

**Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan**  
**Programa de Pós-graduação *Lato Sensu***  
**Curso de Especialização em Biotérios**

**Giuliana Gaggini Rondon**

**Utilização de analgesia no teste de dose letal 50% do veneno de *Tityus*  
*serrulatus***

**São Paulo**  
**2022**

**Giuliana Gaggini Rondon**

**Utilização de analgesia no teste de dose letal 50% do veneno de *Tityus serrulatus***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Biotérios do Programa de Pós-graduação *Lato Sensu* da Escola Superior do Instituto Butantan como requisito básico para a obtenção do título de Especialista em Biotérios.

Orientadora: Milene Schmidt do Amaral Luna

**São Paulo**

**2022**

**Catálogo na Publicação**  
**Instituto Butantan**  
**Dados inseridos pelo(a) aluno(a)**

Rondon, Giuliana Gaggini

Utilização de analgesia no teste de dose letal 50% do veneno de *Tityus serrulatus* / Giuliana Gaggini Rondon ; orientador(a) Milene Schmidt do Amaral Luna - São Paulo, 2022.

43 p. : il.

Monografia (Especialização) - Instituto Butantan, Programa de Pós-Graduação Lato Sensu - Especialização em biotérios.

1. Dose letal 2. *Tityus serrulatus*. 3. Bem-estar animal. 4. Analgesia I. Luna, Milene Schmidt do Amaral . II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Programa de Pós-Graduação Lato Sensu - Especialização em biotérios. IV. Título.

Esta monografia foi elaborada com base no **Guia prático para elaboração de trabalho acadêmico** desenvolvido pela Biblioteca do Instituto Butantan, de acordo com as normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

## AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO


Eu, Giuliana Gaggini Rondon aluna do Curso de Especialização em Biotérios, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
- 06 meses
- 12 meses
- Outro prazo \_\_\_\_\_ Justifique:

São Paulo, 03 de março de 2022

  
.....  
Giuliana Gaggini Rondon

De acordo:   
.....  
Orientador(a): Milene Schmidt do Amaral Luna

## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora Milene pela parceria e toda ajuda durante os experimentos.

A Renata Reis pela paciência e ajuda.

A Hajer Aounallah e Regis Castilho pelo apoio e incentivo.

A minha família por todo apoio e companheirismo.

Aos amigos e professores do curso pela agradável convivência.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

“Que a vida deles não tenha sido em vão  
Para cada coração que parou  
Que outros possam continuar a bater  
E a cada nova descoberta  
Que usemos menos  
As boas almas”.

(Rondon, 2017)

## RESUMO

RONDON, Giuliana. **Utilização de analgesia no teste de Dose Letal 50% do veneno de *Tityus serrulatus***. 2022. 43 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotérios) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2022.

Acidentes com animais peçonhentos são de grande importância no mundo todo. No Brasil os estados mais afetados são Minas Gerais, São Paulo e Bahia, e mais da metade desses acidentes ocorrem por picadas de escorpiões. Contando com mais de 160 espécies no país, o principal responsável por tais acidentes é o *Tityus serrulatus*. A melhor forma de tratamento para ocorrências com esses animais é a utilização do soro, que é produzido a partir do sangue de cavalos imunizados com o veneno. Para que um produto como esse seja utilizado pela população, ele deve ser aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Que solicita uma série de testes a serem realizados, como por exemplo testes de esterilidade, pH, proteínas, atividades e potência in vitro e in vivo. Para executar o teste de potência, primeiro é preciso determinar a dose letal 50% do veneno. É sabido que o veneno é composto principalmente por neurotoxinas que acarretam diversas alterações clínicas além de poder levar a morte. Os animais utilizados em tais estudos estão em constante sofrimento e, assim, o objetivo desse estudo foi testar dois potentes analgésicos como forma de melhorar o bem-estar animal sem, é claro, alterar o resultado do teste. O estudo foi dividido em três grupos experimentais: controle; tramadol e morfina. Os animais receberam o analgésico 15 minutos antes do início do teste. Este estudo mostrou uma pequena melhora nos sintomas causados pelo envenenamento, ou seja, promoveu um maior conforto aos animais que receberam tratamento analgésicos, muito embora seja necessário realizar mais testes para refinar a técnica.

**Palavras-chave:** Dose letal. *Tityus serrulatus*. Bem-estar animal. Analgesia. Teste de potência.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Certifica de aprovação da comissão de ética no uso de animais do Instituto Butantan.....	16
Figura 2. Fluxograma do estudo.....	19
Figura 3. Comparação das DL50 dos testes 2 e 3. ....	28
Figura 4. Comparação dos intervalos de confiança, testes 2 e 3. ....	29
Figura 5. Comparação entre a DL50 de fêmeas e machos ( $p=0,056$ ) .....	29



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3Rs: reutilizar, refinar e reduzir

ANVISA: Agência Regulatória de Saúde Nacionais

BPF: Boas Práticas de Produção

BPL: Boas Práticas de Laboratório

CEUAIB: Comissão de ética no uso de animais do Instituto Butantan

DL50: Dose letal 50%

GQ: Garantia da Qualidade

IP: Intraperitoneal

PNI: Programa Nacional de Imunizações

SC: Subcutâneo

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1 Geral</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2 Específicos</b> .....	<b>15</b>
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1 Protocolo CEUA</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2 Modelo animal</b> .....	<b>17</b>
<b>3.3 Preparo do inóculo</b> .....	<b>17</b>
<b>3.4 Analgesia</b> .....	<b>18</b>
<b>3.5 Teste de DL50</b> .....	<b>18</b>
3.5.1 Critério de aceitação .....	19
<b>3.6 Metodologia</b> .....	<b>19</b>
3.6.1 Inoculação dos animais.....	19
3.6.2 Testes .....	20
3.6.3 Dados do histórico do Controle Biológico.....	20
<b>3.7 Análise estatística</b> .....	<b>20</b>
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>21</b>
<b>4.1 Teste 1</b> .....	<b>21</b>
4.1.1 Grupo Salina .....	21
4.1.2 Grupo Tramadol .....	21
4.1.3 Grupo Morfina .....	22
<b>4.2 Teste 2</b> .....	<b>23</b>
4.2.1 Grupo Salina .....	23
4.2.2 Grupo Tramadol .....	24
4.2.3 Grupo Morfina .....	25

<b>4.3 Teste 3</b> .....	<b>26</b>
4.3.1 Grupo Salina .....	26
4.3.2 Grupo Tramadol .....	26
4.3.3 Grupo Morfina .....	27
<b>4.4 Comparação das DL50</b> .....	<b>28</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>30</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>31</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>32</b>
<b>APÊNDICE(S)</b> .....	<b>34</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Todos os anos, ao redor do mundo, pessoas morrem decorrentes de acidentes envolvendo animais peçonhentos como cobras, aranhas e escorpiões (AMADO et al., 2021). E, por isso, o envenenamento é um assunto de grande interesse para a saúde pública.

Segundo o Ministério da Saúde, no ano de 2018, tivemos 265.663 casos de acidentes causados por animais peçonhentos no Brasil, sendo 59,1% (156.928) ocasionados por escorpiões. Esses animais sinatrópicos, são adaptados ao ambiente urbano, gostam de locais úmidos, que tenham acúmulo de lixo e entulho, e se alimentam basicamente de baratas (MINISTERIO DA SAÚDE, 2019)

No Brasil existem aproximadamente 160 espécies de escorpiões, mas apenas 4 são de interesse médico, todos do gênero *Tityus*. Entre esses o *Tityus Serrulatus* é o maior causador de acidentes, podendo, no caso de crianças, até levar a morte (ABRAHAO NENCIONI et al., 2018). Não existe um mês específico onde a incidência de acidentes seja maior, porém os estados mais afetados no Brasil são Minas Gerais, São Paulo e Bahia (MINISTERIO DA SAÚDE, 2019).

O veneno desses animais é composto por diversas toxinas, sendo as principais peptídeos e neurotoxina. Elas agem nos canais de sódio, causando despolarização, afetam os sistemas simpáticos e parassimpáticos, promovem a liberação de acetilcolina, noradrenalina e adrenalina (GALVANI et al., 2017; PUCCA et al., 2011). Causando assim, diversas alterações clínicas além de, em alguns casos, levar à morte (ABRAHAO NENCIONI et al., 2018; AMADO et al., 2021; CUPO, 2015). Segundo CUPO, (2015) os sinais clínicos apresentados são:

“De eritema, edema discreto e piloereção até dor local (que dependendo do indivíduo pode variar de moderada a intensa) e parestesia durante muitos dias. Além disso os venenos desses animais podem causar alterações sistêmicas como: miose, bradicardia, arritmias, hipotensão arterial, aumento das secreções lacrimais, nasais, salivares, pancreáticas, gástricas e brônquicas, diaforese, tremores, piloereção, espasmos musculares e aumento dos níveis de amilase no sangue. As manifestações secundárias à liberação de catecolaminas incluem midríase, arritmias cardíacas, taquicardia, hipertensão arterial, edema pulmonar agudo (EPA), insuficiência cardíaca e choque. A

descarga adrenérgica leva à hiperglicemia e leucocitose e contribui para a hipopotassemia.”

Com um quadro tão extenso e uma incidência considerável, é de suma importância que haja orientação da população além é claro, de tratamentos eficazes. A forma mais indicada de tratamento é a utilização do soro antiescorpiônico ou soro antiaracnídico. A utilização desses soros é indicada apenas em casos moderados a severos, e devem ser administrados por via intravenosa, por um período de 15 a 20 minutos, onde quantidade de ampolas pode variar de 3 a 6 unidades (CUPO, 2015).

Para que um produto seja utilizado em tratamentos humanos no Brasil, o mesmo deve ter a aprovação da agência regulatória de saúde nacional (ANVISA) e deve seguir os conceitos e parâmetros de acordo com as diretrizes preconizadas pelas Boas Práticas de Produção (BPF) e Boas Práticas de Laboratório (BPL), e realizar testes de esterilidade, pH, proteínas, atividades e potência (in vitro ou in vivo) devem ser realizados para garantir assim, um maior controle na qualidade e eficácia do mesmo (ANVISA, 2019).

Desde 1901, o Instituto Butantan (“O Instituto Butantan”, [s.d.]) é responsável por grande parte dos soros e vacinas produzidas no Brasil, e é considerado um dos maiores produtores de imunobiológicos voltados para a saúde pública. Seus produtos fazem parte do Programa Nacional de Imunizações (PNI) e são enviados ao Ministério da Saúde, que os distribui de forma estratégica e gratuita à população. (“O Instituto Butantan”, [s.d.]

Contando com um amplo complexo produtivo, centros de pesquisa e a Fazenda São Joaquim, o instituto investe no aprimoramento de processos e equipamentos para o desenvolvimento e produção de imunobiológicos. Essa estratégia visa garantir o abastecimento, a acessibilidade e o padrão de qualidade dos soros e vacinas produzidos objetivando, prioritariamente, a aprovação por agências regulatórias de saúde nacionais e internacionais, seguindo os conceitos e parâmetros de acordo com as diretrizes preconizadas pelas Boas Práticas de Produção (BPF) e Boas Práticas de Laboratório (BPL). A qualidade dos produtos fabricados no Instituto Butantan é de responsabilidade da área da Garantia da Qualidade (GQ). (“O Instituto Butantan”, [s.d.]

A garantia da qualidade dentro das indústrias farmacêuticas, no Instituto Butantan inclusive, segue legislações nacionais e internacionais das agências regulatórias de saúde atuando desde o desenvolvimento dos produtos, fabricação,

análise e fornecimento das utilidades da empresa, como por exemplo água e ar condicionado.

Nenhum produto é liberado para distribuição sem certificação de que o medicamento foi produzido e controlado de acordo com os registros e outros fatores relevantes. O Controle de Qualidade é uma das áreas responsáveis por essa certificação dentro da indústria farmacêutica, fazendo amostragem, especificações e testes, que comprovem a eficácia e a segurança de todos os produtos antes da distribuição para a população. (“O Instituto Butantan”, [s.d.]

Os soros produzidos pelo Instituto Butantan são obtidos a partir do sangue de cavalos imunizados, e contempla imunoglobulinas específicas capazes de neutralizar venenos específicos (ANVISA, 2019; CARMO et al., 2015). No caso do soro antiescorpiônico, os animais são imunizados com veneno de *T. serrulatus* (50%) e *T. bahiensis* (50%). Já o soro antiaracnídico é composto por veneno de *T. serrulatus* (57%), *Phoneutria nigriventer* (21.5%) e *Loxosceles gaucho* (21.5%) (VENANCIO et al., 2013).

Após a produção os soros e vacinas, entram para análise do controle de Qualidade Biológico em três diferentes etapas de produção (produto concentrado a granel, produto a granel e produto terminado) para assegurar a eficácia e a segurança dos lotes produzidos. Nas etapas de produto concentrado a granel e produto a granel são realizados os testes de potência e pirogênio e na etapa de produto terminado é realizado apenas o teste de pirogênio.

Para realizar o teste de potência dos soros antiofídicos e antiescorpiônico, é necessário primeiramente determinar a dose letal 50% (DL50) do veneno. Esse método determina a dose necessária de veneno para matar 50% da população em teste. Para determinação da DL50 do veneno escorpiônico são utilizados camundongos da linhagem swiss, que são inoculados com diferentes doses do veneno e a proporção de animais mortos/inoculados é registrada após 24 horas da inoculação. Com os resultados definidos para a DL50 do veneno estudado pode-se prosseguir com a execução do ensaio de potência do soro correspondente (ANVISA, 2019).

Com base no princípio dos 3Rs (reutilizar, refinar e reduzir) e no bem-estar animal, descritos por Russel e Burch, uma vez que não é possível lançar mão da substituição ou reutilização para os estudos de DL50, a melhor forma de refinamento é utilizar algum método que minimize ou alivie a dor e sofrimento dos animais,

(ROBINSON, [s.d.]). Isso posto, o presente estudo propõe introduzir um tratamento analgésico. Os fármacos de escolha foram o tramadol e a morfina, cuja literatura relata que não há alteração nos resultados dos testes de DL50 para o de veneno de *Bothrops asper* (HERRERA et al., 2018).

A farmacopeia Brasileira não preconiza qual o sexo dos animais deve ser utilizado em estudos de DL50, apenas a espécie (*Mus musculus*, linhagem swiss), idade (45 a 50 dias) e peso (17 e 20g). Um estudo comparativo entre fêmeas e machos com diferentes idades (28, 49 e 70 dias) foi realizado e constatou-se que, na idade estipulada pela farmacopeia, as fêmeas são menos sensíveis ao veneno de *T. serrulatus* do que os machos, já que a presença de estrogênio reduz a resposta inflamatória (PUCCA et al., 2011). Assim o objetivo do presente estudo é avaliar se o tratamento analgésico prévio a determinação do teste de DL50 do veneno de *T. serrulatus* é efetivo, e se há influências relacionadas ao sexo dos camundongos sobre a DL50 do veneno escorpiônico, podendo interferir ou não nos resultados do teste de DL50.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

O presente estudo tem como objetivo principal refinar o procedimento do teste que determina a dose letal 50% (DL50) para o veneno escorpiônico, através da utilização de analgesia preemptiva, de modo a reduzir o estresse e a dor dos animais utilizados.

### **2.2 Específicos**

- Avaliar se o tratamento analgésico interfere ou não no resultado do teste da DL50 para o veneno escorpiônico.
- Avaliar se há diferença de resposta relacionada ao sexo dos animais utilizados para determinar a DL50 para o veneno escorpiônico através de análise de resultados obtidos anteriormente.



### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Protocolo CEUA

Todos os animais utilizados nos experimentos passaram por aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB), protocolo nº 2828030818.

*Figura 1. Certifica de aprovação da comissão de ética no uso de animais do Instituto Butantan*



*Comissão de Ética no  
Uso de Animais*

São Paulo, 10 de setembro de 2021  
CEUA N 2828030818

Ilmo(a). Sr(a).  
Responsável: Patrícia Dos Santos Carneiro  
Área: Controle Biológico / Infectório

Título da proposta: "Determinação e aferição dos venenos ofídicos, escorpiônico e Ionômico (Protocolo CEUA Nº 1060/13 e 1061/13).".

**Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais IB** (ID 004798)

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 06/agosto/2021) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Ilma Sra. Dra. Maria Leonor Sarno de Oliveira DD. Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan Prezada, Comissão de Ética no Uso de animais do Instituto Butantan, os analgésicos serão inoculados por via subcutânea (SC) e os volumes dos analgésicos serão calculados com base no peso dos animais, para esta espécie é preconizado volumes de 1-3mL".

Comentário da CEUA: "".

**Animais a serem adicionados**

Origem:	Biotério Central		
Espécie:	Camundongos heterogênicos	sexo:	Machos ou Fêmeas
Linhagem:	Swiss	idade:	45 a 50 dias
		Peso:	17 a 20 g
		N:	375

**Pesquisador adicionado:**

E-mail: [giuliana.rondon@butantan.gov.br](mailto:giuliana.rondon@butantan.gov.br)

Nome: Giuliana Gaggini Rondon

Instituição: Instituto Butantan

Vínculo: Técnico de Nivel Superior

Experiência: Sim: 3 anos (ano)

Cv. Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7545043113703694>

Setor: Biologia Molecular

Telefone: 26279480

Nível: Aluno de graduação

Treinamento: Sim: 40 (hora)

Função: Executante



Maria Leonor Sarno de Oliveira  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Butantan



Nancy Ogulira  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Butantan

---

Av. Vital Brasil, 1500 - Butantã 05503-900 São Paulo, SP - tel: 55(11) 3723-2132 - ramal 2132  
Horário de atendimento: 2 ª a 6 ª das 09h às 11h e das 14h às 15h30 : e-mail: ceuaib@butantan.gov.br  
CEUA N 2828030818

Fonte: próprio autor, 2021

### 3.2 Modelo animal

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss, de 45 a 50 (n=75) dias de idade, com peso entre 17 e 20g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Os animais ficaram alojados em microisoladores, as gaiolas eram forradas com maravalha de madeira irradiada contendo até 5 animais/caixa. As condições ambientais para umidade relativa e temperatura na sala dos animais foram monitoradas e registradas durante todo o período de teste. Os animais receberam luz artificial com fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 de escuro com o mínimo de 10-20 trocas de ar por hora. Ração comercial própria para a espécie e água filtrada foram fornecidos *ad libitum* durante todo período de aclimação e teste.

### 3.3 Preparo do inóculo

Escorpiões recolhidos de áreas urbanas são enviados para o Biotério do Laboratório de Artrópodes do Instituto Butantan, passam por uma avaliação clínica de um médico veterinário capacitado, e são separados em caixas por espécie e por idade. Esses aracnídeos são alojados em viveiros coletivos (com no máximo 350 animais) e são alimentados com baratas e grilos, além de terem água disponível *ad libitum*.

De 3 em 3 meses, a região do telson (último segmento da metassoma) é estimulada eletricamente para a extração do veneno dos escorpiões, e o conteúdo é armazenado em um criotubo, congelado e enviado ao Núcleo Estratégicos de Venenos e Antivenenos (NEVAS). Lá é realizado o processo de pesagem, liofilização, loteamento, armazenamento e distribuição da amostra.

O Controle Biológico recebe esse material para realizar os estudos de qualidade, segurança e potência. Para o presente estudo, o lote de veneno de *Tityus serrulatus* utilizado foi Ts/V160002.

As amostras de veneno foram pré diluídas (1/10) em solução fisiológica 0,85%, até a concentração de 10 mg/ml e o fator de diluição utilizado foi 1,5. Após a pré diluição, o veneno foi diluído novamente em solução fisiológica 0,85% de acordo com a tabela a seguir:

Tabela 1. Diluição do veneno em solução fisiológica.

Frasco	Dose ( $\mu\text{g}$ de veneno/animal)	Sol. Veneno 1mg/ml (ml)	Sol. Fisiológica (ml)	Volume total (ml)
1	7,00	0,08	2,92	6
2	10,49	0,13	2,87	6
3	15,74	0,19	2,81	6
4	23,61	0,28	2,72	6
5	35,42	0,43	2,57	6

Fonte: próprio autor, 2021

As diluições foram realizadas em progressão geométrica, sendo o frasco/diluição número 1 o que contém a menor quantidade de veneno e o 5 a maior quantidade de veneno.

### 3.4 Analgesia

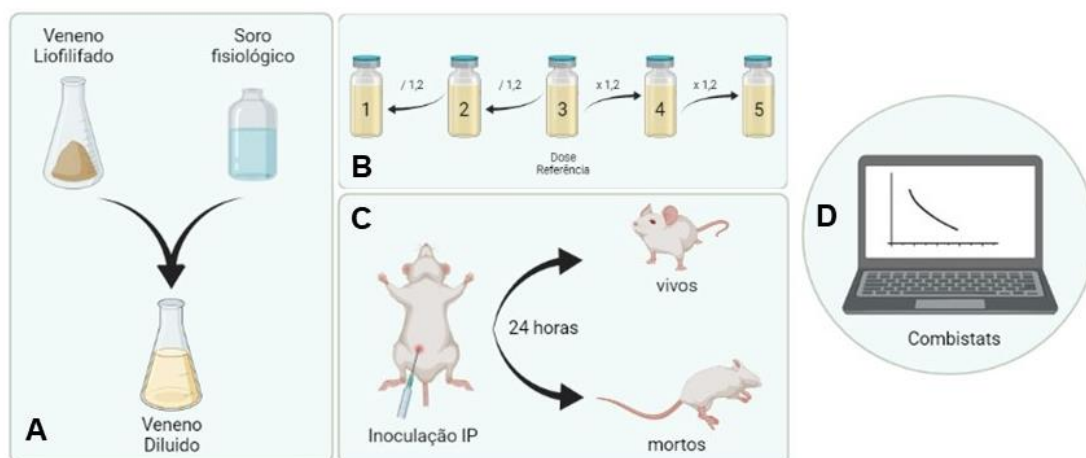
Os grupos experimentais receberam formulações comerciais de cloridrato de tramadol na concentração de 50 mg/mL (dose de 50mg/kg) ou cloridrato de morfina na concentração de 10 mg/ml (dose de 10 mg/kg) ou solução salina 0,85%. A administração foi feita pela via subcutânea, com uso de seringas e agulhas descartáveis, 15 minutos antes da inoculação do veneno para o teste da DL50 (GUTIÉRREZ; HERRERA, 2014)

Os analgésicos foram diluídos a fim de alcançar o volume de tratamento de 0,1ml por animal.

### 3.5 Teste de DL50

O teste da DL50 acontece da seguinte maneira: após o preparo (Figura 2) do inóculo de acordo com o item 3.3, 05 camundongos são inoculados pela via intraperitoneal (0,5 ml por animal) com cada uma das diferentes concentrações e, após 24 e 48 horas, é realizada a leitura do teste que consiste em registrar o número de animais mortos. Esse número é dividido pelo número de animais inoculados. Após 48 horas, outra leitura é feita, e os valores são incluídos no programa estatístico Combistat.(ANVISA, 2019)

Figura 2. Fluxograma do estudo



Fonte: próprio autor, 2021

Legenda: A- diluição do veneno; B- fracionamento e nova diluição C- inoculação e leitura do teste D- leitura no programa combistats.

### 3.5.1 Critério de aceitação

Para que o teste seja considerado efetivo, alguns critérios devem ser cumpridos. (1) A porcentagem de mortes deve formar uma curva de regressão linear entre a maior e a menor deleções utilizadas. (2) Quanto menores forem os limites de confiança, maior a precisão do ensaio (ANVISA, 2019). No Controle Biológico os valores validados para o intervalo de confiança devem sempre estar entre 70 a 130%. Valores fora desse intervalo invalidam o teste.

## 3.6 Metodologia

### 3.6.1 Inoculação dos animais

Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais, com 5 animais por grupo: salina, tramadol e morfina). Previamente a inoculação do veneno, cada animal do grupo recebeu 0,1 ml da solução preparada do analgésico, e o grupo controle recebeu o mesmo volume de solução salina. Após 15 minutos, os animais foram inoculados com as diferentes diluições do veneno de *Tityus serrulatus* via intraperitoneal, no volume total de 0,5ml.

### 3.6.2 Testes

Foram realizados 3 testes em datas e períodos diferentes. A quantidade de animais utilizada e doses administradas foram as mesmas para os 3 testes. Nos 1º e 2º testes foram utilizados machos e, no 3º teste foram utilizadas fêmeas.

Os sinais clínicos avaliados nas primeiras horas de teste (30 minutos e 3 horas), para o teste 1 foram: piloereção, salivação, vocalização, hemorragia oronasal, morte, além de alterações do posicionamento dos olhos, nariz, bochecha, orelhas e vibrissase, nos tempos de 24 e 48 horas, foi observada apenas mortalidade.

Os sinais clínicos observados no primeiro teste foram abrangentes, de forma a considerar não só sinais clínicos de dor, mas também outros já esperados para esse tipo de teste (hemorragia, salivação, morte, irritabilidade, sudorese e entre outros). Nos outros dois testes subsequentes, os sinais clínicos observados se limitaram àqueles relacionados a dor como postura, prostração, piloereção e vocalização, além de morte. Para os testes 2 e 3, os sinais clínicos foram registrados aos 15 minutos, 1 hora e 4 horas após a inoculação do veneno, e somente mortalidade após 24 e 48 horas de teste.

Todas as alterações foram classificadas de 1 a 3 sendo 1 para leve, 2 para moderado e 3 para severo.

### 3.6.3 Dados do histórico do Controle Biológico

Para analisar se há diferença no resultado da DL50 do veneno escorpiônico quando utilizados camundongos machos ou fêmeas, os dados foram obtidos do histórico do Controle Biológico para os testes realizado nos anos de 2019, 2020 e 2021. Os dados foram tabulados e a análise estatística foi realizada em acordo com o item 3.7.

## 3.7 Análise estatística

Para a análise dos resultados do teste de DL50, foi utilizado o Programa estatístico Combistats.

Para comparar se há diferença relacionada ao sexo sobre os resultados do histórico do teste da DL50 para o veneno escorpiônico, foi utilizado o teste t de Student com auxílio do programa GraphPad Prism 8.0.

## 4 RESULTADOS

As tabelas com os resultados para todos os testes estão apresentadas no apêndice A.

### 4.1 Teste 1

#### 4.1.1 Grupo Salina

Para as diferentes concentrações de veneno utilizadas no estudo, foram observadas alterações como piloereção, salivação, sudorese e morte. Nas diluições 4 e 5 os animais apresentaram sinais clínicos mais severos quando comparados aos grupos de menor concentração (diluições 1 e 2).

Foi possível observar que alguns animais apresentaram quadros clínicos extensos, porém após algumas horas, esse quadro sofreu uma regressão. E o inverso também ocorreu, quando animais que registrados com comportamento normal vieram a óbito nas horas seguintes (animal 2 da diluição 3).

Os óbitos para esse grupo foram registrados nos primeiros 30 minutos (1 animal), após 3 horas (1 animal), e após 24 horas (2 animais). Ao final das 48 horas de observação, após registro conforme Tabela 2, os valores não atingiram os critérios de aceitação e o teste ficou inválido.

*Tabela 2. Teste 1 grupo salina, total de animais mortos/inoculados 24 e 48 horas após inoculação do veneno.*

Diluição	24 horas	48 horas
1	0/5	0/5
2	0/5	0/5
3	1/5	1/5
4	0/5	0/5
5	3/5	3/5

*Fonte: próprio autor, 2021*

#### 4.1.2 Grupo Tramadol

Como observado no grupo salina, os animais que receberam menor quantidade de veneno tiveram reações mais brandas quando comparadas aos outros grupos.

No grupo da diluição 3 (dose de referência), aos 30 minutos de teste, todos os animais apresentaram irritabilidade e sudorese, porém nenhum sinal relacionado a dor estava presente.

Em relação a mortalidade, nos primeiros 15 minutos 3 animais morreram, após 3 horas apenas 1 animal veio a óbito e, 24 horas depois do início do teste mais um animal morreu.

Nesse grupo foi possível determinar o valor da DL50 como 32.9280 µg/dose e intervalo de confiança entre de 65,8% e 19139,7%.

*Tabela 3. Teste 1 grupo tramadol, total de animais mortos/inoculados 24 e 48 horas após inoculação do veneno.*

Diluição	24 horas	48 horas
1	0/5	0/5
2	1/5	1/5
3	0/5	0/5
4	0/5	0/5
5	4/5	4/5

*Fonte: próprio autor, 2021*

#### 4.1.3 Grupo Morfina

Assim como nos outros dois grupos, os sinais clínicos foram mais evidentes nos animais que receberam maior dose de veneno, principalmente nos primeiros 30 minutos de teste. Um animal veio a óbito nos primeiros 15 minutos. Após 3 horas de estudo, todos os grupos apresentavam sinais clínicos de envenenamento e 4 vieram a óbito.

Na leitura de 24 horas após o início do teste, mais 4 óbitos foram registrados, e após 48 horas, não houve registro de mortes.

Ao final do teste, após registro (Tabela 4), os valores não atingiram os critérios de aceitação e o teste ficou inválido.

*Tabela 4. Teste 1 grupo morfina, total de animais mortos/inoculados 24 e 48 horas após inoculação do veneno.*

Diluição	24 horas	48 horas
1	1/5	1/5
2	1/5	1/5
3	1/5	1/5
4	1/5	1/5
5	4/5	4/5

*Fonte: próprio autor, 2021*

## **4.2 Teste 2**

### **4.2.1 Grupo Salina**

Nos primeiros 15 minutos de teste a maioria dos animais apresentavam alterações de postura e prostração de grau leve a severo, vocalização em todos os grupos, três animais morreram, um da diluição 4 e dois da diluição 5. Os animais da diluição 1 apresentavam irritabilidade quando comparado aos outros grupos. Após 2 horas da inoculação do veneno, os grupos de menor concentração do veneno apresentaram uma evolução de leve para severo, enquanto nos outros grupos 8 animais morreram, sendo três animais da diluição 3, três da diluição 4 e dois da diluição 5.

Após 4 horas de teste, a diluição 1 observamos uma melhora nos sinais clínicos enquanto a diluição 2 observamos uma melhora sutil. Dos animais restantes das outras diluições observamos leve piora no quadro e um animal morreu na diluição 3. No tempo de 24 horas alguns animais apresentavam piloereção leve e outros já não exibiam alterações. Mais dois animais vieram a morreram, diluição 1 e 3 (Tabela 5). As alterações se mantiveram na leitura das 48 horas

A DL50 determinada para esse teste foi de: 13.85 µg/dose e intervalo de confiança mínimo de 51,5% e máximo de 163,5%.



*Tabela 5. Teste 2 grupo salina, total de animais mortos/inoculados 24 e 48 horas após inoculação do veneno.*

Diluição	24 horas	48 horas
1	1/5	1/5
2	0/5	0/5
3	5/5	5/5
4	4/5	4/5
5	4/5	4/5

*Fonte: próprio autor, 2021*

#### 4.2.2 Grupo Tramadol

Nos minutos iniciais do teste os animais se mostraram prostrados e no caso das duas primeiras diluições, sem alteração de postura. Nos outros grupos, os animais apresentavam alteração de prostração e postura de forma leve a moderado, a vocalização foi presente, porém de forma mais branda que comparado ao grupo salina. Após 2 horas da inoculação do veneno além da prostração os animais apresentaram alteração na postura de forma moderada, todos os animais da diluição 5 e quatro da diluição 4 morreram.

Para as duas primeiras diluições, após 4 horas da inoculação do veneno, os sinais clínicos dos animais persistiram, um animal morreu e um teve melhora no quadro clínico, não apresentando mais nenhum tipo de alteração como piloereção, prostração, vocalização e postura. Ocorreu um óbito na diluição 3 enquanto um animal não apresentou mais nenhum sinal clínico e os outros mantiveram as alterações.

Nas leituras de 24 e 48 horas (Tabela 6) os animais vivos apresentaram ausência de sinais clínicos ou sinais leves de piloereção e prostração. Dois animais da diluição 3 e um da diluição 4 apresentaram alterações severas até as 24 horas de teste. A leitura final do teste resultou na dose de DL50: 16,31 µg/dose e intervalo de confiança mínimo de 71,5% e máximo de 140,5%.

*Tabela 6. Teste 2 grupo tramadol, total de animais mortos/inoculados 24 e 48 horas após inoculação do veneno.*

Diluição	24 horas	48 horas
1	0/5	0/5
2	1/5	1/5
3	1/5	1/5
4	4/5	4/5
5	5/5	5/5

*Fonte: próprio autor, 2021*

#### 4.2.3 Grupo Morfina

Nos primeiros 15 minutos de teste os animais da diluição 1 e 2 apresentaram arqueamento na postura (grau leve), nas demais diluições ocorreram alterações de postura leve a moderada e prostração leve. Na diluição 5 dois animais morreram. A vocalização estava presente, porém, de forma mais branda que o grupo salina e tramadol.

Nas 2 horas seguintes, os animais das diluições 1 e 2 mantiveram, de forma geral, as mesmas alterações e graus. Ocorreram mais 4 mortes, sendo duas na diluição 3, uma na diluição 4 e uma na diluição 5, os animais vivos desses grupos apresentavam um agravamento dos sinais clínicos, sendo que alguns deles de modo severo. Após 4 horas da inoculação do veneno, mais 3 animais da diluição 4 vieram a óbito. Das diluições com maior concentração de veneno os animais mantiveram suas alterações, e nas diluições 1 e 2 ocorreram uma piora no quadro de leve para severo.

Nas leituras de 24 e 48 horas (Tabela 7), mais quatro animais vieram a óbito, um da diluição 2, um da diluição 3 e um da diluição 5. Dos vivos apenas um animal apresentava uma postura moderadamente alterada, enquanto o resto não possuíam mais alterações significativas. A DL50 determinada para esse grupo foi de 15,44 µg/dose e intervalo de confiança mínimo de 63,0% e máximo de 156,6%.

*Tabela 7. Teste 2 grupo morfina, total de animais mortos/inoculados 24 e 48 horas após inoculação do veneno.*

Diluição	24 horas	48 horas
1	0/5	0/5
2	1/5	1/5
3	3/5	3/5
4	4/5	4/5
5	4/5	4/5

*Fonte: próprio autor, 2021*

### **4.3 Teste 3**

#### **4.3.1 Grupo Salina**

No início do teste, todos os animais apresentavam alterações em sua maioria de postura moderada, prostração leve e vocalização. Após 2 horas, as alterações se mantiveram, dois animais morreram na diluição 4 e todos os animais da diluição 5 morreram.

Após 4 horas, mais duas mortes na diluição 4 e uma na diluição 3, os animais que ainda estavam vivos mantiveram alterações de prostração e postura leve, apenas no grupo 3 e 4 essas alterações foram observadas de forma mais moderada. Nas leituras de 24 e 48 horas (Tabela 8), não ocorreram mais óbitos, e apenas um animal da diluição 2 e um da 3 apresentava alteração leve de postura.

A leitura final do teste resultou na dose de DL50: 19,28 µg/dose e intervalo de confiança mínimo de 72,4% e máximo de 138,2%.

*Tabela 8. Teste 3 grupo salina, total de animais mortos/inoculados 24 e 48 horas após inoculação do veneno.*

Diluição	24 horas	48 horas
1	0/5	0/5
2	0/5	0/5
3	1/5	1/5
4	4/5	4/5
5	5/5	5/5

*Fonte: próprio autor, 2021*

#### **4.3.2 Grupo Tramadol**

Em todas as diluições, nos primeiros 15 minutos, os animais apresentaram uma alteração leve de postura, sendo que nos grupos 4 e 5 também apresentaram prostração leve. Em relação a vocalização, ocorreu de forma mais branda comparado

ao grupo salina. Após duas horas, o quadro se manteve para todos os grupos menos na diluição 3 que apresentou além de postura uma prostração leve, na diluição 5 três animais morreram. O quadro se manteve semelhante após 4 horas da inoculação do veneno, observou-se que os animais da diluição 1 e 2 não possuíam alterações e nas diluições 3 e 4 os animais apresentavam prostração moderada. Quatro animais morreram, sendo dois da diluição 5, um da diluição 4 e um da diluição 3.

Nas leituras de 24 e 48 horas (Tabela 9) os animais não apresentavam alterações. Para esse teste a DL50 determinada foi: 22,4 µg/dose e intervalo de confiança mínimo de 72,7% e máximo de 141,4%.

*Tabela 9. Teste 3 grupo tramadol, total de animais mortos/inoculados 24 e 48 horas após inoculação do veneno.*

Diluição	24 horas	48 horas
1	0/5	0/5
2	0/5	0/5
3	1/5	1/5
4	2/5	2/5
5	5/5	5/5

*Fonte: próprio autor, 2021*

#### 4.3.3 Grupo Morfina

Muito semelhante ao grupo tratado com tramadol, nos primeiros 15 minutos os animais apresentaram alteração leve de postura e apenas três animais apresentaram prostração leve. Não ocorreu vocalização de nenhum animal. Após 2 horas, o quadro se manteve muito semelhante e foram registradas quatro mortes na diluição 4 e quatro na diluição 5. As alterações clínicas dos animais seguiram com poucas alterações, apenas um animal apresentou alteração moderada, ele morreu no tempo de 4 horas, além de um animal na diluição 3.

Nas leituras de 24 e 48 horas (Tabela 10) os animais não apresentavam alterações, um animal da diluição 2 e um da diluição 3 morreram. Para esse teste a DL50 determinada foi: 14,9 µg/dose e intervalo de confiança mínimo de 73,3% e máximo de 134,3 %.

Tabela 10. Teste 3 grupo morfina, total de animais mortos/inoculados 24 e 48 horas após inoculação do veneno.

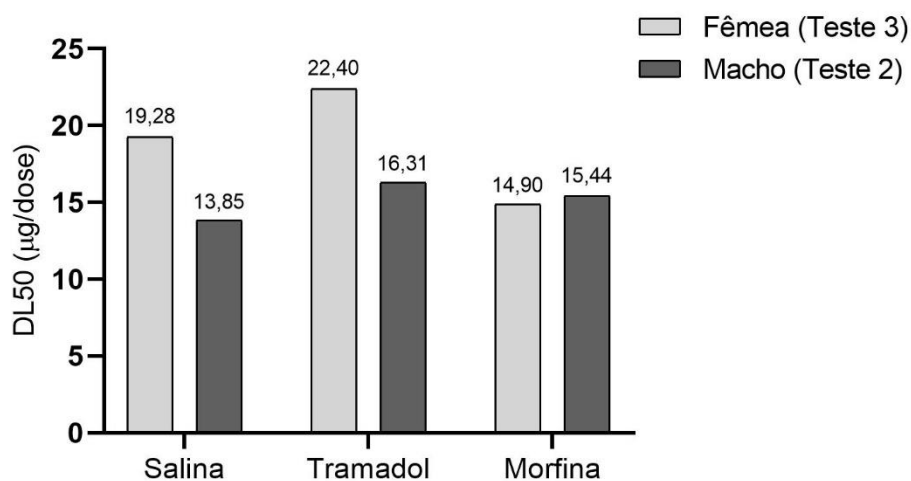
Diluição	24 horas	48 horas
1	0/5	0/5
2	1/5	1/5
3	2/5	2/5
4	5/5	5/5
5	4/5	5/5

Fonte: próprio autor, 2021

#### 4.4 Comparação das DL50

Como o teste 2 foi realizado apenas com machos e o teste 3 realizado apenas com fêmeas, ao realizar uma comparação dos testes 2 e 3 (Figura 3), foi possível observar uma diferença no resultado entre fêmeas e machos nos grupos salina e tramadol, enquanto o grupo morfina o resultado foi semelhante.

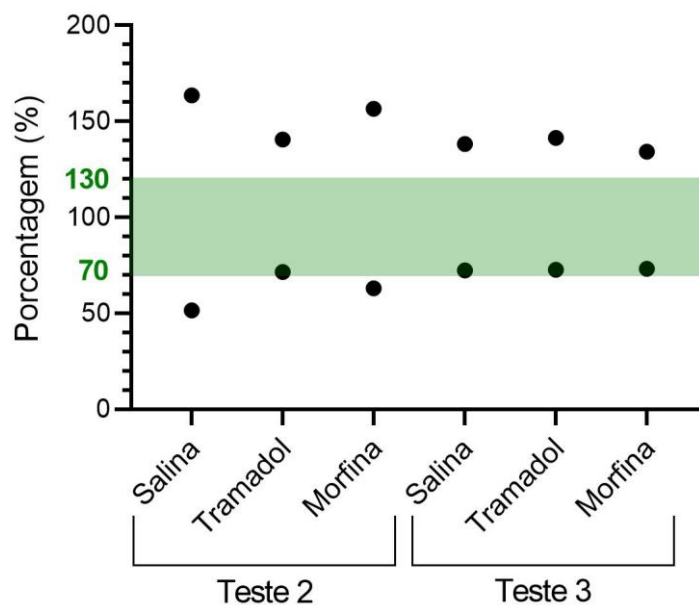
Figura 3. Comparação das DL50 dos testes 2 e 3.



Fonte: próprio autor, 2021

Quando comparamos os intervalos de confiança de cada grupo dos testes 2 e 3 (Figura 4), obtivemos resultados próximos ao critério de validação entre 70 e 130%, porém fora da faixa necessária para que o teste seja considerado validado.

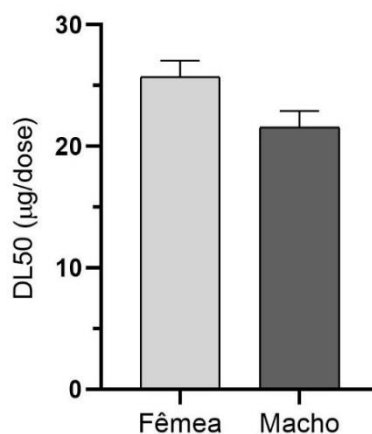
Figura 4. Comparação dos intervalos de confiança, testes 2 e 3.



Fonte: próprio autor, 2021

O resultado não foi estatisticamente significativo ( $p = 0,056$ ), quando se faz a análise do histórico do Controle Biológico, comparando os resultados de DL50 determinadas em 6 testes com machos e 6 com fêmeas (Figura 5).

Figura 5. Comparação entre a DL50 de fêmeas e machos ( $p=0,056$ )



Fonte: próprio autor, 2021

## 5 DISCUSSÃO

O veneno de escorpião possui diversas neurotoxinas que atuam principalmente nos canais de sódio e potássio. Essa despolarização prolongada leva a liberação de acetilcolina, adrenalina e noradrenalina (CUPO, 2015). O tramadol e a morfina são dois potentes opioides, que atuam no sistema nervoso central (receptora  $\mu$  opioides) e inibem as vias ascendentes da dor.

Embora os resultados finais da determinação da DL50 obtidos neste estudo ficaram fora do intervalo de confiança, foi possível observar uma ação eficaz dos dois analgésicos, quando comparadas alguns sinais clínicos como a vocalização, irritabilidade, prostração e postura dos animais entre os grupos tratados e controle. Os animais do grupo salina (controle) apresentavam alterações sempre mais moderadas a severas.

O presente estudo demonstrou que é possível implementar a utilização de analgésicos como a morfina e o tramadol em testes de DL50 com veneno de *T. serrulatus*. Como demonstrando por (HERRERA et al., 2018), o uso desses analgésicos em testes de DL50 com veneno de *B. asper* foi eficaz e não alterou os resultados estudo.

Os estudos de anos anteriores, realizados pelo Controle Biológico, possibilitaram uma análise estatística para a comparação de resultados de DL50 entre sexos. Descrito por (PUCCA et al., 2011), fêmeas, possuem DL50 mais elevada devido à sua melhor resposta inflamatória, porém isto não foi evidenciado para as determinações de DL50 do veneno de *T. serrulatus*, pois não foi observado uma variação estatisticamente significativa ( $p=0,056$ ) quando analisados os dados históricos de Controle Biológico desde 2019.

## 6 CONCLUSÕES

Este trabalho sugere que o uso de analgésicos opióides como cloridrato de tramadol e cloridrato de morfina podem melhorar o bem-estar dos animais, sem alterar o resultado da DL50 obtida, muito embora seja necessário refinar a dose dos medicamentos. Apesar de mais estudos serem necessários para confirmar a hipótese da não interferência dos medicamentos no resultado final.

Mostramos também que não há influência do sexo dos animais sobre a determinação a DL50 do veneno de *Tityus serrulatus*.

Em conclusão este estudo mostra que a utilização de analgesia previa pode promover maior conforto aos animais submetidos ao teste de DL50, sem interferência no efeito do veneno de *Tityus serrulatus*.



## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

- ABRAHAO NENCIONI, A. L. et al. Effects of Brazilian scorpion venoms on the central nervous system. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 24, p. 3, 23 jan. 2018. Doi: <https://doi.org/10.1186/s40409-018-0139-x>
- AMADO, T. F. et al. Vulnerable areas to accidents with scorpions in Brazil. **Tropical medicine & international health: TM & IH**, v. 26, n. 5, p. 591–601, maio 2021. Doi: <https://doi.org/10.1111/tmi.13561>
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL). **Farmacopeia Brasileira**, 6<sup>a</sup> ed. Brasília: ANVISA, 2019. v. 2, p. 90–91. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/6a-edicao-volume-2>
- CARMO, A. O. et al. Evolution of alternative methodologies of scorpion antivenoms production. **Toxicon**, v. 97, p. 64–74, 1 abr. 2015. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.02.007>
- CUPO, P. Clinical update on scorpion envenoming. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 642–649, dez. 2015. Doi: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0237-2015>
- GALVANI, N. C. et al. Genotoxicity evaluation induced by Tityus serrulatus scorpion venom in mice. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 140, p. 132–138, 15 dez. 2017. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.10.024>
- GUTIÉRREZ, J. M.; HERRERA, C. The analgesics morphine and tramadol do not alter the acute toxicity induced by Bothrops asper snake venom in mice. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 81, p. 54–57, abr. 2014. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.02.001>
- HERRERA, C. et al. Analgesic effect of morphine and tramadol in standard toxicity assays in mice injected with venom of the snake Bothrops asper. **Toxicon**, v. 154, p. 35–41, 1 nov. 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.09.012>
- MINISTERIO DA SAÚDE, Secretaria De Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico. Acidentes escorpionicos no Brasil, 2018**. v. 50, p. 17–21, out.2019. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2019/outubro/04/BE-multitematico-n28.pdf>
- O INSTITUTO. **Instituto Butantan**. São Paulo. Institucional. Disponível em: <https://butantan.gov.br/institucional/o-instituto>. Acesso em: 19 jan. 2022.
- PUCCA, M. et al. Experimental Tityus serrulatus scorpion envenomation: age- and sex-related differences in symptoms and mortality in mice. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, p. 325–332, 2011.

ROBINSON, Vicky. Finding alternatives: an overview of the 3Rs and the use of animals in research. **School Science Review**, v. 87, n. 319, p. 111, 2005.

VENANCIO, E. J. et al. Enzymatic properties of venoms from Brazilian scorpions of *Tityus* genus and the neutralisation potential of therapeutical antivenoms. **Toxicon**, The 17th World Congress of the International Society on Toxinology and Venom Week 2012. v. 69, p. 180–190, 1 jul. 2013. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.02.012>

## APÊNDICE(S)

APÊNDICE A - Tabela 11. Teste 1, avaliação do grupo salina nos tempos 30 minutos, 3, 24 e 48 horas.

Diluição	Id Animal	Tempo			
		30 min	3 horas	24 HORAS	48 HORAS
1	1	A2	L1		
	2	∅	L1		
	3	F3; H2; I2	I3		
	4	K2	B1; F3; L2		
	5	∅	∅		
2	1	F2; I2	M1; F2; K2		
	2	M2; F3; I2; K2	F1; L1		
	3	L2	F2; L1		
	4	∅	∅		
	5	F2; I; 2 L2	B3; F2; L2		
3	1	F1; L1	M2; F1		
	2	∅	L1	E	
	3	∅	∅		
	4	∅	M3; F2		
	5	F1	M2; F1; L2		
4	1	∅	∅		
	2	F1	F1		
	3	∅	∅		
	4	M1; F2	M3; F3; L2		
	5	∅	L1		
5	1	E			
	2	M2; F2	M2; F3		
	3	L1	∅		
	4	M2; F2; I2; L1	E		
	5	M2; H2	M1; F3; L1	E	

Fonte: Próprio autor, 2021.

Legenda:    A. Piloereção    B. Prostação    C. Vocalização    D. Postura    E. Morte  
               F. Olhos            G. Nariz        H. Bochecha    I. Orelhas    J. Hemorragia  
               k. Dispneico        L. Sudorese    M. Salivação

Escala:        1 – Leve        2 – Moderado    3 - Severo        ∅ = Sem alteração

APÊNDICE B - Tabela 12. Teste 1, avaliação do grupo tramadol nos tempos 30 minutos, 3, 24 e 48 horas.

Diluição	Id Animal	Tempo			
		30 min	3 horas	24 HORAS	48 HORAS
1	1	K2	L1		
	2	∅	∅		
	3	∅	M2;F2;L1		
	4	∅	L1		
	5	F3;H2;I2;K2	F2; L1		
2	1	F1; L1	L1		
	2	F2; L1	M1; L1		
	3	L1	∅		
	4	I2; L1	M3; F2; L1	E	
	5	L2	F1; L1		
3	1	L1	M3; F1; L2		
	2	L1	L2		
	3	L2	L2		
	4	L1	MB1; F2; L1		
	5	L1	L1		
4	1	M1; L1	M2; F1; L1		
	2	M2; L1	M3; F3; L1		
	3	M3; F2; L2	M3; F2; L3		
	4	L1	M1; K2; I2		
	5	M1;F1; J1;I1	F2		
5	1	E			
	2	E			
	3	M3	E		
	4	M3; L1	M2; F3; K2		
	5	E			

Fonte: Próprio autor, 2021.

Legenda: A. Piloereção B. Salivação C. Vocalização D. Postura E. Morte  
 F. Olhos G. Nariz H. Bochecha I. Orelhas J. Hemorragia  
 k. Dispneico L. Sudorese M. Salivação

Escala: 1 – Leve 2 – Moderado 3 - Severo ∅ = Sem alteração

APÊNDICE C - Tabela 13. Teste 1, avaliação do grupo morfina nos tempos 30 minutos, 3, 24 e 48 horas.

Diluição	Id Animal	Tempo			
		30 min	3 horas	24 HORAS	48 HORAS
1	1	∅	F2; L1	E	
	2	∅	M3; F3; L1		
	3	∅	L1		
	4	∅	M1; F3; L3		
	5	F3; H2; I2	M1; F2; L3		
2	1	L1	L1		
	2	F2; I2	M1; F1; L1		
	3	I2; L1	M3; F3; I2		
	4	L1	L1		
	5	∅	F2	E	
3	1	F1	M3	E	
	2	F1	M2; F3		
	3	M1; F1; L1	M3; F3; L2		
	4	F1	∅		
	5	F1; B1	M2; F1; F1		
4	1	M3; F2; L2	E		
	2	F1; L1	M2; F2; J1		
	3	F1; L2	L2		
	4	M2; F2; I2; L2	M2; F3; I1; L3		
	5	M2; F2; I2; L2	M3; F2; L1		
5	1	M2; L2	∅		
	2	M2; F2; L1	E		
	3	M2; F2; L1	M2; F3; I2	E	
	4	M2; L1	E		
	5	E			

Fonte: Próprio autor, 2021.

Legenda: A. Piloereção B. Salivação C. Vocalização D. Postura E. Morte  
 F. Olhos G. Nariz H. Bochecha I. Orelhas J. Hemorragia  
 k. Dispneico L. Sudorese M. Salivação

Escala: 1 – Leve 2 – Moderado 3 - Severo ∅ = Sem alteração

APÊNDICE D - Tabela 14. Teste 2, avaliação do grupo salina nos tempos 15 minutos, 2, 4, 24 e 48 horas

Diluição	Id Animal	Tempo				
		15 min	2 hora	4 horas	24 HORAS	48 HORAS
1	1	D1	B3, D3	A1, B2, D2	E	
	2	∅	B3, D3	B2, D2	∅	∅
	3	D1	B2,D3	A1, B2, D2	A1	∅
	4	D2	B3, D3	B2, D2	∅	∅
	5	∅	B2,D3	B2, D2	∅	∅
2	1	B1	B3, D3	B3, D3	A1	A1
	2	B1	B3, D3	B3, D3	A1	A1
	3	D1	B2,D3	B3, D3	A1	∅
	4	D1	B2,D3	D1	A1	∅
	5	B1	B2	B3, D3	∅	∅
3	1	D3	E			
	2	D1	E			
	3	D2	A1, D2	E		
	4	B2, D1	D2	B1, D2	E	
	5	∅	E			
4	1	E				
	2	D3	D2	B2, D2	∅	∅
	3	D2	E			
	4	B3	E			
	5	D3	E			
5	1	E				
	2	D2	E			
	3	D2	E			
	4	E				
	5	D3	D3	B3;D3	D2	∅

Fonte: Próprio autor, 2021.

Legenda: A. Piloereção B. Prostação C. Vocalização D. Postura E. Morte

Escala: 1 – Leve 2 – Moderado 3 - Severo ∅ = Sem alteração

APÊNDICE E - Tabela 15. Teste 2, avaliação do grupo tramadol nos tempos 15 minutos, 2, 4, 24 e 48 horas

Diluição	Id Animal	Tempo				
		15 min	2 hora	4 horas	24 HORAS	48 HORAS
1	1	B2	B2, D2	B2, D2	∅	∅
	2	B2	B2, D2	B2, D2	∅	∅
	3	B2	B2, D2	A1, B2, D2	A1	∅
	4	B2	B2, D1	B2, D2	∅	∅
	5	B2	B2, D1	B2, D2	A1	∅
2	1	B1	B2, D2	B1, D2	∅	∅
	2	B1	B2, D2	B2, D2	∅	∅
	3	B1	D2	B2, D2	A1, D1	∅
	4	B1	A2, B2, D2	E		
	5	B1	B2, D2	∅	∅	∅
3	1	B2, D1	A2, B2, D2	E		
	2	B1, D1	B2, D2	B2, D2	∅	∅
	3	B1, D1	D1	B1, D2	∅	∅
	4	B2, D1	B2, D2	A1, B2, D2	∅	∅
	5	B2, D2	B2, D2	∅	∅	∅
4	1	B1, D2	E			
	2	B2, D2	E			
	3	B1, D2	E			
	4	B2, D2	B2, D2	B3, D3	A2, B3, D3	∅
	5	B1, D2	E			
5	1	B1, D2	E			
	2	B1, D2	E			
	3	B1, D2	E			
	4	B1, D2	E			
	5	B1, D2	E			

Fonte: Próprio autor, 2021.

Legenda: A. Piloereção B. Prostração C. Vocalização D. Postura E. Morte

Escala: 1 – Leve 2 – Moderado 3 - Severo ∅ = Sem alteração

APÊNDICE F - Tabela 16. Teste 2, avaliação do grupo morfina nos tempos 15 minutos, 2, 4, 24 e 48 horas

Diluição	Id Animal	Tempo				
		15 min	2 hora	4 horas	24 HORAS	48 HORAS
1	1	D1	D1	B2, D1	∅	∅
	2	D1	D1	B2,D2	∅	∅
	3	D1	D1	B2,D1	∅	∅
	4	B1, B1	D2,B2	B2	∅	∅
	5	D1	D1	B2	∅	∅
2	1	D1	D1	B2	∅	∅
	2	D1	D2	B3, D3	E	
	3	D1	B1, D1	B2, D2	∅	∅
	4	D1	A1, B1, D2	A1, B2, D3	∅	∅
	5	D1	D1	∅	∅	∅
3	1	B1, D2	E			
	2	B1, D2	B2,D2	B2,D3	E	
	3	B1, D1	E			
	4	B1, D1	B1,D2	B2, D3	D2	∅
	5	B1, D1	B2,D2	B2, D3	B2,D3	E
4	1	B1,D1	D2	E		
	2	D1	D2	E		
	3	D2	B2,D2	B3,D3	∅	∅
	4	D1	B3,D3	E		
	5	B1, D2	E			
5	1	E				
	2	E				
	3	B1,D2	D2	D2	E	
	4	B1,D2	B2,D3	D2	∅	∅
	5	D2	E			

Fonte: Próprio autor, 2021.

Legenda: A. Piloereção B. Prostração C. Vocalização D. Postura E. Morte

Escala: 1 – Leve 2 – Moderado 3 - Severo ∅ = Sem alteração



APÊNDICE G - Tabela 17. Teste 3, avaliação do grupo salina nos tempos 15 minutos, 2, 4, 24 e 48 horas

Diluição	Id Animal	Tempo				
		15 min	2 hora	4 horas	24 HORAS	48 HORAS
1	1	D2	B1, D1	B1, D1	∅	∅
	2	B2, D2	B1, D1	B1, D1	∅	∅
	3	D1	∅	B1, D1	∅	∅
	4	B2, D2	B1, D1	B1, D1	∅	∅
	5	B2, D2	B1, D1	B1, D1	∅	∅
2	1	B1, D2	D1	B1, D1	∅	∅
	2	B1, D2	D1	B1, D1	∅	∅
	3	B1, D2	D1	B1, D1	∅	∅
	4	B1, D2	D1	B1, D1	∅	∅
	5	D2	D1	B1, D1	∅	∅
3	1	B1, D2	D1	B1, D1	∅	∅
	2	B2, D2	B1, D1	B2, D1	∅	∅
	3	B1, D2	B1, D1	E		
	4	B1, D2	D1	B2, D1	D1	∅
	5	B1, D2	B1, D1	B2, D1	∅	∅
4	1	B1, D1	B1, D1	E		
	2	B1, D1	E			
	3	B1, D1	E			
	4	B1, D1	B2, D1	E		
	5	B1, D1	∅	D2	∅	∅
5	1	D2	E			
	2	D2	E			
	3	D2	E			
	4	D2	E			
	5	D2	E			

Fonte: Próprio autor, 2021.

Legenda: A. Piloereção B. Prostração C. Vocalização D. Postura E. Morte

Escala: 1 – Leve 2 – Moderado 3 - Severo ∅ = Sem alteração

APÊNDICE H - Tabela 18. Teste 3, avaliação do grupo tramadol nos tempos 15 minutos, 2, 4, 24 e 48 horas

Diluição	Id Animal	Tempo				
		15 min	2 hora	4 horas	24 HORAS	48 HORAS
1	1	D1	D1	D1	∅	∅
	2	D1	D1	D1	∅	∅
	3	D1	D1	∅	∅	∅
	4	D1	D1	D1	∅	∅
	5	D1	D1	D1	∅	∅
2	1	D1	D1	B1, D1	∅	∅
	2	D1	D1	D1	∅	∅
	3	D1	D1	D1	∅	∅
	4	D1	D1	∅	∅	∅
	5	D1	D1	D1	∅	∅
3	1	D1	B1, D1	B1, D1	∅	∅
	2	D1	B1, D1	B2, D1	∅	∅
	3	D1	B1, D1	B1, D1	∅	∅
	4	D1	B1, D1	E		
	5	D1	B1, D1	B1, D1	∅	∅
4	1	B1, D1	B1, D1	B2, D1	∅	∅
	2	B1, D1	B1, D1	B2, D1	∅	∅
	3	D1	B1, D1	B2, D1	∅	∅
	4	B1, D1	B1, D1	E		
	5	B1, D1	B1, D1	B2, D1	∅	∅
5	1	B1, D1	E			
	2	B1, D1	E			
	3	B1, D1	B1, D1	E		
	4	B1, D1	E			
	5	B1, D1	B2, D1	E		

Fonte: Próprio autor, 2021.

Legenda: A. Piloereção B. Prostração C. Vocalização D. Postura E. Morte

Escala: 1 – Leve 2 – Moderado 3 - Severo ∅ = Sem alteração

APÊNDICE I - Tabela 19. Teste 3, avaliação do grupo morfina nos tempos 15 minutos, 2, 4, 24 e 48 horas

Diluição	Id Animal	Tempo				
		15 min	2 hora	4 horas	24 HORAS	48 HORAS
1	1	D1	D1	D1	∅	∅
	2	D1	D1	D1	∅	∅
	3	D1	D1	B1, D1	∅	∅
	4	D1	D1	D1	∅	∅
	5	D1	D1	D1	∅	∅
2	1	D1	D1	B1, D1	∅	∅
	2	D1	D1	D1	∅	∅
	3	D1	D2	D1	∅	∅
	4	D1	D1	D1	∅	∅
	5	D1	B1, D1	B1, D1	∅	∅
3	1	B1, D1	D1	D1	∅	∅
	2	B1, D1	B1, D1	E		
	3	D1	D1	B1, D1	∅	∅
	4	D1	D1	D1	∅	∅
	5	D1	D1	D1	∅	∅
4	1	D1	E			
	2	D1	E			
	3	D1	E			
	4	D1	D2	E		
	5	B1, D1	E			
5	1	D1	E			
	2	D1	D1	D1	∅	∅
	3	D1	E			
	4	D1	E			
	5	D1	E			

Fonte: Próprio autor, 2021.

Legenda: A. Piloereção B. Prostação C. Vocalização D. Postura E. Morte

Escala: 1 – Leve 2 – Moderado 3 - Severo ∅ = Sem alteração