res. Rev.** v.24, p.182-212, 2004.

FERREIRA, S.H. Peripheral analgesic sites of action of anti-inflammatory drugs. **Int J Clin Pract Suppl**. P. 2-10, 2002.

FISHER A, WATLING M, SMITH A, KNIGHT A. Pharmacokinetic comparisons of three nasal fentanyl formulations; pectin, chitosan and chitosan-poloxamer 188. **Int. J. Clin. Pharmacol**. p. 138-145, 2010.

FODA NH, EL-LAITHY HM, TADROS MI. Implantable biodegradable sponges: effect of interpolymer complex formation of chitosan with gelatin on the release behavior of tramadol hydrochloride. **Drug Dev Ind Pharm**. v.33, n.1, p.7-17, 2007.

FORNASARI D. Pain pharmacology: focus on opioids. **Clin Cases Miner Bone Metab**. v.11, n.3, p.165-8, 2014.

GRACE, P. M, HUTCHINSON, M. R, STEVEN F, MAIER, S. F, WATKINS, L.R. Pathological pain and the neuroimmune interface. **Macmillan Publishers Limited**. v.14, p. 217-231, 2014.

GRILLO R, DE MELO NF, DE ARAÚJO DR, DE PAULA E, ROSA AH, FRACETO LF. Polymeric alginate nanoparticles containing the local anesthetic bupivacaine. **J Drug Target**. v.18, n.9,p. 688-99, 2010.

GROND S, SABLITZKI A. Clinical pharmacology of tramadol. **Clin Pharmacokinet**. v. 43, n. 13, p. 879-923, 2004.

HAMILTON,T.W., ATHANASSOGLU,V., TRIVELLA,M., STRICKLAND,L.H., MELLON,S ., MURRAY,D., PANDIT, H.G. Liposomal bupivacaine peripheral nerve block for the management of postoperative pain. **Cochrane Database Syst Rev**.v.8, p. 011476, 2006.

HARVEY, R.A. Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology. 5 edn: **Lippincott Williams & Wilkins**, 2011.

HAYASHIDA M, FUKUNAGA A, HANAOKA K. An animal model for surgical anesthesia and analgesia: characterization with isoflurane anesthesia and remifentanil analgesia. **Anesth Analg.** v. 97, n. 5, p.1340-6, 2003.

HOKETT SD, CUENIN MF, O'Neal RB, Brennan WA, Strong SL, Runner RR, McPherson JC, Van Dyke TE. Pluronic polyol effects on human gingival fibroblast attachment and growth. **J Periodontol.** v.71, n. 5, p. 803-9, 2000.

JACKSON JK, SPRINGATE CM, HUNTER WL, BURT HM. Neutrophil activation by plasma opsonized polymeric microspheres: inhibitory effect of pluronic F127. **Biomaterials.** v.21, n. 14, p. 1483-91, 2000.

JOINT WORKING GROUP ON REFINEMENT. Joint Working Group on Refinement: Removal of blood from laboratory mammals and birds. **Lab. Anim.** v. 27, p.1-22, 1993.

KABANOV, A.V., BATRAKOVA, E.V., ALAKOV, V.Y. Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. **J. Control. Rel.** v.82, p. 189-212, 2002.

KIMURA M1, OBATA H, SAITO S. Antihypersensitivity effects of tramadol hydrochloride in a rat model of postoperative pain. **Anesth Analg.** v. 115, n.2, p. 443-9, 2012.

KIZILBASH A, NGÔ-MINH CT. Review of extended-release formulations of Tramadol for the management of chronic non-cancer pain: focus on marketed formulations. **J Pain Res.** v.24, n. 7 ,p. 149-61, 2014.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F. ; SILLAS, T. Nociceptores: as células que sentem dor - Dor On Line. **Archives of Veterinary Science.** v. 13, n.1, p.1-12, 2008.

KLOUDA L, MIKOS AG. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications Eur. **J. Pharm. Biopharm.** V.68, p.34-45, 2008.

KRAYCHETE, D.C, SAKATA, R. C. Uso e rotação de opióides para dor crônica não oncológica. **Revista Brasileira de Anestesiologia.** v. 62, n. 4, p. 558-562, 2012.

KUMAR P, SINGH S, MISHRA B. Development and biopharmaceutical evaluation of extended release formulation of tramadol hydrochloride based on osmotic technology. **Acta Pharm.** v. 59, n.1, p.15-30, 2009.

LAI, J; GOLD, M.S; KIM, C.S . Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin-resistant sodium channel, **Nav1.8. Pain.** v. 95, p143-152, 2002.

LAMONT, L. A; TRANQUILLI, W. J. Physiology of Pain. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v.30, n. 4, p. 703-728, 2000.

LARSON MD. Mechanism of opioid-induced pupillary effects. **Clinical Neurophysiology**. v.119, p.1358–1364, 2008.

LEPPERT W. CYP2D6 in the metabolism of opioids for mild to moderate pain. **Pharmacology**. v. 87, n. 5-6, p.274-85, 2011.

LEPPERT W. Tramadol as an analgesic for mild to moderate cancer pain. **Pharmacol Rep**. v. 61, n.6, p. 978-92, 2009.

LIU, CB, GONG,CY, PAN,YF., ZHANG,YD, WANG, JW., HUANG, MJ, WANG, YS, WANG, K, GOU, ML, TU, MJ, WEI, YQ, QIAN. YZ. Synthesis and characterization of a thermosensitive hydrogel based on biodegradable amphiphilic PCL-Pluronic (L35)-PCL block copolymers. **Coll. Surf. A. Physicochem. Eng. Aspects**. v. 302, p. 430–438, 2007.

LONGUI, C. A. Glucocorticoid therapy: minimizing side effects. **Jornal de Pediatria**. v. 83, n. 5, 2007.

LORENZINI KI, DAALI Y, DAYER P, DESMEULES J. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of opioids in healthy human volunteers. a minireview. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**. v. 110 n. 3, p. 219-26, 2012.

LÖTSCH J, SKARKE C, SCHMIDT H, ET AL. The transfer half-life of morphine-6-beta-glucuronide from plasma to effect site assessed by pupil size measurement in healthy volunteers. **Anesthesiology**. v.95, p. 1329–1338, 2001.

LÖTSCH J. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of opioids. **J Pain Symptom Manage**.v. 29, p. 90-103, 2005.

MANCHIKANTI L, AILINANI H, KOYYALAGUNTA D, DATTA S, SINGH V, ERIATOR I, SEHGAL N, SHAH R, BENYAMIN R, VALLEJO R, FELLOWS B, CHRISTO PJ. A systematic review of randomized trials of long-term opioid management for chronic non-cancer pain. **Pain Physician**. v.14, n. 2, p. 91-121, 2011.

MARTINI C, OLOFSEN E, YASSEN A, AARTS L, DAHAN A. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling in acute and chronic pain: an overview of the recent literature. **Expert Rev Clin Pharmacol**. v. 4, n. 6, p.719-28, 2011.

MARTINS R. T, ALMEIDA D. B, MONTEIRO F. M.R, KOWACS P. A, RAMINA R. Opioid receptors to date. **Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor**. v. 13, n. 1, p. 75-9, 2012.



MATHER LE, COPELAND SE, LADD LA. Acute toxicity of local anesthetics: underlying pharmacokinetic and pharmacodynamic concepts. **Reg Anesth Pain Med.** v. 30, n.6, p. 553-66, 2005.

MATTIA C, COLUZZI F. TRAMADOL. Focus on musculoskeletal and neuropathic pain. **Minerva Anesthesiol.** V.71, n.10, p.565-84, 2005.

MESSLINGER, K. Patofisiologia da dor. **Anaesthesist,** v. 46, n. 2, p. 142-53, 1997.

MICHEL BATLOUNI, M. Anti-Inflammatory Drugs: Cardiovascular, Cerebrovascular and Renal Effects. **Arq Bras Cardiol.** v.94, n. 4, p . 556-563, 2010.

MICHEL MC, OKUTSU H, NOGUCHI Y, SUZUKI M, OHTAKE A, YUYAMA H, YANAI-INAMURA H, UKAI M, WATANABE M, SOMEYA A, SASAMATA M. In vivo studies on the effects of alpha1-adrenoceptor antagonists on pupil diameter and urethral tone in rabbits. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* V.372, n.5, p.346-53, 2006.

MINAMI K, OGATA J, UEZONO Y. What is the main mechanism of tramadol? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* V. 388, n.10, p. 999-1007, 2015.

MINAMI K, UEZONO Y, UETA Y. Pharmacological aspects of the effects of tramadol on G-protein coupled receptors. **J Pharmacol Sci.** v.103, n.3, p. 253-60, 2007.

MORALES ME, RUIZ MA, LÓPEZ G, GALLARDO V. Development of oral suspensions of microparticles of ethylcellulose with tramadol. **Drug Dev Ind Pharm.** V.36, n.8, p.885-92, 2010.

MOSHIRI M, MOHAMMADPOUR AH, VAHABZADEH M, ETEMAD L, MEMAR B, HOSSEINZADEH H. Evaluating the effects and safety of intravenous lipid emulsion on haloperidol-induced neurotoxicity in rabbit. **Biomed Res Int.** v. 2014, p. 949262 , 2014.

MUIR III, W. W.; HUBBELL, J. A. E.; SKARDA, R. T.; BEDNARSKI, R. M. **Manual de anestesia veterinária.** Artmed. p. 242-249, 2001.

MÜLLER C, JACOBSON K. A. Xanthines as Adenosine Receptor Antagonists **Handb Exp Pharmacol.** v. 200, n. 10, p.1007/978-3-642-13443-2, 2011.

MURRAY RB, ADLER MW, KORCZYN AD. The pupillary effects of opioids. *Life Sci.* v. 33, n.6, p. 495-509, 1983.

NICHOLSON B. Benefits of extended-release opioid analgesic formulations in the treatment of chronic pain. **Pain Pract.** V. 9, n.1, p. 71-81, 2009.

PATEL BN, SHARMA N, SANYAL M, SHRIVASTAV PS. An accurate, rapid and sensitive determination of tramadol and its active metabolite O-desmethyltramadol in human plasma by LC-MS/MS. **J Pharm Biomed Anal.** V.49, n.2, p.354-66, 2009.

PETERSON K, MCDONAGH M, THAKURTA S, DANA T, ROBERTS C, CHOU R, HELFAND M. Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs (NSAIDs). **In Drug Class Review: Final. Drug Class Reviews.** 2010.

PIRES, O. C, ASHMAWI, H. A, CONSTANTINO, E, PELOGIA, N. C. C, POSSO, I.P. Antagonistas serotoninérgico e noradrenérgico por via subaracnoidea aumentam a resposta álgica em ratos. **Rev Bras Anesthesiol.** V. 61, N. 2, P. 202-210, 2010.

PISERA, D. Fisiologia da dor. In: *Dor Avaliação e Tratamento em Pequenos Animais.* p. 30-74, 2005.

PRECLIK, G; STRANGE E.F; DITSCHUNEIT, H. PGE2 secretion from organ cultured gastric mucosa: correlation with cyclooxygenase activity and endogenous substrate release. *Rev Med.* v.83 n. 3-4 p 69-113, 2008.

PRZEWLOCKI, R. Opioids in chronic pain. **European Journal of Pharmacology.** v.249, p. 79-91, 2001.

PUNCHARD N, WHELAN C, ADCOCK I. The Journal of Inflammation. **Journal of Inflammation.** P.1:1, 2004.

RAFFA RB, FRIDERICHS E, REIMANN W, SHANK RP, CODD EE, VAUGHT JL. Opioid and nonopioid components independently contribute to the mechanism of action of tramadol, an 'atypical' opioid analgesic. **J Pharmacol Exp Ther.** V. 260, n.1, p. 275-85, 1992.

ROCHA, A. P. C, LEMONICA, L, BARROS, G. A. M. Intrathecal Drugs for Chronic Pain Control. **Rev Bras Anesthesiol.** V. 52, N. 5, P. 628 – 643, 2002.

SALMAN MA, SAHIN A, ONUR MA, OGE K, KASSAB A, AYPAR U. Tramadol encapsulated into polyhydroxybutyrate microspheres: in vitro release and epidural analgesic effect in rats. **Acta Anaesthesiol Scand.** V.47, n.8, p.1006-12, 2003.

SANTOS, O. D. T.; ESTRELA, G. T.; AZEVEDO, F. L.V.; OLIVEIRA, C. E. O. ; JUNIOR, O.G.; FOGUEIREDO, S. G. Uso do Tramadol Venoso e Subcutâneo em Herniorrafia Inguinal . **Rev Bras Anesthesiol.**, v. 60, n.5, p. 522-527, 2010.

SATOH H, MINAMI M. Molecular pharmacology of the opioid receptors. **Pharmacol. Ther.** V.68, p.343-364, 1995.

SCHAEFER, C. P, ADAMS, E. H , UDALL, M , MASTERS, E. T , RACHAEL M. MANN, R. M , SHOSHANA R. D , HEATHER. J, ELROY, M. C , JOSEPH C. CAPPELLERI, J.C , ANDREW G. CLAIR, A. G , MARKAY HOPPS, M ,ST A.U.D, R, PHILIP, M. Fibromyalgia Outcomes Over Time: Results from a Prospective Observational Study in the United States. **The Open Rheumatology Journal** , V.10, P. 109-121, 2016.

SHARMA, R. K ; SINGH, B ; SAHOO, A. **Effect of pharmaceuticals on thermoreversible gelation of PEO-PPO-PEO copolymers.** *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* v.63, n.2, p.229-35, 2008.

SINGH I, KUMAR P, PAHUJA S, TUNG V, ARORA S. Development and pharmacological evaluation of cyclodextrin complexes of etoricoxib. *Acta Pol Pharm.* 2011; 68(2):279-84.

SINGH-JOY SD, MCLAIN VC. Safety assessment of poloxamers 101, 105, 108, 122, 123, 124, 181, 182, 183, 184, 185, 188, 212, 215, 217, 231, 234, 235, 237, 238, 282, 284, 288, 331, 333, 334, 335, 338, 401, 402, 403, and 407, poloxamer 105 benzoate, and poloxamer 182 dibenzoate as used in cosmetics. *Int J Toxicol.* V.27, n.2, p.93-128, 2008.

SKARKE C, DARIMONT J, SCHMIDT H, et al. Analgesic effects of morphine and morphine-6-glucuronide in a transcutaneous electrical pain model in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* v.73, p.107–121, 2003

SMITH HS, MEEK PD. Pain responsiveness to opioids: central versus peripheral neuropathic pain. *J Opioid Manag.* V.5, p. 391-400, 2011.

SOUSA, A.M., FRANCO,P.A.B., ASHMAWI, H.A., POSSO,I. P. Local Effect of Tramadol on Formalin Evoked Flinching Behavior in Rats. *Rev Bras Anesthesiol.* V. 58, n. 4, p.371-379, 2008.

SOUZA MJ, GREENACRE CB, COX SK. Pharmacokinetics of orally administered tramadol in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Am J Vet Res.* v. 69, n. 8, p. 979-82, 2008.

SOUZA MJ, GREENACRE CB, COX SK. Pharmacokinetics of orally administered tramadol in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Am J Vet Res.* V.69, n.8, p.979-82, 2008.

STEVENS CW. Alternatives to the use of mammals for pain research. *Life Sci.* v. 50, p. 901-912, 1992.

STOICEA N, RUSSELL D, WEIDNER G, DURDA M, JOSEPH NC, YU J, BERGESE SD. Opioid-induced hyperalgesia in chronic pain patients and the mitigating effects of gabapentin. *Front Pharmacol.* V. 27, N. 6, P.104, 20015.

SZKUTNIK-FIEDLER D, BALCERKIEWICZ M, SAWICKI W, GRABOWSKI T, GRZEŚKOWIAK E, MAZGALSKI J, URJASZ H. In vitro - in vivo evaluation of a new oral dosage form of tramadol hydrochloride-controlled-release capsules filled with coated pellets. *Acta Pol Pharm.* V.71, n.3, p.469-75, 2014.

TAKHTFOOLADI,H.A., ASL,A.H.K., MEHRAN SHAHZAMANI,M., TAKHTFOOLAD,M.A., AMIN ALLAHVERD,A., KHANSARI, M. Tramadol Alleviates Myocardial Injury Induced by Acute Hindlimb Ischemia Reperfusion in Rats Hamed. *Arq Bras Cardiol.* V.105 (2):151-159, 20015.

TAMBORELLI, V.; COSTA, F.A.; PEREIRA, V.V.; TORTURELLA, M. The role of nursing and physiotherapy on managing the pain of geriatric patients with terminal disease. **Geriatrics & Gerontologia.**, v. 4, n.3, p. 146-153, 2010.

TANAKA H, NAITO T, MINO Y, KAWAKAMI J. Validated determination method of tramadol and its desmethylates in human plasma using an isocratic LC-MS/MS and its clinical application to patients with cancer pain or non-cancer pain. **J Pharm Health Care Sci.** v.4, n.2, p. 25, 2016.

TRANQUILLI, W. J. Fisiologia da dor aguda. **Artmed.** p. 399-402, 2004.

VAN DEN BEUKEN-VAN EVERDINGEN, M.H., DE GRAEFF, A., JONGEN, J.L., DIJKSTRA, D., MOSTOVAYA, I., VISSERS, K.C. National guideline working group "Diagnosis treatment of cancer pain". Pharmacological Treatment of Pain in Cancer Patients: The Role of Adjuvant Analgesics, a Systematic Review. **Pain Pract.** v.10, n.1111, p.12459, 2016.

VARSHOSAZ J, TAVAKOLI N, KHEIROLAHI F. Use of hydrophilic natural gums in formulation of sustained-release matrix tablets of tramadol hydrochloride. **AAPS PharmSciTech.** V.17, n.7, p.1:E24, 2006.

WAY WL, WAY EL, FIELDS HL. IN: KATZUNG, B. G. Farmacologia Básica & Clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

WELHAM, S. J. M; SPARROW, A. J; GARDNER, D. S; ELMES, M. J. Acetylsalicylic acid interferes with embryonic kidney growth and development by a prostaglandin-independent mechanism. **World J Nephrol.** v. 6 n. 1p. 21–28, 2017.

YESILYURT, O; SEYREK, M; GUNDUNZ, O; IDE, T; AKAR, A; ULUGOL, A; GUZEL, H; DOGRUL, A; GUNAYDIN, C. The false-positive responses of analgesic drugs to the intradermal serotonin- and compound 48/80-induced scratches as an animal **Acta Neurobiol Exp.** v. 76, p. 234–243, 2016.

YI S, CHUNG YJ, KIM TE, SHIN HS, YOON SH, CHO JY, JANG IJ, SHIN SG, YU KS. Pharmacokinetics of Extended-Release Versus Conventional Tramadol/Acetaminophen Fixed-Dose Combination Tablets: An Open-Label, 2-Treatment, Multiple-Dose, Randomized- Sequence Crossover Study in Healthy Korean Male Volunteers. **Clin Ther.** V.33, n..6, p.728-37, 2011.

YOKAICHIYA F, ALKSCHBIRS MI, CAVALCANTI LP, FRANCO MKKD, ARAUJO DR. Small Angle X-ray Scattering and Reology Characterization of Drug Delivery System: Poloxamer 407 20 % with opioid anesthetic tramadol. 38th World Meeting on Pharmaceutics, **Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology.** 19th to 22nd March 2012, Istanbul-Turkey.

YU L, DING J. Injectable hydrogels as unique biomedical materials. **Chem Soc Rev.** v.37, n.8, p.1473-81, 2008.

## 6. ANEXOS

## Anexo 1- Comprovante do Comitê de Ética em Pesquisa



**COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL EM PESQUISA - CEUA**



Bragança Paulista, 25 de Abril de 2013

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

**Projeto de Pesquisa:** AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA DE TRAMADOL EM FORMULAÇÕES DE POLAXAMERS NO CONTROLE DE DOR PÓS-OPERATÓRIA.

**ÁREA DE CONHECIMENTO:** Saúde e Biológicas

**Autor(es):** Prof<sup>ª</sup> Dra. Giovana Tofoli

**Instituição:** UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

**Protocolo:** 002.04.2013

Prezado(a)s Pesquisador(a)s,

O Comitê de Ética em Pesquisa com Uso de Animais de Pesquisa– CEUA, da Universidade São Francisco, analisou em reunião ordinária no dia 25/04/2013 o projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

**Parecer:** Aprovado

**Alessandra Gambero**

**Vice-Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa  
Universidade São Francisco**

Campus Bragança Paulista  
Campus Campinas - Unidade Cambuí  
Campus Campinas - Unidade Swift  
Campus Itatiba  
Campus São Paulo

Av. São Francisco de Assis, 218 - Jd. São José - CEP 12916-900 / Tel.: 11 2454.8000 / Fax: 4034.1825  
R. Cel. Silva Teles, 700 prédio C - Cambuí - CEP 13024-001 / Tel.: 19 3779.3370  
R. Waldemar César da Silveira, 105 - Swift - CEP 13045-510 / Tel.: 19 3779.3300 / Fax: 3779.3321  
R. Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - Centro - CEP 13251-900 / Tel.: 11 4534.8000 / Fax: 4534.8015  
R. Antonieta Leitão, 129 - Freguesia do Ó - CEP 02925-160 / Tel.: 11 3411.2950 / Fax: 3411.2978