

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM FATOR
ANSIOLÍTICO EXTRAÍDO DA PELE DA *Leptodactylus*
labyrinthicus (Spix, 1824)

Marinetes Dantas de Aquino Nery

FC-00006141-2

Fortaleza - Ceará
Março/1998

c

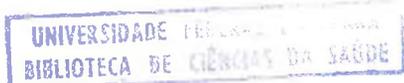
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM FATOR
ANSIOLÍTICO EXTRAÍDO DA PELE DA *Leptodactylus*
labyrinthicus (Spix, 1824)**

Autora: Marinetes Dantas de Aquino Nery
Orientadora: Profa. Dra. Gisela Costa Camarão

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, do
Departamento de Fisiologia e Farmacologia do
Centro de Ciências da Saúde da UFC, como
Requisito Parcial para obtenção do Título de
Mestre em Farmacologia

Fortaleza - Ceará
Março/1998



Esta dissertação encontra-se a disposição dos interessados na Biblioteca do Centro de Ciências da Saúde da UFC.

A citação de qualquer trecho desta tese é permitida, desde que seja de conformidade com as normas da ética científica.

Marinetes Dantas de Aquino Nery

Dissertação aprovada em __ / __ / __

BANCA EXAMINADORA

Prof.ª Dra. Gisela Costa Camarão
(Prof.ª Orientadora)

Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho
(Prof. Co-Orientador)

Prof.ª Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa

*Aos meus filhos, Erik, Hebert e
Herson, pelo carinho e paciência.*

*Ao Gleito, pela compreensão e
apoio.*

*Aos meus pais e irmãos, pela
dedicação e afeto.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por mais esta etapa cumprida.

À Profa. Dra. Gisela Costa Camarão, pela orientação desta tese.

Ao Prof. Dr. Krishnurt de Moraes Carvalho, pela minha aceitação em seu laboratório, por sua co-orientação e auxílio durante a realização deste trabalho.

À prof^a. Dra. Francisca Clea Florenço de Sousa, por ter aceitado participar da banca examinadora.

Ao prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao pela ajuda em liberar seu laboratório e seus aparelhos para realização deste trabalho.

À Dra. Maria Ângelina da Silva Medeiros, pela amizade, colaboração à realização deste trabalho.

À Dra. Arislete Dantas de Aquino pela organização correção desta tese meus sinceros agradecimentos.

À prof^a Rita Maria Dantas, por sua atenção carinho e auxílio nos primeiros experimentos.

À Maria Silvandira França pela sua dedicada colaboração diária nos experimentos e sua amizade.

Ao Manuel Cláudio Patrocínio, por sua presteza e abnegação em sempre servir a um amigo.

De maneira toda especial, externo aqui, meus agradecimentos ao Newton Melo pela digitação e colaboração deste trabalho.

Aos Estudantes que participaram na elaboração deste trabalho Cristiane Melo, Cristina Rocha Goes e Nádja Macedo Caetano meus sinceros agradecimentos.

Aos colegas do laboratório, Mírian, Falba, Lígia, Iberê, Mila, Nava, Daniele, Denise, Alfredo, Andrea, Ricardo, Roberto, Valéria, pela Amizade estímulo e presteza.

À todos os colegas do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Farmacologia pelo apoio, amizade e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

A prof^a Maria Aparecida Oliveira Alves, Chefe do Departamento de Biologia pela ajuda, compreensão e liberação concedida.

A Prof^a Ana Maria Souza de Araujo, do laboratório de Estatística e Matemática aplicada do Departamento de Estatística e Matemática Aplicada da UFC por sua valiosa cooperação na Análise Estatística desta tese.

Ao Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará pela ajuda concedida à conclusão deste trabalho.

Ao Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Ceará pela acolhida calorosa de seus professores e técnicos.

Ao CNPq e FUNCAP pelo auxílio financeiro na forma de bolsa de estudos.

Aos meus filhos pelas horas de separação e abandono.

Finalmente, a todos aqueles que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

| | Pág. |
|--|-------------|
| Dedicatória | iii |
| Agradecimentos | iv |
| Sumário | vi |
| Lista de tabelas | ix |
| Lista de figuras | xi |
| Resumo | xii |
| Abstract | xiv |
| INTRODUÇÃO | 1 |
| Capítulo 1 - REVISÃO DA LITERATURA | |
| 1.1- Revisão dos Anfíbios | 3 |
| 1.1.1- História | 3 |
| 1.1.2- Evolução | 5 |
| 1.1.3- Distribuição | 6 |
| 1.1.4- Classificação | 7 |
| 1.1.5- Morfologia da <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> (Spix, 1824) | 9 |
| 1.1.6- A Pele da Rã <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> (Spix, 1824) | 11 |
| 1.1.7- Glândulas de Veneno | 12 |
| 1.2 - Drogas Ansiolíticas | 14 |
| 1.2.1- Classificação das Drogas Ansiolíticas | 16 |
| 1.2.1a-Benzodiazepínicos | 16 |
| 1.2.1b-Agonista da Serotonina (Receptor- 5HT _{1A}) | 22 |
| 1.2.1c-Barbitúricos | 24 |
| 1.2.1d-Antagonista β -adrenérgicos | 24 |
| 1.2.1e-Diversos | 24 |
| 1.3- Objetivos | 25 |

Capítulo 2 - MATERIAL

| | |
|-------------------------|----|
| 2.1- Animais | 26 |
| 2.2- Equipamentos | 26 |
| 2.3- Soluções | 28 |
| 2.4- Drogas e Reagentes | 28 |

Capítulo 3 - MÉTODOS

| | |
|---|----|
| 3.1- Extração do Veneno | 29 |
| 3.2- Purificação em HPLC com Coluna Preparativa | 30 |
| 3.3- Determinação do Grau de pureza do Pico 12 com Coluna Analítica | 33 |
| 3.4- Toxicidade | 33 |
| 3.5- Testes Comportamentais | 34 |
| 3.5.1- Teste do “Plus-Maze” | 34 |
| 3.5.2- “Holeboard” - Atividade Exploratória. | 36 |
| 3.5.3- Teste da Natação | 37 |
| 3.5.4- Teste da Escada | 38 |
| 3.6- Método Estatístico | 38 |

Capítulo 4 - RESULTADOS

| | |
|---|----|
| 4.1- Extração do Veneno | 39 |
| 4.2- Purificação em HPLC com coluna preparativa | 39 |
| 4.3- Determinação do Grau de Pureza do Pico 12 com coluna Analítica | 39 |
| 4.4- Toxicidade | 41 |
| 4.5- Determinação do Fator Ansiolítico “Pico 12” | 41 |
| 4.6- Teste do “Plus-Maze” | 41 |
| 4.6.1- Metodologia e Análise Estatística do “Plus-Maze” | 42 |
| 4.7- “Hole-board” - Atividade Exploratória | 51 |

| | | |
|-----------------------------------|------------------|----|
| 4.8- | Teste da Escada | 53 |
| 4.9- | Teste da Natação | 57 |
| Capítulo 5 - DISCUSSÃO | | |
| 5 - | Discussão | 59 |
| Capítulo 6 - CONCLUSÕES | | |
| 6 - | Conclusões | 66 |
| Referências Bibliográficas | | 67 |
| Apêndices | | 75 |

LISTA DE TABELAS

| Número | Título | Página |
|---------------|--|---------------|
| 1 | Levantamento do extrato bruto das rãs <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> . | 30 |
| 2 | Número de entrada nos braços abertos | 44 |
| 3 | Valores médios e desvio padrão por tratamento (Variável transformada) | 44 |
| 4 | Valores médios e desvio padrão por tratamento (Variável original). | 44 |
| 5 | Análise de variância | 45 |
| 6 | Valores médios e desvio padrão por tratamento. | 46 |
| 7 | Tempo(s) - Braços abertos | 48 |
| 8 | Valores médios e desvio padrão por tratamento. | 49 |
| 9 | Tempo(s) - Braços fechados | 50 |
| 10 | Valores médios e desvio padrão por tratamento. | 50 |
| 11 | Análise de variância (N ^o de buracos explorados pelo animal) | 51 |
| 12 | Valores médios e desvio padrão por tratamento. | 52 |
| 13 | Análise de variância (Variável transformada) | 54 |
| 14 | Valores médios e desvio padrão por tratamento (Variável transformada). | 54 |
| 15 | Valores médios e desvio padrão por tratamento (Variável original). | 55 |
| 16 | Análise de variância | 56 |
| 17 | Valores médios e desvio padrão por tratamento. | 56 |

| | | |
|----|--|----|
| 18 | Análise de variância Tempo(s) que o animal permanece parado. | 58 |
| 19 | Valores médios e desvio padrão por tratamento. | 58 |

LISTA DE FIGURAS

| Número | Título | Página |
|---------------|--|---------------|
| 1.1 | Espécie <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> . (SPIX, 1824). | 30 |
| 1.2 | Representante da classe Anphibia. | 44 |
| 1.3 | Corte histológico da pele dos anphibios | 44 |
| 1.4 | Estrutura química dos benzo diazepínicos. | 44 |
| 1.5 | Interrelação entre o metabolismo dos carboidratos e o ácido γ -aminobutírico (GABA). | 45 |
| 1.6 | Interrelação entre o GABA/benzodiazepínico. | 46 |
| 1.7 | Estrutura química da buspirona | 48 |
| 3.1 | Liberção da secreção venenosa da pela da <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> . | 49 |
| 3.2 | Perfil de eluição do extrato bruto extraído da pela da <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> . | 49 |
| 3.3 | Teste do “Pluz-Maze” | 49 |
| 4.1 | Perfil de eluição do “Pico 12” proveniente da <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> (spix, 1824) com 95% de pureza. | 49 |

RESUMO

A pele dos anfíbios é rica em glândulas que elaboram secreções e são classificadas biologicamente em: glândulas mucosas que eliminam um muco que mantém a pele úmida, para a troca de gases e protege o animal contra predadores, glândulas granulosas que secretam venenos os quais contêm peptídeos, proteínas, derivadas guanidínicos, aminas biogênicas, esteróides, alcalóides e outros compostos.

Neste estudo foi isolado e purificado um fator ansiolítico, obtido a partir do veneno extraído das glândulas da pele da rã *Leptodactylus labyrinthicus* (spix, 1824). O veneno foi obtido através de uma injeção subcutânea de adrenalina (100µg/ml), em seguida liofilizado e dissolvido em água bidestilada, centrifugado e o precipitado resultante desprezado. A solução sobrenadante foi então fracionada em HPLC (Cromatografia líquida de alta performance), usando uma coluna C-18 (2,5x30cm), eluída com um fluxo de 5ml/min e gradiente de 5-80% de acetonitrila. As frações resultantes foram novamente liofilizadas para os ensaios biológicos.

O produto isolado resultante da separação cromatográfica, denominado como fator ansiolítico “Pico 12”, quando injetado pela via intraperitoneal em camundongos e pela via intrapeniana em ratos, apresentou nestes um efeito tranqüilizante e um comportamento social diferente dos animais controle.

O grau de pureza do produto em torno 95% foi determinado através de HPLC em coluna fina (coluna analítica). O “Pico 12” purificado foi estudado em modelos comportamentais de ratos e camundongos através de: teste de “Plus-Maze”, teste da escada, teste da natação e a atividade exploratória “Hole-board”. Tendo em vista não ter ocorrido a morte destes animais, o “Pico 12” não apresentou grau de toxicidade nas doses em estudo.

O teste de comportamento do “Plus-Maze” serve para avaliar os efeitos das drogas ansiolíticas, e o produto identificado como “Pico 12” apresentou comportamento semelhante ao efeito dos benzodiazepínicos.

O teste da escada tem a capacidade de medir comportamentos à drogas ansiolíticas, bem como o teste com a atividade exploratória do “Hole-board”.

O teste da natação induz a depressão em ratos e camundongos e o fator ansiolítico “Pico 12” contribuiu para evidenciar este estado.

Os testes comportamentais demonstraram que, o fator ansiolítico “Pico 12” possivelmente podem apresentar um mecanismo de ação em receptores, semelhantes aos dos benzodiazepínicos.

ABSTRACT

Amphibian skin is full of glands that elaborate substances whose biological meaning is detached on: mucous glands that eliminate mucus keeping the skin humid for gas changes and protecting the animal against predators. Granular glands secrete poisons where peptides, proteins, guanidinic derived substances, biogenic amines, steroids and other compounds were found. On this study we isolated and purified an *anxiolytic factor*.

The venom extracted from *Leptodactylus labyrinthicus* (spix, 1824) skin glands was obtained through an adrenaline subcutaneous injection (100 µg/ml). This lyophilized material is reduced to powder, where again it was resuspended in bidistilled water, centrifugated and the precipitate discarded. The supernatant was fractionated by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using a C18 column (2,5x30 cm), eluted with a flow of 5 ml/min with a gradient of 5-80% acetonitrile. The fractions were lyophilized for bioassay.

The separation's products identified like peak 12, which showed tranquilization and a social behaviour different from controls, when injected intraperitoneally in mice and rats, was separated for behavioural studies. The chosen peak was passed once more at HPLC fine column (analytic column) which identified the purity degree, around 95%. The purified peak started to be studied in behavioural models such as the plus-maze test, staircase test, swimming test and the hole-board test.

The peak in focus did not show any degree of toxicity, not killing rats or mice.

The plus-maze behaviour test is capable to measure anxiolytic drugs and the 12 peak was similar in comparison to benzodiazepines. The staircase test has also this capacity, combined with the hole-board exploratory activity.

The swimming tests measures the anxiolytic drugs activity too and also induces depression in rats and mice, where the anxiolytic factor (12 peak) contributed to make evident their depressive state.

The behavioural tests showed that the anxiolytic factor probably has it action mechanism in receptors similar to the benzodiazepine ones.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O homem desde os tempos remotos se empenha na busca da cura de seus diversos males. Nesse intuito, recorre incessantemente à natureza, à procura de extratos para a fabricação de remédios sendo estes obtidos a partir de plantas e animais.

Os anfíbios, animais de vida dupla (vivem na água e na terra), são desde a antiguidade utilizados por curandeiros e feiticeiros, em face de sua pele conter secreções empregadas na elaboração de venenos.

A pele dos anfíbios, um verdadeiro arsenal de produtos naturais, contém dois tipos de glândulas: as glândulas mucosas, que regulam a umidade da superfície externa da pele, através da secreção de grande quantidade de muco; as glândulas granulares, capazes de produzir inúmeras substâncias bioativas, incluindo cinco grupos; proteínas, enzimas, peptídeos, esteróides, alcalóides e aminas biogênicas.

Um dos assuntos de grande interesse nos dias atuais é a ansiedade, problema mais freqüente ocorrido em atendimento médico primário e na população em geral. A ansiedade, considerada a doença do homem moderno, se origina de perigo interno ou externo iminente, podendo ser resposta ao estresse ou ao estímulo ambiental, muitas vezes sem causa aparente. O termo engloba uma série de quadros clínicos diversos, que apresentam prognósticos diferentes e terapêutica específica. As drogas ansiolíticas são fármacos utilizados no combate de sintomas causados pela ansiedade.

O presente trabalho se enquadra no contexto da extração, purificação do extrato da pele da rã *Leptodactylus labyrinthicus* e na identificação da existência de um Fator Ansiolítico, abrindo um novo espectro em relação às drogas de combate aos sintomas da ansiedade.

Após uma breve revisão da literatura sobre o “Estado da Arte” do assunto, e de uma sucinta descrição dos procedimentos experimentais empregados, esta

dissertação reúne os principais resultados obtidos através de estudos comportamentais de ratos e camundongos frente ao uso de um Fator Ansiolítico “Pico 12”.

A interpretação e a discussão dos resultados obtidos, à luz dos conhecimentos disponíveis na literatura especializada, permitiram estabelecer as conclusões deste trabalho.

CAPÍTULO I
REVISÃO DA
LITERATURA

1.1 - Revisão dos Anfíbios

1.1.1- História

A classe *Amphibia* contém mais de 4.550 espécies, onde 44% destas pertencem as espécies de rãs conhecidas na América (Duellman, 1988), nas florestas tropicais e na Austrália.

O nome da classe *Amphibia* (gr. *Amphi*, duas + *bios*, vida) indica apropriadamente que a maioria das espécies vive parcialmente na água doce e na terra (Dullman, 1992). Tanto na estrutura, como na função, os anfíbios situam-se entre os peixes e os répteis, sendo o primeiro grupo de cordados a viver fora da água (Storer *et al.*, 1985). Alguns caracteres “novos” os adaptam para a vida terrestre, como pernas, pulmões, narinas comunicadas com a cavidade bucal e órgãos dos sentidos que podem funcionar tanto na água como no ar (Robert & Nathan, 1995). A figura 1.1 apresenta a espécie utilizada no presente estudo.

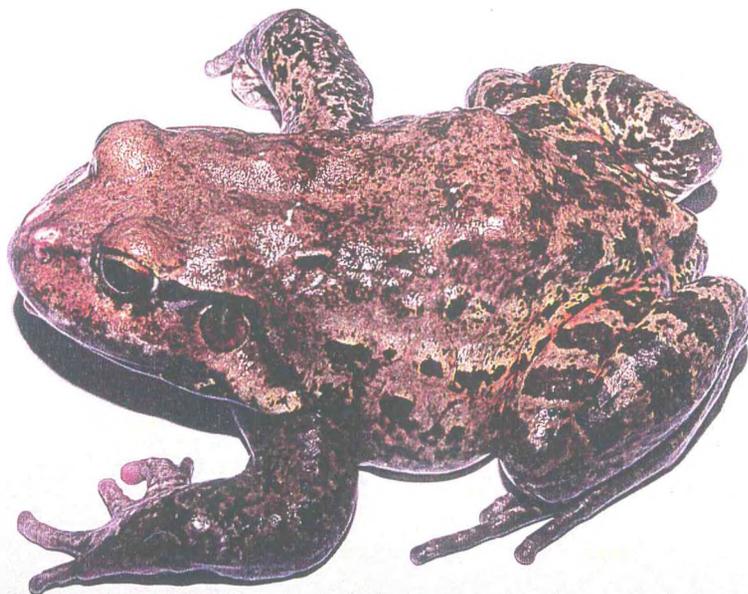


Figura 1.1 - Espécie *Leptodactylus labyrinthicus* (Spix, 1824).

Os anfíbios são importantes predadores de insetos e de outros invertebrados pequenos, e muitos são os principais vertebrados predadores em pequenas aberturas úmidas encontradas em troncos caídos, embaixo de pedras e casca de árvores, nas folhiços e no chão. São importantes para o ciclo de nutrientes entre a água doce e os ambientes terrestres, porque os nutrientes dos lagos incorporados em suas larvas, são transportados para a terra através da dispersão e morte de indivíduos metamorfoseados. Servem também de alimentos para diversos vertebrados, inclusive para o homem e muitas espécies são usadas no ensino e nas pesquisas da biologia (Storer *et al.*, 1985).

Os anfíbios eram tidos na antiguidade como animais extremamente venenosos. Na Idade Média a secreção de sua pele era empregada na elaboração de venenos que podiam causar a morte lenta ou rápida. No Oeste e no Sudeste da Ásia, utiliza-se há séculos os venenos de sapos no tratamento de sinusite, resfriados, inflamações locais e dores de dentes, sendo o primeiro e mais antigo uso de veneno de origem animal na terapêutica (Setebben *et al.*, 1993).

Os primeiros relatos do folclore médico ou aqueles escritos pela história, talvez foram de difícil documentação: curandeiros e feiticeiros da pré-história (e contemporânea), tinham um inestimável conhecimento das propriedades de plantas nativas e venenos animais, como medicamentos ou para introduzir estados de euforia. Este conhecimento foi transmitido empiricamente com o decorrer do tempo.

Os anfíbios mostram seu folclore também como oferendas aos deuses: em práticas religiosas, na literatura, nas artes, na medicina popular, nos esportes, no uso de determinadas posições para atrair as caças ou nas guerras e finalmente como fonte de alimentos. Uma grande influência dos anfíbios nas artes aparece nas pinturas e esculturas de toda a história da humanidade (Lazarus & Attila, 1993).

A história da biologia dos anfíbios começou por volta de 1600 a 1700 anos, a primeira pesquisa foi a eclosão do zigoto da rã feita por Merdan (1738) e Linnaeus (1758), na mesma época Rosenhoft (1758) publicou a história da vida das rãs na Europa.

Por volta de 1803, Francois Daudin publicou oito volumes da “Históire Naturelle, Generale et Particuliere des Répteis” e Leopold Fitzinger (1843) propôs a classificação de anfíbios e répteis.

Boulenger (1882) apresentou grande contribuição com seus estudos, catalogando as ordens *Anurans*, *Salamanders* e *Caecilians*. No início do século XX vários cientistas contribuíram com o estudo dos anfíbios na Europa, África e América do Sul, preocupando-se com a morfologia e a classificação, além de outras investigações. No Brasil os estudos dos anfíbios foram iniciados em São Paulo com Alípio de Miranda Ribeiro, que publicou fotos no livro Rã do Brasil 1926.

O professor Adolpho Lutz contribuiu com seu trabalho de Taxonomia das Rãs do Brasil e Bertha Lutz em 1973, classificou e publicou três gêneros de rãs brasileiras. No Museu do Rio de Janeiro, Antenor Leitão de Carvalho deu importante contribuição ao conhecimento dos microanfíbios brasileiros.

Pesquisadores de todas as partes do mundo têm se interessado pelos anfíbios devido à sua embriologia, endocrinologia e fisiologia em face da metamorfose, uma parte do ciclo de vida, ideal para o estudo da genética e no que concerne ao desenvolvimento da biologia e do transplante de tecidos. Os anfíbios têm tecidos que funcionam acima da escala de variação de temperatura ($>37^{\circ}\text{C}$), esses dados têm grande importância visto a necessidade de se conhecer os processos fisiológicos e bioquímicos (Nace, 1970; Gibb & Col, 1971).

Os anfíbios também têm contribuído para o estudo do comportamento e da evolução animal. No estudo evolutivo enfatiza-se o processo de formação das espécies, por serem estas vulneráveis a variações de temperatura, bem como por conseguirem sobreviver a prolongadas estiagens.

1.1.2 - Evolução

Os anfíbios chegaram à terra sofrendo profundas mudanças evolucionárias adaptativas. A mudança da respiração pulmonar em animais adultos tornou-se

necessária devido ao advento da vida terrestre. Tal respiração aumentou pela transformação da pele, de escamas para finas membranas respiratórias dérmicas. A perda de escamas, aumentou a síntese de um componente aquoso da secreção da pele, surgindo ainda a separação do fluxo sanguíneo pulmonar e fluxo sanguíneo sistêmico.

Os arcos aórticos que passavam entre as brânquias foram eliminados para a passagem do sangue pelos pulmões e corpo. O coração foi dividido em quatro câmaras, para acomodar esse duplo fluxo sanguíneo (Storer *et al.*, 1985).

As nadadeiras foram substituídas pelas pernas devido à variação do ambiente aquático para o terrestre, facilitando sua adaptação à temperatura e ao ambiente quente e seco, entretanto, limitada pelo papel respiratório da pele e por sua função na manutenção dos níveis de água através da absorção cutânea, a língua e os olhos também sofreram modificações para sua adaptação na vida terrestre. Vale ressaltar o aparecimento do órgão de Jacobson, que é uma comunicação ente a boca e as narinas em resposta química ao olfato e o paladar.

Os anfíbios de pele mole foram protegidos pela evolução através de um sistema de glândulas cutâneas, que secretam venenos como forma de proteção contra predadores. A vida no ambiente terrestre exigiu uma mudança na excreção nitrogenada.

Apesar de muitas adaptações para a vida no ambiente terrestre, os anfíbios, como grupo, limitaram sua expansão aos ambientes secos, devido à sua dependência com a respiração cutânea, incapacidade de produzir uma urina concentrada e de produzir um ovo terrestre resistente à dessecação (Storer *et al.*, 1985; Lazarus & Attila, 1993).

1.1.3 - Distribuição

Os anfíbios vivem espalhados por todo o mundo, exceto na Antártida e Groelândia. Eles vivem principalmente na água ou em lugares úmidos, nunca no mar.

São comuns em regiões temperadas úmidas e mais abundantes em florestas tropicais embora algumas rãs atinjam o círculo polar ártico (Storer *et al.*, 1985).

A família *Leptodactylidae* distribui-se no ocidente da Índia, desde o sul dos Estados Unidos até o sul da América do Sul. O gênero *Leptodactylus* é encontrado em toda a América do Sul, passando pelo México subindo até o Texas. No Brasil a espécie *Leptodactylus labyrinthicus* (Spix, 1824), está distribuída no serrado, na caatinga do nordeste, no norte (Roraima), no sudeste, além de outros países como: Venezuela, leste do Paraguai e por toda a Argentina (Duellman & Trueb, 1986).

1.1.4 - Classificação

A rã *Leptodactylus labyrinthicus* (Spix, 1824), tem seu “habitat” típico o estado do Rio de Janeiro, onde foi classificada como segue:

Reino - *Animalia*

Filo - *Chordata*

Subfilo - *Vertebrata*

Classe - *Amphibia*

Subclasse - *Salentia*

Ordem - *Anuran*

Família - *Leptodactylidae* (Berg, 1896)

Subfamília - *Leptodactylinae* (Berg, 1896)

Gênero - *Leptodactylus* (Fitzinger 1896)

Grupo - *Pentodactylus*

Espécie - *Leptodactylus labyrinthicus* (Spix, 1824) (Giulio & Eugênio, 1980).

A classe *Amphibia* é apresentada na (figura 1.2) tem a pele glandular úmida, sem escamas exceto cobra-cegas, tipicamente possui dois pares de extremidade (sem nadadeiras), duas narinas comunicadas com a cavidade bucal, crânio com 2 côndilos occipitais, coração com 3 câmaras, respiração por brânquias, pulmões e pele. Ovos com envoltório gelatinoso, geralmente posto na água, larvas aquáticas e quando adultas vivem em lugares úmidos da terra.

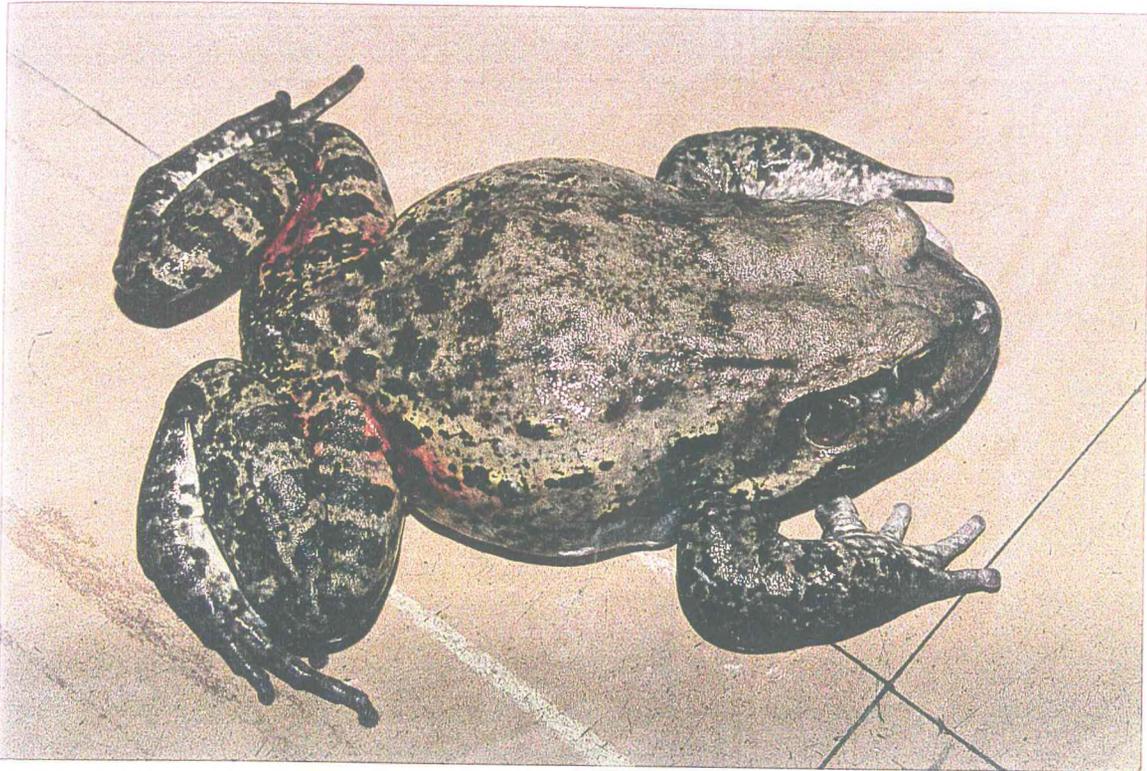


Figura 1.2 - Representante da Classe Amphíbia.

Subclasse *Salientia* - as vértebras com o centro reduzido ou ausente, ossos do crânio reduzidos, tronco curto, ilias alongados, pernas posteriores mais longas que anteriores (Duellman & Trueb, 1986).

Ordem *Anura* (Sapos e Rãs) - sem cauda, crânio estreito, sem teto sólido e muito reduzido, poucos ossos, poucas vértebras; as últimas fundem-se formando o uróstilo, costelas reduzidas; pernas posteriores maiores para facilitar o salto, em forma de palmouras, muita cartilagem no esqueleto, ovipostura e fecundação geralmente externa.

Família *Leptodactylidae* - semelhante aos bufonídeos, mas geralmente com dentes maxilares e sem órgão de Bidder, girinos com único espiráculo no lado esquerdo, boca com dentes no maxilar e mandíbula, além da inexistência de órgão reprodutor (Giulio & Eugenio, 1980).

1.1.5 - Morfologia da *Leptodactylus labyrinthicus* (Spix, 1824).

Aspecto externo - a pele é mole, lisa e úmida. A cabeça apresenta uma ampla boca, pequenas narinas valvulares, grandes olhos esféricos e atrás de cada olho, um tímpano achatado ou membrana timpânica. Cada olho possui uma pálpebra superior carnosa e opaca e uma inferior menor. Internamente a elas, existe uma terceira pálpebra transparente que se assemelha funcionalmente à membrana nictitante dos vertebrados superiores. Ela move-se para cima sobre o globo ocular para conservá-lo úmido no ar e para protegê-lo dentro da água (History, 1985).

Na extremidade posterior, situa-se o ânus ou abertura cloacal, no meio do corpo existe uma corcunda sacral onde a cintura pélvica se articula com o sacro. A pata anterior curta compõe-se de braço, ante-braço, pulso e mão; esta tem quatro dedos e um polegar vestigial. A pata posterior é formada por coxa, perna, tornozelo, (região dorsal) e pelo longo pé com sola (metatarso) estreita e cinco artelhos delgados, ligados por palmouras largas e finas. As palmas e as solas apresentam tubérculos cornificados que protegem os pés contra a abrasão e que fornecem tração em superfícies úmidas e escorregadias (Stebbins & Cohen, 1995).

Tegumento - a pele é constituída de glândulas mucosas e de venenos. A cada mês do ano durante o período ativo de uma rã, forma-se uma nova camada de pele abaixo da existente e a camada velha é eliminada ou mudada; ela fende-se ao longo do dorso e é tirada em um só pedaço com auxílio das “mãos” e geralmente é ingerida. A periodicidade da muda aparentemente é governada pelo nível do hormônio tireoideano circulante.

A coloração dos anfíbios pode ser cúprica ou viva e bem colorida. O padrão básico é fixo para a maioria das espécies, mas muitas rãs sofrem grandes modificações de uma coloração escura para clara em diferentes condições fisiológicas e ambientais (Stebbins & Cohen, 1995; Toledo & Jared, 1995).

Esqueleto e Músculo - o crânio é largo e achatado, a caixa craniana é estreita e as órbitas são grandes. Só existe dente no maxilar superior. A coluna vertebral

consiste de nove vértebras e de um delgado uróstilo de vértebras fundido, em forma de bastonete. O uróstilo auxilia a enrijecer a parte inferior do corpo que permite o animal a saltar.

A rã apresenta músculos muito mais desenvolvidos nas extremidades locomotoras e músculos mais diferenciados no tronco do que um peixe. Os músculos dos membros posteriores são alongados e grossos sendo adaptados para saltar e nadar (Storer *et al.*, 1985).

O Sistema Digestivo - os alimentos são lubrificados por um muco secretado na boca e passam através da faringe e do esôfago, ao entrar no estômago junto com as enzimas digestivas é liberado o ácido clorídrico, formando o bolo alimentar (Marcondes & Lammoglia, 1991).

Aparelho Circulatório - os girinos têm coração semelhante aos dos peixes com um átrio e um ventrículo. O coração dos adultos tem três câmaras e consiste de um ventrículo e duas aurículas, com válvulas entre as câmaras para impedir o retorno do sangue.

Aparelho Respiratório - os órgãos respiratórios são os pulmões, a pele e a mucosa da cavidade bucal.

Aparelho Excretor - Os rins são filtros seletivos que retiram resíduos orgânicos solúveis (especialmente uréia), excesso de sais minerais e água recolhidos das células e líquidos do corpo pelo sangue.

Os sistemas Nervosos e Órgãos dos Sentidos - Os hemisférios cerebrais são áreas de memórias, inteligência e do controle voluntário em animais superiores, mas nas rãs as funções são menos claras. Se todo o encéfalo, exceto o bulbo, for removido, a rã consegue saltar, nadar, capturar, ingerir presas e respirar; se o bulbo for retirado, ocorre a morte imediata do animal.

A rã é capaz de detectar determinadas cores e responde tanto a pequenos insetos, sua presas, como a predadores distantes o que indica larga faixa de acuidade visual.

O sistema auditivo é percebido através das membranas timpânicas, órgãos que recebem ondas sonoras do ar ou da água. Esse sistema tem dois canais: um para frequências baixas (menores que 1kHz) e outro para frequências altas (maiores de 1kHz), importante para o reconhecimento das vocalizações durante os corais da reprodução (Storer *et al.*, 1985).

1.1.6 - A Pele da Rã (*Leptodactylus labyrinthicus*, Spix, 1824).

A pele das rãs desempenha uma série de funções vitais, destacando-se a respiração, o transporte de água e eletrólitos, o controle da temperatura corpórea, a defesa contra o ataque de microorganismos e predadores, bem como a sua dessecação (Toledo & Jared, 1989; Stebbins & Cohen, 1995; Carvalho, 1995).

A pele tem uma tonalidade escura, com sombras indo do castanho ao negro é produzida pela melanina, um pigmento escuro usualmente encontrado nos melanóforos das células. Este pigmento está disperso ou concentrado sobre a ação hormonal (Stebbins & Cohen., 1995). Periodicamente muitos anfíbios mudam de pele devido a liberação de uma secreção mucosa entre as camadas córnea que se destacam durante a mudança (Toledo, 1984).

A pele dos anfíbios é um verdadeiro arsenal de produtos químicos naturais, com diversificadas atividades biológicas. Embora algumas espécies contenham toxinas extremamente potentes, esses animais são inofensivos ao homem por não possuírem mecanismos para inocular o veneno e pela natureza pacífica de seu comportamento (Sebben *et al.*, 1993).

A pele das rãs liberam uma grande variedade de compostos bioativos de várias categorias químicas: peptídios, aminas biogênicas, e alcalóides (Daly *et al.*, 1987), entre outras.

Intensivas investigações são realizadas na pele de anfíbios através do método de separação por HPLC. Esta técnica tem eficiência devido ao seu alto poder de resolução e separação de proteínas, peptídeos e substâncias bioativas.

Existem ainda outras técnicas como: a clonagem de RNAm e DNA da pele (Hoffman *et al.*, 1983; Andreu, 1985), a organização gênica dos peptídios que nos fornece uma visão da região das aminas bioativas (Richter *et al.*, A e B), além das técnicas de imunohistoquímica específica para anti-peptídios, imunoglobulina e hibridizações de RNAc (RNA clonado) para localização dos peptídios e proteínas nas glândulas granulosas.

1.1.7 - Glândulas de Veneno

Na pele das rãs encontramos dois tipos de glândulas multicelular, as glândulas mucosas e as granulosas, conforme mostra a (figura 1.3). As glândulas mucosas secretam um fluido aquoso que mantém a pele úmida e escorregadia, essencial para a respiração cutânea, reprodução, termocontrole, e proteção contra a predação. Já as granulosas, mais escassas e maiores, produzem uma secreção espessa, esbranquiçada, granulosa, que também protege o animal, até certo ponto, de predadores (Toledo & Villa, 1987).

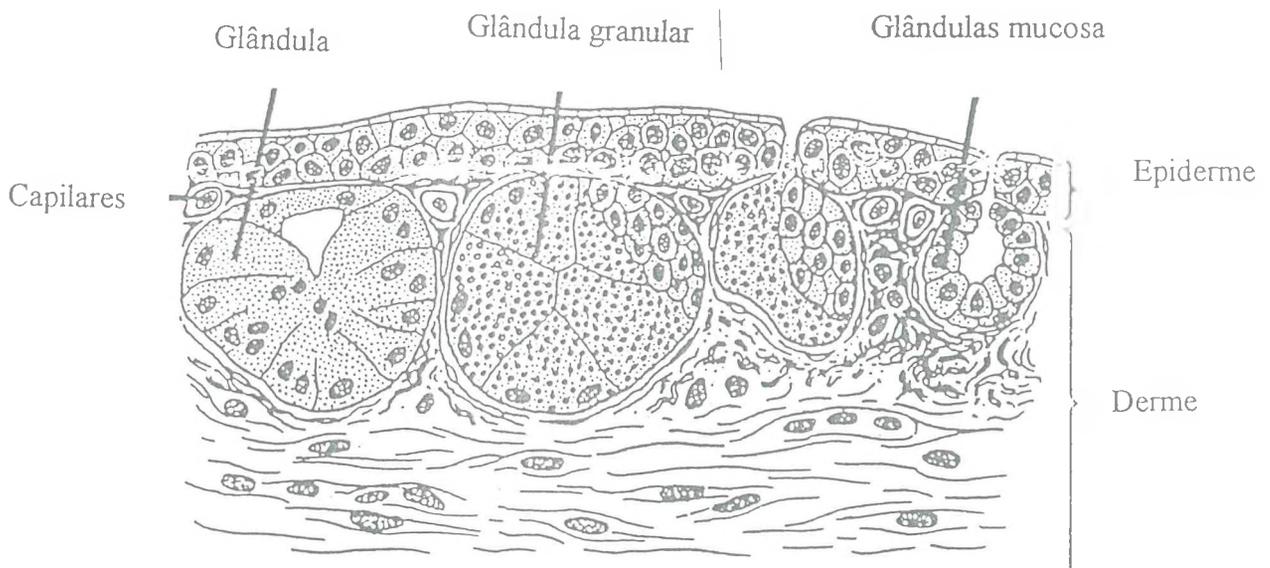


Figura 1.3 - Corte histológico da pele dos anfíbios.

As rãs *Leptodactylus labyrinthicus*, que habitam em regiões semi-áridas ou secas, observa-se que estas secretam através de suas glândulas substâncias cerosas, que são usadas para reter água em sua pele. As glândulas quando submetidas a qualquer tipo de estresse eliminam secreções venenosas que são ricas em substâncias químicas naturais com diversas atividades biológicas.

Segundo os autores (Lazarus & Attila, 1993; Carvalho, 1995) as glândulas granulares sintetizam e estocam produtos para a secreção, os quais incluem cinco grupos de espécies químicas: (i) peptídeos, tendo um grupo com atividade antimicrobiana e outro com princípio ativo; (ii) proteínas, substâncias proteináceas e enzimas; (iii) esteróides cardiotônicos e não cardiotônicos; (iv) alcalóides e (v) aminas biogênicas.

Carvalho em 1995 citou a existência de uma grande variedade de peptídeos na secreção cutânea de anfíbios, os quais em sua maioria exibem potentes atividades biológicas em mamíferos, incluindo taquicininas, bradicininas, ceruleínas, bombesinas, opióides, xenopsinas, hormônio liberador de tireotropina, além de outros grupos que apresentam atividades antimicrobianas, tais como: mangaininas, PGLa, XPF, LPF e CPF.

O autor, no mesmo estudo, observou ainda que o grupo das proteínas e substâncias proteináceas envolve as toxinas, tais como a toxina do *Triturus cristatus*, a pseudo-tritontoxina e a do *Pelobates fuscus*; enzimas envolvidas na biossíntese, nas modificações pós-translacionais (amidação, sulfatação, isomerização, etc.) e na inativação de substâncias e proteínas presentes em grânulos secretórios, FIM-A1, B1 e C1, APEG-proteína e β -galactosídeo-lectina.

Diversas enzimas foram também identificadas em anfíbios, por Camarão em 1995 e por Carvalho no mesmo ano, dentre as quais vale destacar as: convertases, amidases (peptidil-glicina- α -hidroxi-peptidase e peptidil-hidoxiglicina N-C ligase), exopeptidases (dipeptidil-aminopeptidase e carboxipeptidase), endopeptidase (metaloprotease).

Dentre os esteróides encontrados existem os cardiotônicos são as bufogeninas, também denominadas bufaginas ou bufadienólides e as bufotoxinas, formadas da união da suberilarginina com bufogininas e os não cardiotônicos como esgosterol, colesterol e o γ -sitosterol (Toledo & Jared, 1989). As bufogeninas constituem-se em uma família de substâncias que inibem a bomba de Na/K-ATPase (Lazarus, 1994).

O grupo dos alcalóides provém dos gêneros *Dendrobates* *Phyllobates*, que incluem batracotoxinas, histrionicotoxinas, indolizidinas, pulmiliotoxinas-A decahidroquinolonas, e numerosas classes menores, como gefirotoxinas, 2,6 dissustituídos piperidinas, alcalóides pirrolidínicos, piridil-piperidinas, indolalcalóides, azatriciclododecenos, alcalóides amidínicos, morfina, tetrodoxina e um grupo de alcalóides misturados (Daly *et al.*, 1987; Lazarus, 1994; Daly, 1995).

A classe das aminas biogênicas consiste de três grupos distintos, as indoalquilaminas, imidazolalquilaminas e fenilalquilaminas, o último dos quais incluem neuromoduladores como adrenalina, noroadrenalina e dopamina (Lazarus *et al.*, 1994). Muitas dessas aminas biogênicas e demais compostos bioativos encontram-se na pele dos *Leptodactylus labirinthicus* que são serotonina, catecolaminas como adrenalina, noroadrenalina, dopamina e recentemente isolada a leptodactilina, um aminofenólico com ação nicotina ganglionar e bloqueador neuromuscular. A presença da leptodactilina tem sido demonstrada em diversas espécies da família *Leptodactylidae* por Toledo & Jared (1995).

1.2 - Drogas Ansiolíticas

As drogas ansiolíticas são fármacos utilizados no combate aos sintomas causados pela ansiedade. O termo ansiedade foi usado para descrever a emoção normal associada ao estresse ou a eventos difíceis da psicologia que é uma condição patológica, a doença do final do século XX, causada pelo próprio homem. A ansiedade dentro de certos limites é considerada normal e o indivíduo não requer qualquer tipo de tratamento. Quando o quadro tende a se prolongar ou a se aprofundar interferindo

com o desempenho normal do indivíduo, torna-se necessário a sua avaliação (Silveira & Silva, 1996).

Muitas vezes, a ansiedade está associada a certos tipos de patologia como: hipertensão, asma, hipertireoidismo ou câncer, causando desconforto.

A ciência não tem medido esforços no sentido de eliminar o estresse do homem moderno, buscando drogas que sejam capazes de tirar a sensação de desconforto, tensão e ansiedade. Várias drogas são usadas no tratamento da ansiedade, com efeitos sedativos e tranquilizantes (Goodman, 1986).

A associação americana de psiquiatria conceitua a ansiedade como sendo tensão, apreensão e desconforto, que se originam dos perigos internos e externos; é uma resposta ao estresse ou ao estímulo ambiental (Penildo, 1996). A referida associação, em 1987, reformulou os quadros clínicos da ansiedade da seguinte maneira:

A reação de Ajustamento com Humor Ansioso - refere-se a sintomatologia exibida frente a evento vital estressante. Normalmente o quadro clínico é breve, em geral, não requer tratamento.

O Transtorno de Pânico - é o ataque súbito, incontrolável e inexplicável de medo, sensação de terror, normalmente acompanhado de manifestações autonômicas e intensas (dispnéia, palpitações, vertigem, sudorese das extremidades, sensações de asfixia e desconforto precordial).

Transtorno de Pânico com Agorafobia - é o pânico acompanhado da esquiva de situações sociais diversas.

A Agorafobia sem ataque de Pânico - normalmente está associada a outras patologias, sendo considerada um sintoma secundário.

A Fobia Social - de maneira geral, caracteriza-se pela esquiva de situação que exponha o paciente ao público, limitando assim, sua vida social.

Fobias Específicas - em que o estímulo fóbico é circunscrito a certas situações, caracterizam-se por medo irracional a certas atividades ou objetos. O medo é demasiadamente desproporcional às ameaças reais.

O Transtorno Obsessivo-Compulsivo - caracterizado pelo pensamento ou imagens consideradas sem sentido ou repugnantes e rituais ansiosos (compulsões), em que determinadas ações são realizadas de maneira repetitiva, sem qualquer finalidade (lavar as mãos ou pentear os cabelos frequentemente, arrancar os cabelos etc.).

O transtorno de Ansiedade Generalizado - apresenta sintomas semelhantes aos da reação de ajustamento, sendo considerados crônicos e profundos.

O transtorno de Estresse Pós-Traumática - é o quadro ansioso crônico, ligado a um evento estressante extremo e violento como tortura, estupro etc (Silveira e Silva, 1996).

1.2.1 - Classificação das Drogas Ansiolíticas

Os fármacos disponíveis no arsenal terapêutico contra a ansiedade são classificados em: benzodiazepínicos, agonistas da serotonina (receptor 5HT_A), barbitúricos, antagonistas dos β -adrenoceptores e outras drogas (Rang & Dale, 1993).

1.2.1 a - Benzodiazepínicos

O grupo dos benzodiazepínicos são os mais importantes clinicamente, seus efeitos resultam nas ações do sistema nervoso central (SNC). Os efeitos mais proeminentes são: a sedação, a hipnose, a redução da ansiedade, o relaxamento muscular e a atividade anticonvulsivante. (Gilman *et al.*, 1987).

- Estrutura Química dos Benzodiazepínicos

A estrutura Química dos benzodiazepínicos é apresentada na (figura 1.4). Todos eles possuem a mesma estrutura com um anel benzênico em comum, diferindo apenas nos grupos substitutos, como pode ser visto no (quadro 1.1).

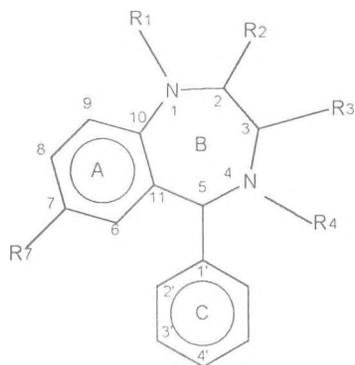


Figura 1.4 - Estrutura química dos benzodiazepínicos

Quadro 1.1 - Derivados dos benzodiazepínicos comercializados no Brasil.

| Nome genérico | Nomes comerciais | R1 | R2 | R3 | R7 | R2' |
|-----------------|--|---|--------------------|------|------------------|-----|
| Alprazolam | Frontal | anel triazólico fundido | | -H | -Cl | -H |
| Bromazepan | Deptran Lexotan Nervium Somalium | -H | =O | -H | -Br | =N- |
| Clobazan | Frisium Urbanil | -CH ₃ | =O | -H | -Cl | -H |
| Clonazepam | Rivotril | -H | =O | -H | -NO ₂ | -Cl |
| Clorazepato | Tranxilene | -H | =O | -COO | -Cl | -H |
| Clordiazepóxido | Psicosedin | - | -NHCH ₃ | -H | -Cl | -H |
| Cloxazolam | Elum Olcadil | -H | =O | -H | -Cl | -Cl |
| Diazepam | Calmociteno Diazepam Dienpax Kiatrium Noan Somaplus Valium | -CH ₃ | =O | -H | -Cl | -H |
| Flunitrazepam | Fluscirim Rohypnol | -H | =O | -H | -NO ₂ | -F |
| Flurazepam | Dalmadorm | -CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂ | =O | -H | -Cl | -F |
| Lorazepam | Lorax Mesmerim | -H | =O | -OH | -Cl | -Cl |
| Midazolam | Dormonid | anel imidazólico fundido | - | -H | -Cl | -F |
| Nitrazepan | Nitrazepam Nitrazepol Sonebon Sonotrat | -H | =O | -H | -NO ₂ | -H |
| Oxazepam | Clizepina | -H | =O | -OH | -Cl | -H |

Anel tetraidrooxazólico fundido em 4 e 5

- Efeitos Farmacológicos

Os efeitos mais importantes dos benzodiazepínicos, segundo Rang & Dale (1993), são no sistema nervoso central, e consistem de:

a) Redução da Ansiedade e Agressão - a administração dos benzodiazepínicos em animais torna-os mais dóceis e facilita o manuseio.

b) Sedação e Indução do Sono - os benzodiazepínicos diminuem o tempo de início do sono e aumentam o tempo de duração total do sono.

c) Redução do tônus muscular e coordenação - os benzodiazepínicos parecem reduzir o tônus muscular por uma ação central que é independente de seu efeito sedativo. O aumento do tônus muscular é um aspecto comum de estados de ansiedade no homem e pode contribuir para dores, incluindo a cefaléia, que freqüentemente perturba os pacientes ansiosos. Esse efeito relaxante pode ser portanto, clinicamente útil. Parece ser possível uma redução do tônus muscular sem produzir considerável perda da coordenação (James *et al.*, 1992; Rang & Dale, 1993).

- Efeitos Anticonvulsivantes

Os benzodiazepínicos possuem atividade anticonvulsivante em testes experimentais com animais. São mais eficazes contra a convulsão quimicamente induzida, do que as produzidas eletricamente (Rang & Dale, 1993).

- Farmacocinética dos Benzodiazepínicos

A farmacocinética está relacionada com as propriedades, físico-químicas das drogas Diazepan, Clonazepan, Clorazepato etc. Estas drogas são lipofílicas e completamente absorvidas sem antes sofrerem biotransformação. O Diazepan tem pico máximo de absorção de 1 hora em adultos e de 15 a 20 minutos em crianças. A biotransformação dos benzodiazepínicos ocorre no fígado, por meio do sistema microsômico, seus metabólitos possuem alta afinidade para se ligar às proteínas plasmáticas. Este fato facilita a utilização da diálise em caso de intoxicação.

O uso do álcool prejudica a biotransformação, principalmente do Diazepan e do Clordiazepóxido, como também a administração de outros depressores do SNC potencializando a ação dos benzodiazepínicos.

- Mecanismo de Ação dos Benzodiazepínicos

Cooper *et al.* (1996) verificou que grande parte das ações dos benzodiazepínicos, parecem resultar da sua capacidade em potencializar a ação inibidora neuronal, que é mediada pelo ácido gama-amino-butírico (GABA) como pode ser vista na (figura 1.5).

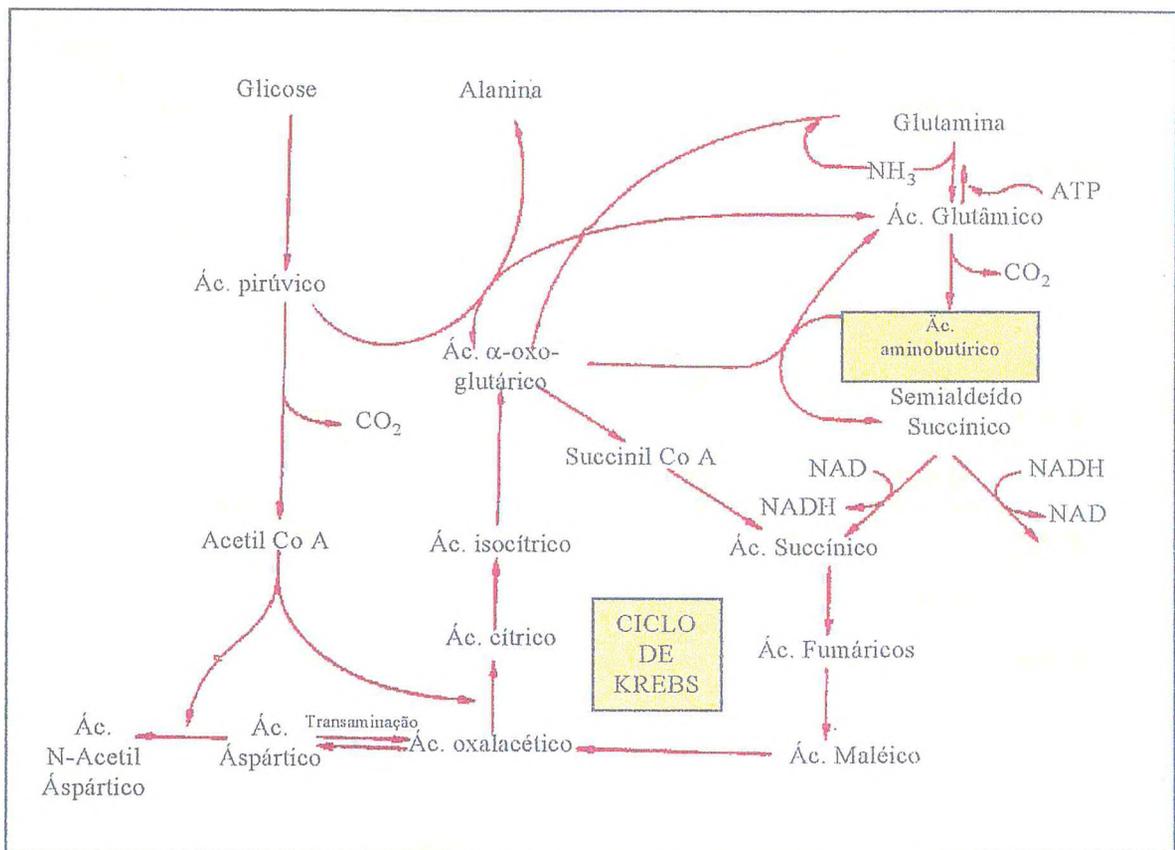


Figura 1.5 - Interrelação entre o Metabolismo dos Carboidratos e o ácido γ -aminobutírico (GABA).

Segundo os autores tal evidencia foi verificada por testes comportamentais e eletrofisiológicas. Os efeitos dos benzodiazepínicos quase desaparecem quando ocorre a administração prévia de um antagonista (como a bicuculina) ou de um inibidor da biossíntese do GABA (como a tiossemicarbazida). O GABA está presente em todas as áreas centrais, normalmente na substância negra, glóbulo pálido e hipotálamo, e seu conteúdo em outros órgãos é praticamente nulo.

O GABA é formado pela descarboxilação do ácido glutâmico através da descarboxilase glutâmica piridoxalfofato-dependente. É armazenado em vesículas e delas liberado pela despolarização da membrana, sendo para isso indispensável a presença de íons cálcio.

A ação inibidora do GABA é feita mediante sua interação com o respectivo receptor. Foram identificados dois tipos de receptores, (A e B). O complexo formado entre o GABA e o seu receptor (GABA-R) abre o canal de cloreto, aumentando sua condução intracelular, afetando a membrana do neurônio, despolarizando-a. A ação do GABA pode ser inibida por dois tipos de substâncias: os convulsivantes, que bloqueiam o R (bicuculina) e os que bloqueiam o canal de cloreto (picrotoxina). São os seus antagonistas (James *et al.*, 1992; Rang & Dale, 1993). Existem outras substâncias que inibem a sua biossíntese (hidrazidas) ou que inibem a sua liberação das vesículas (toxina tetânica).

A alta potência e a afinidade dos benzodiazepínicos, aliada às relações estrutura-atividade biológica, indicam que estes possuem receptores específicos para produzirem seu efeito, sendo óbvio que estes estão intimamente relacionados aos neurônios produtores de GABA. A afinidade é expressa pela constante de dissociação e está intimamente relacionada à estrutura dos benzodiazepínicos. Acredita-se que o mecanismo pelo qual os benzodiazepínicos atuam está aliado ao aumento da afinidade do GABA por seu receptor (Rang & Dale, 1993).

Silva em 1996 Verificou que os benzodiazepínicos intensificam a ação inibitória do GABA e quase são inativos na depleção do mediador como pode ser visto na (figura 1.6).

Uma das hipóteses mais aceitas é a de que os receptores do GABA são mantidos em estado de baixa afinidade pela ação de um peptídeo endógeno modulador a gabamodulina (James *et al.*, 1992; Silva, 1996).

A heterogeneidade do receptor de GABA é um fato óbvio. Admite-se que as diversas atividades exibidas pelos benzodiazepínicos sejam resultantes da interação de subtipos diferentes de receptores, com o mesmo fármaco e de maneiras diferentes (Siegel *et al.*, 1994), como evidenciado na (figura 1.6).

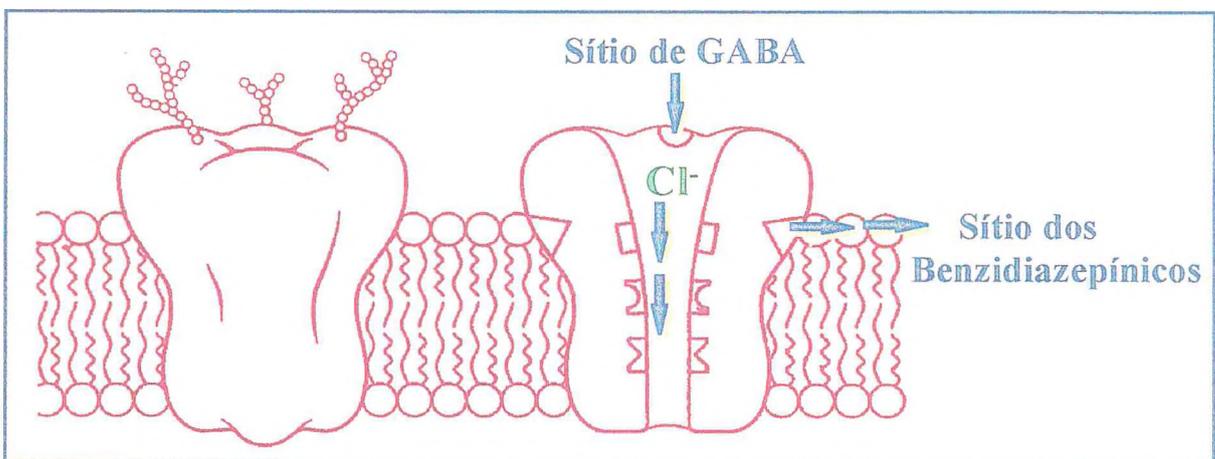


Figura 1.6 - Interação entre o GABA/benzodiazepínico.

- Mediador Endógeno

A existência de receptores benzodiazepínicos específicos sugeriu que, poderia haver um ligante endógeno (análogo às endorfinas em relação ao receptor da morfina), cuja função seria regular o efeito inibidor do GABA (Cooper *et al.*, 1996).

- Efeitos Indesejados

Segundo Silva 1996 os efeitos indesejáveis podem ser divididos em: toxicidade aguda, efeitos colaterais durante o uso terapêutico, tolerância e dependência.

Toxicidade aguda - a vantagem dos benzodiazepínicos é que em superdosagem causam sono prolongado, sem alteração da função respiratória e cardíaca, o antagonista eficaz é o flumazenil (Rang & Dale, 1993).

Efeitos Colaterais - os efeitos colaterais dos benzodiazepínicos são sonolência, confusão e deficiência da coordenação motora, o que prejudica consideravelmente as habilidades manuais (Rang & Dale, 1993).

Tolerância e Dependência - os benzodiazepínicos parecem possuir a mesma tendência a causar dependência, que outros hipnóticos como os barbitúricos, embora se verifique menor tendência à tolerância. A dependência em pacientes humanos e a interrupção do tratamento com os benzodiazepínicos após uma semana ou meses, causa um aumento dos sintomas de ansiedade, juntamente com tremores e tonturas (James *et al.*, 1992; Rang & Dale, 1993).

1.2.1 b - Agonista da Serotonina (Receptor - 5HT_{1A})

O primeiro membro desta classe foi a buspirona, sintetizada por Wuet *et al.*, em 1972. Sua ação ansiolítica foi descoberta por Goldberg e Finnerty em 1979. Foi introduzida no Brasil em 1989, sendo comercializada pelos nomes de Ansienon, Ansitec, Buscalm, Buspar e Paccun.

Na estrutura da buspirona (figura 1.7) distinguem-se dois pontos importantes para sua atividade: a imida azaspirodecanodiona e o grupo aril-piperazínico. Observa-se que a atividade máxima é exercida quando a porção imídica é unida ao anel arílico por quatro átomos de carbono.

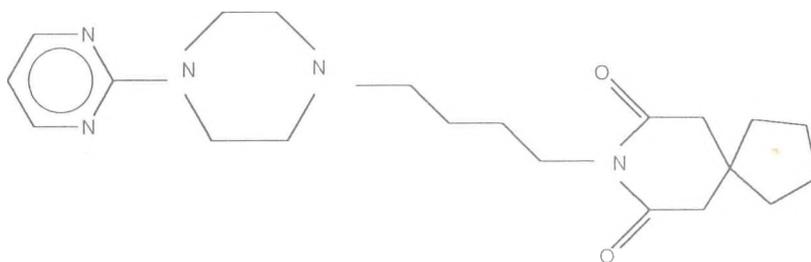


Figura 1.7 - Estrutura química da bupiriona

O anel relaciona-se com o bloqueio α -adrenérgico. Esta atividade pode ser alterada pela presença de certos substituintes. Dessa maneira, o grupo 3-ciano (repelente de elétrons) diminui a atividade e os grupo 3-metóxi (doadores de elétrons) aumentam a atividade (Silva, 1996).

- Propriedades Farmacológicas

A buspirona apresenta propriedades ansiolíticas comparáveis àquelas do Diazepam. Em doses terapêuticas, parece não causar sedação nem relaxamento muscular, não exercendo atividade anticonvulsivante ou hipnótico-sedativa, além disso, parece não dispor de potencial de abuso, nem levar à dependência física e psíquica, bem como não alterar os reflexos nem sofrer interação com o álcool.

- Farmacocinética

Quando administrado por via oral, a absorção é rápida e completa. Por via intravenosa, atinge rapidamente o cérebro. Sua meia vida é de 2,1 a 2,7 horas.

Os efeitos adversos são a sonolência e a tontura (em nível muito mais baixo que o provocado pelos benzodiazepínicos). Cefaléia, náusea, fadiga, nervosismo, obnubilação, diarreia, secura da boca e taquicardia são eventos mais raros.

A administração em paralelo com inibidores da MAO acarreta aumento da pressão arterial.

- Mecanismo de Ação

A buspirona atua como antagonista competitivo e seletivo da serotonina no sítio do receptor $5HT_{1A}$ ou 5_{1A} , ligando-se com alta afinidade.

1.2.1 c - Barbitúricos

Os barbitúricos foram empregados por muito tempo como ansiolíticos, sendo que sua administração pode causar problemas graves. Apresentam a facilidade em produzir tolerância, dependência física e sintomas de abstinências graves. Quando usados de maneira inadequada, podem ser fatais. Suas principais indicações na atualidade, são como anestésicos gerais e anticonvulsivantes (Silva, 1996).

1.2.1 d - Antagonistas β -adrenérgicos.

Os antagonistas β -adrenérgicos, como o propranolol, podem reduzir os sintomas autonômicos associados à fobias específicas, pelo bloqueio periférico dos sintomas beta mediados. Podem ser considerados como auxiliares no tratamento da ansiedade de modo geral e em estresse agudo (Rang & Dale, 1993).

1.2.1 e - Diversos

Vários fármacos que atuam no SNC foram empregados como ansiolíticos e atualmente são considerados como obsoletos. Entre estes pode-se citar o meprobamato. São encontrados ainda fármacos não barbitúricos, mas com ação semelhante como a cloromezanona. A não utilização destes fármacos na psiquiatria moderna deve-se ao fato de causarem graves efeitos adversos, até intoxicações, quando usado como ansiolíticos (Silva, 1996).

- **Diazepan**

O Diazepan é indicado como ansiolítico, miorelaxante e anticonvulsivante, auxiliando no tratamento da depressão suave. Serve também como terapia auxiliar do alcoolismo crônico, aliviando os sintomas que ocorrem com a abstenção do álcool. Sua meia vida é de 20 a 70 horas e seu metabólito, desmetilDiazepan, tem meia vida de 50

a 100 horas. Seus efeitos adversos são aqueles comuns aos benzodiazepínicos, causando a dependência. Em doses elevadas pode causar também a depressão e aumentar a tendência ao suicídio. (James *et al.*, 1992).

1.3 - Objetivos

I - Estudar substâncias extraídas da pele da rã *Leptodactylus labyrinthicus* com efeitos e fatores farmacológicos;

II - Isolar e caracterizar essas substâncias através de purificações cromatográficas;

III - Comprovar a existência de um Fator Ansiolítico no extrato da pele da *Leptodactylus labyrinthicus* (Spix, 1824) comparando o seu efeito, com a ação dos benzodiazepínicos, através de testes comportamentais com modelos de ansiedade.

CAPÍTULO 2
MATERIAIS

2 - MATERIAL

Para o desenvolvimento deste trabalho foram necessários os seguintes itens:

2.1 - Animais

As rãs *Leptodactylus labyrinthicus*, (Spix, 1824) foram coletadas na cidade de São Gonçalo do Amarante e transportadas para o laboratório de Neuropeptídeos da UFC.

Nos experimentos foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando entre 250-300g e camundongos albinos, variedade Swiss, adultos, do sexo masculino pesando em torno de 25-30g, oriundos do Biotério Central e do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Todos os animais foram mantidos à temperatura ambiente, recebendo ração padrão e água.

2.2 - Equipamentos

A instrumentação requerida para a realização dos experimentos é descrita a seguir:

- * HPLC - (Cromatografo Líquido de Alta Eficiência) modelo SCL-10A, SPD-10 AV, LC-10AS, Shimadzu - Japão
- * Chromatopac C-RGA, Shimadzu-Japão
- * HPLC - modelo SPD-10A, LCAS, Shimadzu - Japão
- * Chromatopac C-R6A, Shimadzu - Japão
- * Registrador EGB - SP, Brasil.
- * Holeboard - Biological Research Apparatus 21025 Comerio - Varese Italy

- * Recipiente para teste de comportamento de forma retangular - medindo 40 x60x20cm com uma escada de 5 degraus (3cmx3cmx 8cm de comprimento)
- * Cilindro de plástico - com capacidade de 20L e diâmetro interno de 28cm.
- * Plus-Maze - de madeira com dois braços abertos 50cmx10cm e dois braços fechados do mesmo tamanho com paredes de 50cm de altura, sem cobertura a 50cm de altura do chão
- * Centrífuga Refrigerada - Beckman, modelo J-212 C, Beckman Instruments, USA
- * Centrífuga Excelsa Baby, modelo 206 - FANEM
- * Coluna Shim pack Prep. ODS (H)
- * Coluna C-18 LC shim- pack CLC-ODS
- * Liofilizador Metal lux
- * Banho-Maria Soc. Fabbe Ltda.
- * Estilete para deslocamento cervical
- * Caixa Básica Cirúrgicas (tesouras e pinças e algodão)
- * Seringas de 1 e 5ml
- * Microseringas de 50 e 500µl
- * Papel de registro
- * Tubos de ensaios
- * Tubos de Eppendorf - Gilson, França
- * Pipetas - Gilson, França

- * Ponteiras - Gilson, França
- * Erlenmayer
- * Kitazatu
- * Placas de Petri
- * Tubos de Centrífugas
- * Becker
- * Provetas

2.3 - Soluções

- Solução salina
NaCl 0,9 %
- Solução de Adrenalina
Adrenalina 100µg/ml
- Solução de HCl 0,1M
- Solução de Azida a 0,02%

2.4 - Drogas e Reagentes

- Acetonitrila - Carlo Herba
- Ácido clorídrico P.A., Merck - Brasil
- Ácido trifluoracético P.A., Merck - Brasil
- Cloreto de sódio P.A., Merck - Brasil
- Diazepan

CAPÍTULO 3

MÉTODOS

3 - MÉTODOS

Neste trabalho foram realizados sete tipos de métodos experimentais, para a coleta de dados, os quais serão descritos a seguir:

3.1 - Extração do Veneno

As rãs, *Leptodactylus labyrinthicus* são coletadas e transportadas para o laboratório; no dia seguinte são submetidas a uma lavagem com água potável e água destilada, em seguida recebem uma injeção subcutânea no dorso de 1ml de Adrenalina 100 μ g/ml em ácido clorídrico 0,01N, a seguir ficam em repouso por 20min. Após este período, as rãs são massageadas para aumentar o estresse e liberar a secreção glandular como mostra a (figura 3.1).

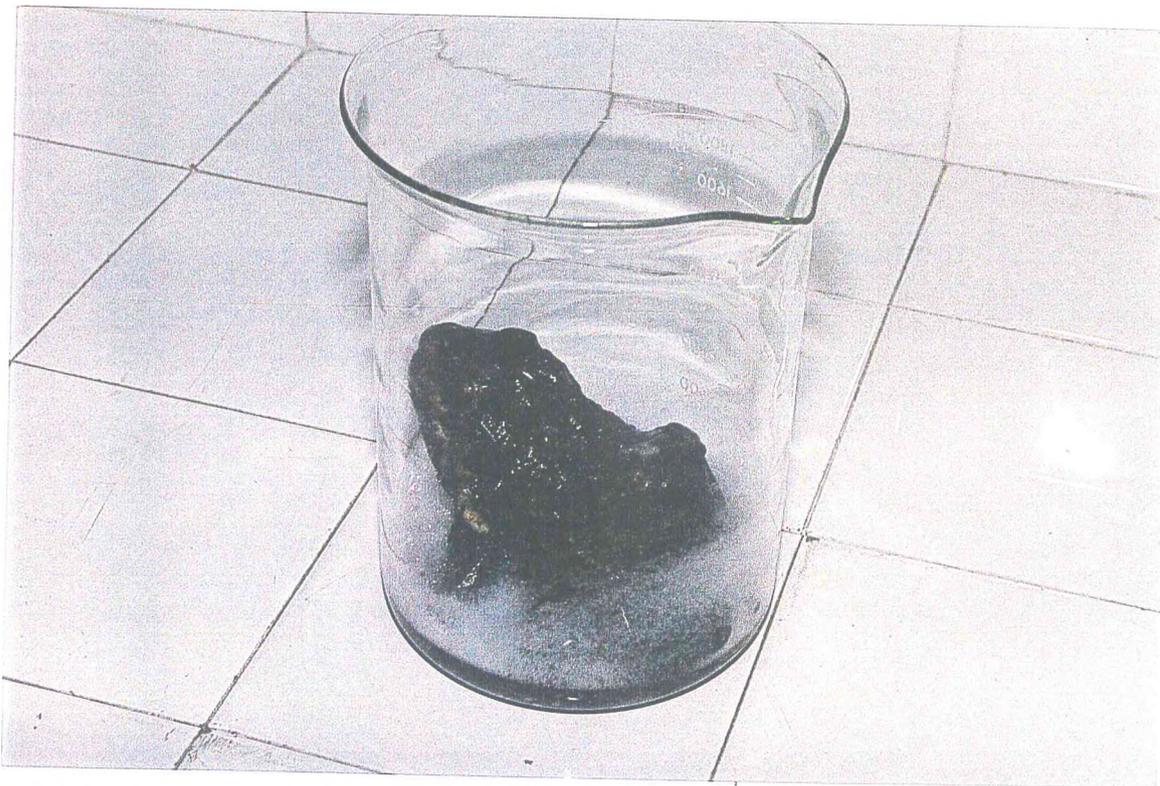


Figura 3.1- Liberação da secreção venenosa da pele do *Leptodactylus labyrinthicus*.

A azida 0,02% é adicionada à secreção e mantida sob refrigeração à temperatura de 4°C por um período de 24 horas. Após este período o material é centrifugado a 8.000xg por 20 minutos. O precipitado é descartado e o sobrenadante liofilizado.

O rendimento do veneno bruto é variado dependendo da alimentação e de fatores ambientais em diversas épocas do ano como observado na tabela 1.

Tabela 1 - Levantamento do extrato bruto das rãs *Leptodactylus labyrinthicus*

| DATA DE EXTRAÇÃO DO VENENO BRUTO | NÚMERO DE RÃS | PESO (mg) | PESO POR CADA RÃ (mg) |
|----------------------------------|---------------|-----------|-----------------------|
| 10 - 06 - 96 | 1 | 109 | 109 |
| 11 - 06 - 96 | 2 | 223 | 111,5 |
| 16 - 07 - 96 | 5 | 915 | 183 |
| 30 - 07 - 96 | 15 | 970 | 64,6 |
| 23 - 09 - 96 | 11 | 1.792 | 162,9 |
| 10 - 12 - 96 | 6 | 674 | 112,3 |
| 22 - 01 - 97 | 6 | 515 | 85,8 |
| 12 - 03 - 97 | 11 | 2.000 | 181,8 |

3.2 - Purificação do Veneno em HPLC com Coluna Preparativa

O veneno bruto liofilizado é dissolvido em água bidestilada adicionada de 0,05% de TFA (ácido trifluoracético) e novamente centrifugado a 8.000xg por 20min. O precipitado é desprezado e o sobrenadante é submetido a análise cromatográfica no HPLC ao qual está acoplado uma coluna preparativa C-18 (Shim pack prep. ODS 2,5x30cm) sendo eluído com um fluxo de 5ml/min com um gradiente de acetonitrila variando de 5 a 80% como demonstra o programa a seguir:

| # | TEMPO | FUNÇÃO | GRADIENTE |
|----|--------|----------|-----------|
| 0 | 0,01 | TT. Flow | 1,00 |
| 1 | 0,01 | B. Conc. | 5,00 |
| 2 | 5,00 | TT. Flow | 5,00 |
| 3 | 20,00 | B. Conc. | 10,00 |
| 4 | 33,00 | B. Conc. | 10,00 |
| 5 | 36,00 | B. Conc. | 27,50 |
| 6 | 54,00 | B. Conc. | 30,00 |
| 7 | 68,00 | B. Conc. | 30,00 |
| 8 | 75,00 | B. Conc. | 45,00 |
| 9 | 78,00 | B. Conc. | 80,00 |
| 10 | 88,00 | B. Conc. | 80,00 |
| 11 | 93,00 | B. Conc. | 5,00 |
| 12 | 103,00 | B. Conc. | 5,00 |

$\lambda = 214 \text{ nm}$ T.Flow = tempo de fluxo

$f = 500 \text{ Hz}$ B.Conc = concentração de acetonitrila

A análise do sobrenadante do extrato bruto foi efetuada em um HPLC dotado de um detector de absorção de luz ultravioleta (com comprimento de onda de 214nm e sensibilidade de 500Hz), acoplado a um registrador. Os componentes dos picos são colhidos em kitazato, no instante em que são registrados, sendo novamente liofilizados pesados e redissolvidos em água bidestilada para serem testados com fins farmacológicos. Em torno de 2mg/kg do componente dos picos são injetados nos animais.

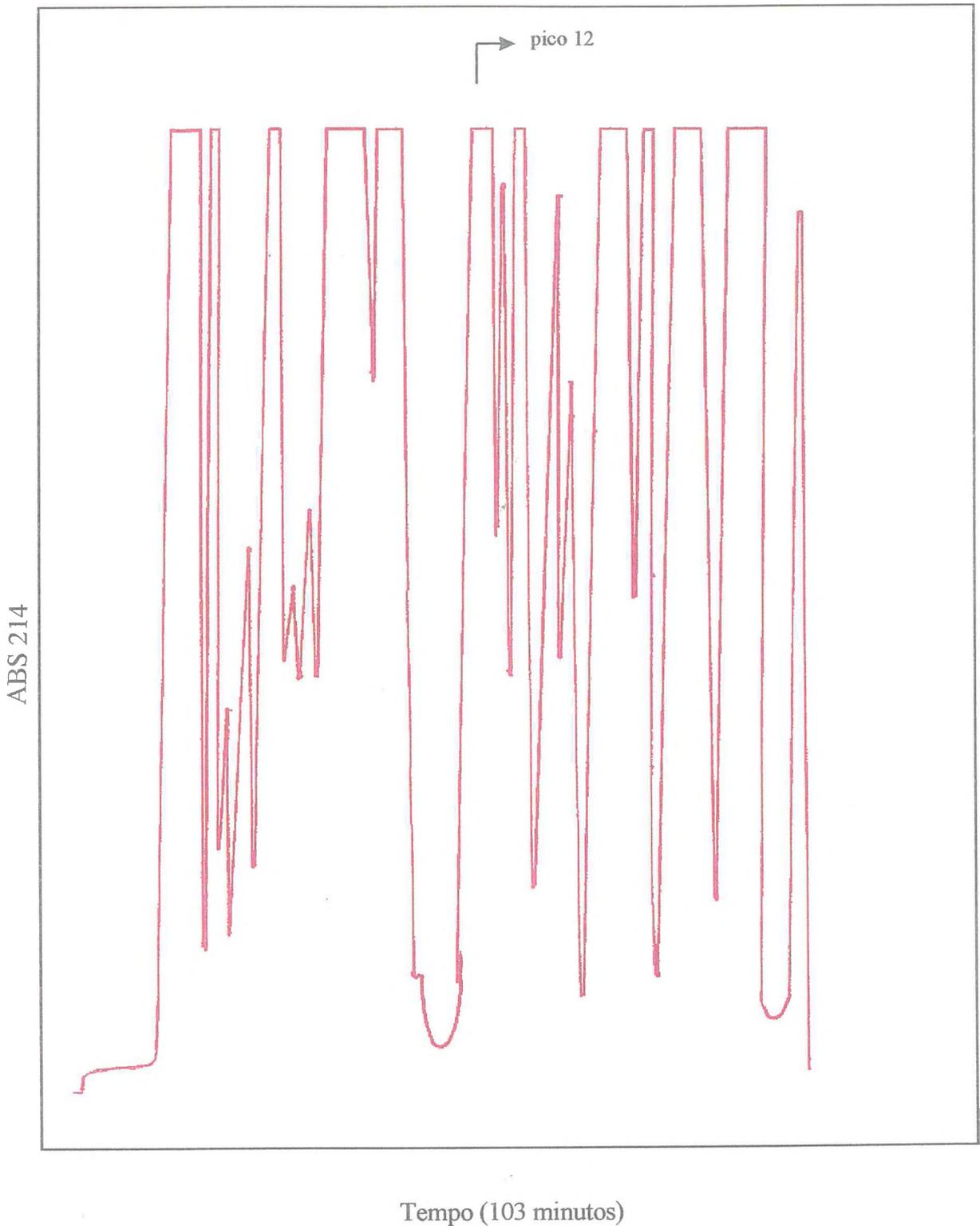


Figura 3.2 - Perfil de eluição do extrato bruto extraído da pele da *Leptodactylus labyrinthicus*

3.3 - Determinação do Grau de Pureza do “Pico 12” com Coluna Analítica.

Uma fração do “Pico 12” foi submetida a análise de purificação em HPLC sob as seguintes condições:

- * Quantidade injetada : 25µl da solução de 2mg/ml
- * Coluna empregada: coluna fina analítica específica
- * Eluição: acetonitrila
- * Gradiente: 27,5
- * Tempo de retenção: 36min
- * Fluxo: 1ml/min
- * Programa: o mesmo da coluna preparativa
- * Detetor: absorção de luz ultravioleta (com comprimento de onda de 214nm)

Uma fração do “Pico 12” em estudo foi submetido a análise de purificação, 25µl da solução de 2mg/ml foi injetada no HPLC em uma coluna fina analítica específica eluindo em acetonitrila por 103 minutos, com um fluxo de 1ml/min e um gradiente de acetonitrila de 5 a 80%, sendo este o mesmo programa da coluna preparativa.

O material passou por um detector de uma absorção de luz ultravioleta com um comprimento de onda de 214nm. O pico identificou um grau de pureza e foi registrado em gráfico, como veremos no Capítulo IV.

Observamos um pequeno contaminante com propriedades físico-químicas semelhante ao do pico com um grau de pureza de 95%.

3.4 - Toxicidade

Verificou-se que o “Pico 12” injetado nos animais (ratos e camundongos) mesmo em altas concentrações, não causou a morte destes e a DL_{50} portanto, foi nula.

A toxicidade e os efeitos colaterais foram determinados através de testes comportamentais dos ratos *Wistar* adultos pesando 250-300g e camundongos *Swiss* pesando entre 25-30g, escolhidos aleatoriamente e mantidos com alimentação e água a vontade.

Administrou-se nos ratos quantidades variando de 80 a 300 μ l, em doses de 2, 4 e 10mg/kg do “Pico 12” pela via intraperitoneal e intrapeniana. Nos camundongos *Swiss*, as quantidades injetadas foram de 50, 80 e 100 μ l com dose de 2mg/kg, todas pela via intraperitoneal. O controle foi realizado através da administração de uma solução salina 0,9%.

Os animais foram observados imediatamente após as injeções, por um período inicial de duas horas, sendo observados os seguintes parâmetros: tranquilização, quietude, sonolência sem entrar em sono profundo, sedação, ptose e analgesia. O tempo total de observação foi de aproximadamente 72 horas.

3.5 - Testes Comportamentais

Para o estudo do Fator Ansiolítico foram realizados 4 tipos de testes comportamentais, descritos a seguir:

3.5.1 - Teste do “Plus-Maze”

Equipamento - o “Plus-Maze” é um equipamento desenvolvido por Pellow & File em 1986 e consiste de um recipiente de madeira com dois braços abertos e dois braços fechados, medindo 50x10cm cada um, com paredes de mesma espessura e suspenso a 50cm de altura do chão, arranjados de forma que os braços de mesmo tipo fiquem em sentidos opostos, como mostra a (figura 3.3).

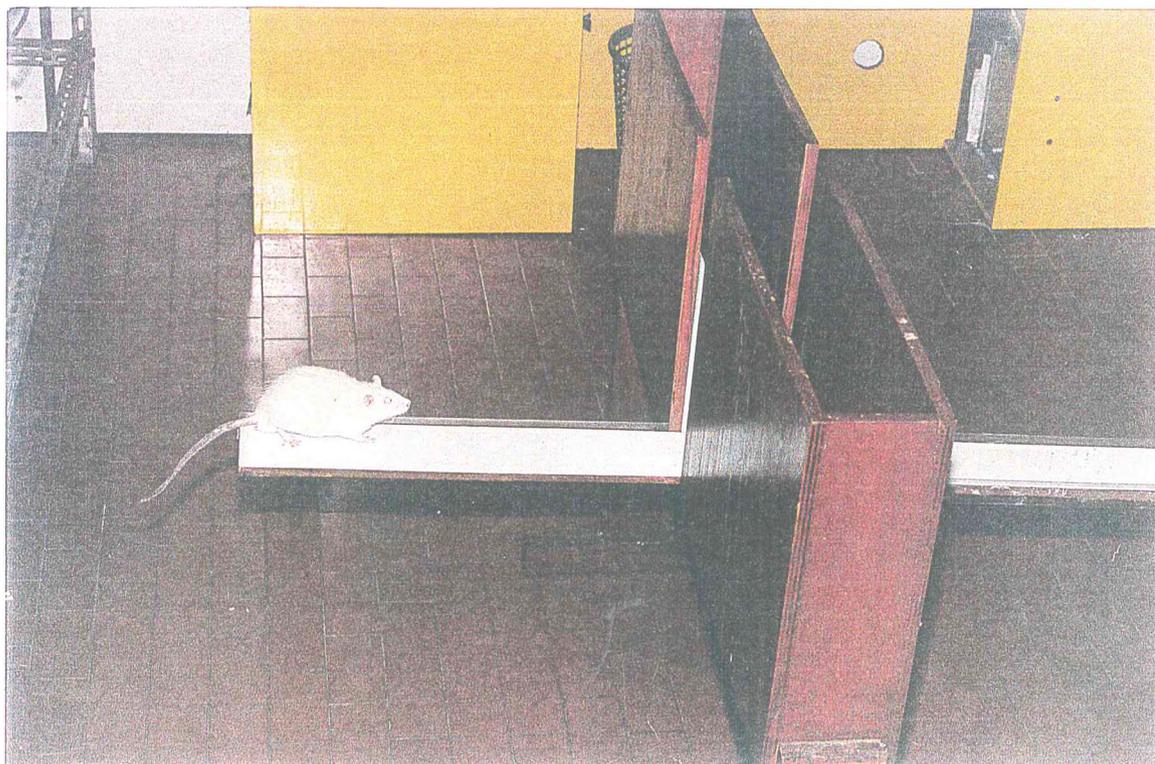


Figura 3.3 - Teste do “Plus-Maze”

Animais - neste experimento foram utilizados ratos machos *Wistar* (pesando entre 250-300g) mantidos numa sala de teste iluminada com lâmpada de 40W, sem produzir sombra o que induziria o animal a procurar um lugar mais escuro. Os animais foram mantidos durante 10 a 12 dias sob ar refrigerado a 23°C, num ciclo de 12 horas luz e 12 horas escuro (um dia), com acesso à comida e água. Somente um experimentador manuseia os animais diariamente, a fim de que os mesmos aos poucos se condicionem a todos os fatores e elimine o máximo de variáveis que provavelmente venham a contribuir para a veracidade dos resultados.

Duração do Experimento - os experimentos foram sempre realizados no período da manhã e cada animal injetado recebia solução salina 0,9%, Diazepan ou Fator Ansiolítico “Pico 12” com uma latência de 10min e 5min de teste.

Distribuição dos animais por grupo:

a) Grupo de ratos *Wistar* recebeu injeções intraperitoneal de solução salina 0,9 % e volume de 250 μ l.

b) Grupo de ratos *Wistar* macho recebeu injeção intraperitoneal de Diazepan 1mg/kg e volume de 500 μ l.

c) Grupo de ratos *Wistar* machos recebeu injeção intraperitoneal de 80 a 180µl do Fator Ansiolítico “Pico 12” na dose de 2mg/kg (6mg/ml).

3.5.2 -“ Hole-board” - Atividade Exploratória.

Equipamento - o “Hole-Board” é um equipamento desenvolvido por Boisier & Simon em 1963 e consiste de uma placa perfurada com 16 furos de 3cm de diâmetro, medindo 40x40cm e espessura de 2,2cm, suspenso por duas pernas móveis e ligado a um detector de infravermelho (I.R), que mede quantas vezes o animal coloca a cabeça em cada furo.

Animais - escolheu-se aleatoriamente camundongos machos adultos (pesando 25-30g), os quais foram transportados pela manhã cedo para a sala de teste, com acesso à água e comida. Os teste foram realizados sempre no final do dia.

Duração do experimento - cada camundongo após ser injetado com o Fator Ansiolítico “Pico 12”, solução salina ou Diazepan, tem um período de latência de 5 min. O tempo de duração do teste é de 5min.

Distribuição dos animais - 10 (dez) animais por grupo:

a) O grupo de camundongos machos que recebeu injeções intraperitoneal de 100-250µl de Diazepan com dose de 0,5mg/kg.

b) O grupo de camundongos machos que recebeu injeções de 100µl de Diazepan com dose de 1mg/kg.

c) O grupo de camundongos machos que recebeu injeções intraperitoneal de 100µl do Fator Ansiolítico “Pico 12” com dose de 2 mg/kg.(6 mg/ml).

d) O grupo de camundongos que recebeu injeções intraperitoneal de 100µl de solução salina 0,9% (grupo controle).

3.5.3 - Teste da Natação

Equipamento - consiste de um recipiente cilíndrico de plástico, com capacidade de 20L e diâmetro interno de 28cm, de cor verde escuro, cheio com água potável onde os animais são colocados um a um dentro da água para a observação de todos os seus movimentos.

Animais - camundongos machos foram escolhidos de maneira semelhante ao experimento anterior.

Duração do experimento - cada camundongo após ser injetado com a solução salina, Diazepan, Fator Ansiolítico “Pico 12” e anafranil (antidepressivo) tem um período de latência de 10min, 1min de adaptação e 5min de teste.

Distribuição dos animais - 10 (dez) camundongos por grupo:

- a) O grupo de camundongos machos que recebeu injeções intraperitoneal de 100µl de solução salina 0,9 %.
- b) O grupo de camundongos machos que recebeu injeção intraperitoneal de 100µl de Diazepan com dose de 0,5mg/kg.
- c) O grupo de camundongos machos que recebeu injeção intraperitoneal de 100µl de Diazepan com dose de 1mg/kg.
- d) O grupo de camundongos que recebeu injeção intraperitoneal de 100µl do Fator Ansiolítico “Pico 12” com dose de 2mg/kg.
- e) O grupo de camundongos que recebeu injeção intraperitoneal de 100µl de anafranil com dose de 2mg/kg.

3.5.4 - Teste da Escada

Equipamento - consiste de um recipiente de forma retangular medindo 40cmx 60cmx20cm com uma escada de madeira com 5 degraus (3mx3cmx8cm de comprimento) como descrito por Stéru *et al.* em 1987. Os camundongos têm 1 minuto para se adaptar ao recipiente.

Animais - escolhidos à maneira do Teste 3.5.2.

Duração do experimento - cada camundongo após ser injetado com solução salina, Diazepan ou Fator Ansiolítico “Pico 12” tem um período de latência de 10 min, 1 min de adaptação ao recipiente e 3 min de teste.

Neste experimento foram medidos o número de degraus da escada, subida e descida, e o número de vezes que o animal fixava as patas posteriores ao chão e ficava de pé “rearing”.

Distribuição dos Animais - 10 (dez) animais por grupo:

a) O grupo de camundongos machos que recebeu injeções intraperitoneal de 100µl de solução salina 0,9%.

b) O grupo de 10 camundongos machos que recebeu injeções intraperitoneal de 100µl de Diazepan com dose de 0,5mg/kg.

c) O grupo de 10 camundongos machos que recebeu injeções intraperitoneal de 100µl do Fator Ansiolítico “Pico 12” com dose de 2mg/kg.

3.6 - Métodos Estatísticos

A análise estatística destes experimentos foi realizada através de análise de variância, teste de Tukey, teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, comparações múltiplas e representação gráfica.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4 - RESULTADOS

4.1 - Extração do Veneno

Da excreção da pele das rãs, *Leptodactylus labyrinthicus*, foi obtido um pó bruto, através do processo de liofilização.

4.2 - Purificação em HPLC com Coluna Preparativa

O pó bruto foi diluído em água bidestilada 20mg/ml, centrifugado e injetado no HPLC com a coluna preparativa. O material coletado resultou em vários picos, como evidencia a (figura 4.1). Essas frações correspondentes aos picos foram liofilizadas e resultaram umas em pó e outras em resina seca.

As frações foram novamente dissolvidas em água bidestilada e injetadas intraperitonealmente em camundongos. A fração que denominou-se “Pico 12” apresentou atividade ansiolítica.

4.3 - Determinação do Grau de Pureza do “Pico 12” com Coluna Analítica

O “Pico 12” foi escolhido após vários testes farmacológicos e injetado em HPLC com coluna analítica. O cromatograma mostra a existência de um pequeno contaminante, o qual não modificou o grau da atividade ansiolítica nos camundongos, por ter propriedade físico-química semelhante ao “Pico 12”. Assim, o material usado nos testes farmacológicos passou a ter mais segurança em face do elevado grau de pureza do Fator Ansiolítico “Pico 12” ser em torno de 95%.

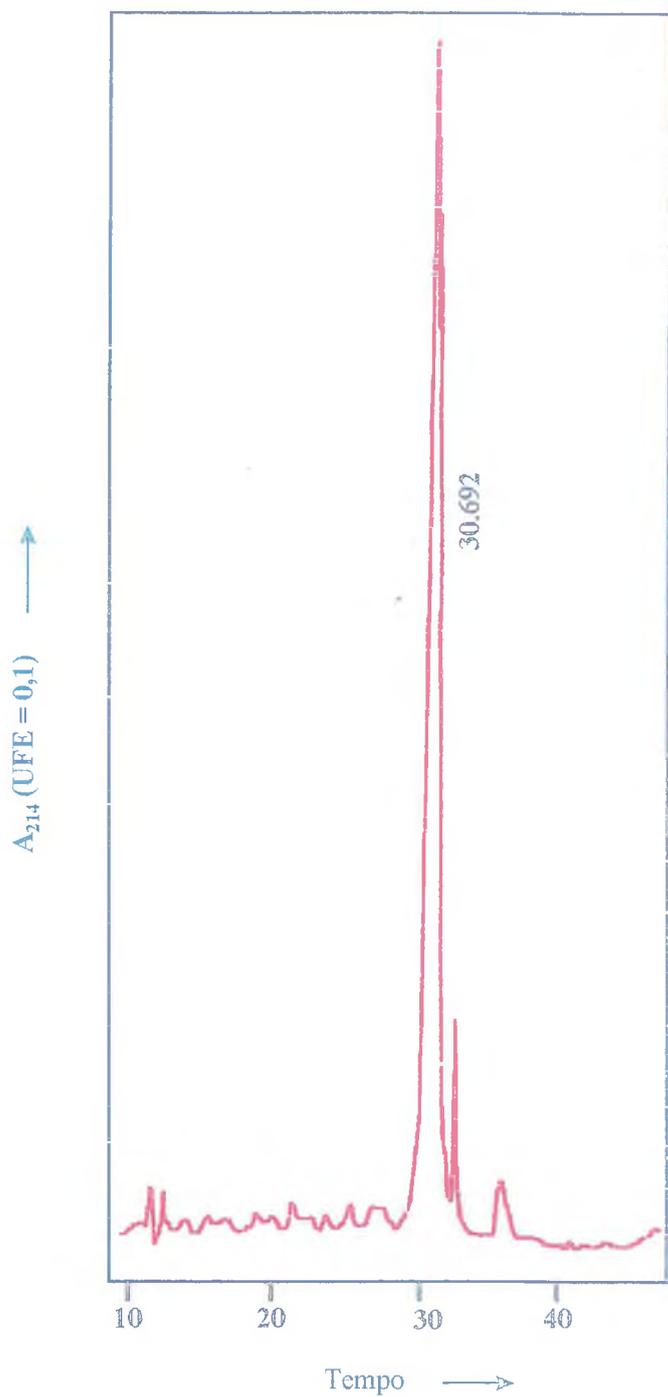


Figura 4.1 - Perfil de eluição do “Pico 12” proveniente da *Leptodatylys labyrinthicus* (Spix, 1824) com 95% de pureza.

4.4 - Toxicidade

A administração de doses crescentes do “Pico 12” resultou em diversas alterações.

Em doses de 2, 4 e até 10mg/kg os animais, ratos e camundongos, ficaram tranquilos, permanecendo com suas funções cognitivas normais: dormiam e acordavam rapidamente quando eram estimulados e locomoviam-se normalmente. Não se notou alteração nas funções fisiológicas, o que evidencia a ausência de efeitos colaterais. No que diz respeito ao comportamento, observou-se uma diminuição na agressividade permitindo-se o contato com outros camundongos de maneira mais social.

Em doses acima de 10, 15 e 20mg/kg, os animais, ratos e camundongos, ficaram dopados, tranquilos e sonolentos, escondiam-se nos cantos das caixas, com poucos movimentos de locomoção, observando-se um total relaxamento muscular. A administração de doses acima de 20mg/kg não foi necessária, por não ocorrer variações significativas no comportamento dos animais em estudo.

4.5 - Determinação do Fator Ansiolítico “Pico 12”

Caracterizou-se o “Pico 12” como sendo um Fator Ansiolítico a partir da semelhança deste com os efeitos farmacológicos de várias doses dos benzodiazepínicos (Diazepan) nos testes comportamentais em modelos de ansiedade.

4.6 - Teste do “Plus-Maze”

Este teste é um método usado para a determinação farmacológica de drogas ansiolíticas. Durante o teste mede-se o número de entradas dos animais e o tempo de permanência destes em cada braço (aberto e fechado).

Distribuição dos animais por grupo:

a) Os ratos do grupo controle que foram injetados com solução salina 0,9% ao serem colocados entre os braços do “Plus-Maze”, tiveram preferência pelos braços fechados, o que é nato. Quando caminharam pelos braços abertos manifestaram sinais relacionados com a ansiedade como: defecação, tremores e aumento da agressividade, retornando imediatamente aos braços fechados.

b) O grupo dos ratos que foram injetados com Diazepan: em doses acima de 1mg/kg, - ficaram dopados, diminuíram as atividades locomotoras, a agressividade e a capacidade exploratória; em dose igual a 1mg/kg, - notou-se a diminuição da atividade ansiolítica, o aumento da capacidade exploratória e locomotora, diminuição da agressividade, sem apresentar sinais de dopação e demonstração de medo.

c) O grupo dos ratos que foram injetados com Fator Ansiolítico “Pico 12”: em quantidades variando de 120µl a 180µl e concentração de 6 a 20mg/kg - permaneceram nos braços fechados, tranquilos, sem agressividade, com ptose e baixa atividade exploratória; em quantidades compreendidas entre 70 e 80µl e com dose de 2mg/kg - mudaram o comportamento: diminuíram a agressividade, aumentaram a atividade exploratória e locomotora, permaneceram maior tempo no braços abertos, justificando que estavam sem medo e sem ansiedade.

4.6.1 - Metodologia e Análise Estatística do “Plus-Maze”

A análise estatística dos resultados dos testes do “Plus-Maze” são apresentadas a seguir:

- **Número de Entradas nos Braços Abertos**

A comparação entre os tratamentos foi realizada através do teste F-Snedecor da análise de variância. Para a realização deste teste algumas pressuposições necessitam ser atendidas, entre elas, que as variâncias sejam homogêneas. Esta suposição não foi atendida neste caso e por esse motivo a análise foi baseada na variável transformada $\sqrt{n^\circ}$ entradas nos braços abertos .

Considera-se o modelo:

$$Y_i = \mu + \tau_i + \varepsilon_i \quad \text{onde:}$$

μ = representa a média geral

τ_i = efeito do tratamento i , $i = 1, 2, 3$ ($i = 1$, solução salina; $i = 2$, "Pico 12" e $i = 3$ - Diazepan)

ε_i = efeito do fator aleatório

Através do teste F da análise de variância testou-se a hipótese $H_0: \tau_i = 0, i = 1, 2, 3$ (não existe efeito de tratamento).

Rejeitando-se a hipótese de igualdade entre os tratamentos e comparando-se os os pares de média através do teste de Tukey, tem-se que a diferença mínima significativa é dada por:

$$\Delta = q \sqrt{\frac{QRM}{2} \left(\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right)}$$

onde:

q - um valor tabelado;

QMR - o quadrado médio do resíduo e

n_i e n_j - o número de repetições nos tratamentos i e j , respectivamente.

Se a diferença entre as médias dos tratamentos for maior que Δ , considera-se que existe diferenças significativas.

Na análise de variância da variável braços abertos, a suposição de homogeneidade das variâncias não foi atendida, sendo então necessário realizar uma transformação. A análise foi feita com base na variável transformada Raiz Quadrada (braços abertos).

Tabela 02 - Número de Entrada nos Braços Abertos

| FV | GL | SQ | QM | F |
|--------------|----|---------|--------|------------|
| Tratamento | 2 | 4,9206 | 2,4603 | 4,4611 (*) |
| Resíduo | 61 | 33,6420 | 0,5515 | |
| TOTAL | 63 | 38,5626 | - | CV=65,04% |

(*) Significativo a 5%

FV = Fonte de variação, GL = Grau de Liberdade, SQ = Soma do Quadrado,
 QM = Soma do Quadrado Médio e F = Frequência

Salina

"Pico 12" - 2,0 mg/kg

Diazepan 1,0mg/kg

Pelo teste de Tukey obtém-se os resultados $q_{5\%}(3,61) = 3,40$ onde as médias sobre um mesmo traço, são consideradas, estatisticamente iguais a 5% de significância.

Tabela 03 - Valores Médios e Desvios Padrão por Tratamento

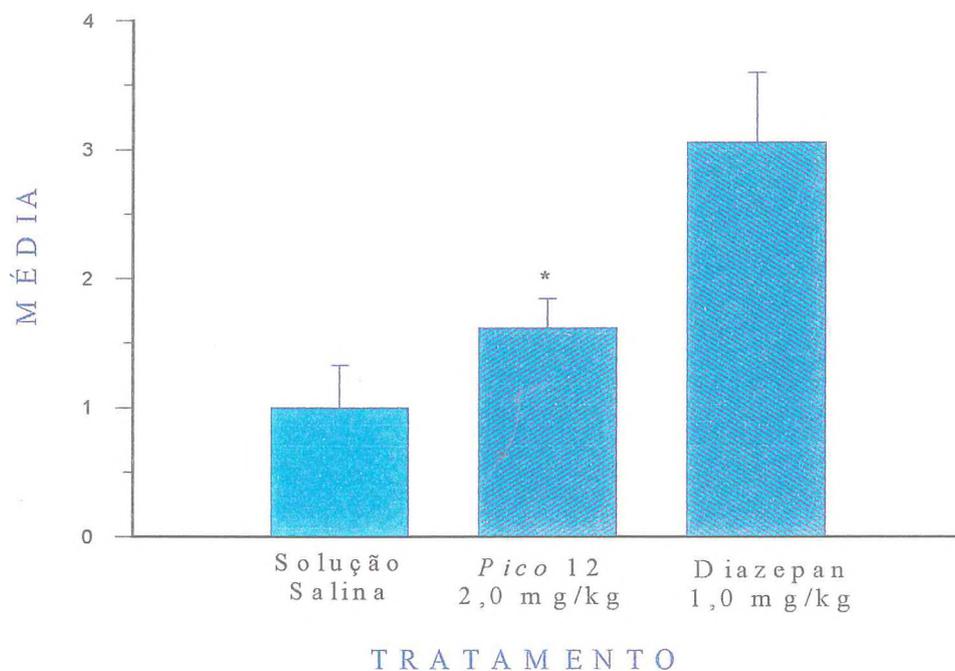
(Variável Transformada) - $\sqrt{n^\circ}$ de entradas nos braços abertos

| Tratamento | Média | Desvio Padrão |
|----------------------|--------|---------------|
| Solução Salina | 0,7399 | 0,7027 |
| "Pico 12" - 2,0mg/kg | 1,0739 | 0,6917 |
| Diazepan - 1,0mg/kg | 1,5380 | 0,8548 |

Tabela 04 - Valores Médios e Desvios Padrão por Tratamento (Variável Original)

| Tratamento | Média | Desvio Padrão | Erro Padrão da Média |
|----------------------|--------|---------------|----------------------|
| Solução Salina | 1,0000 | 1,13 | 0,3262 |
| "Pico 12" - 2,0mg/kg | 1,6176 | 1,33 | 0,2280 |
| Diazepan - 1,0mg/kg | 3,0556 | 2,29 | 0,5397 |

Gráfico 01 - Número Médio de Entradas no Braço Aberto (Variável Original)



• Número de Entradas nos Braços Fechados

Os resultados do teste F, da análise de variância, e do teste de Tukey descritos na seção anterior, são apresentados nas tabelas 5 e 6 e no gráfico 2.

Tabela 05 - Análise da Variância

| FV | GL | SQ | QM | F |
|--------------|----|----------|---------|--------------|
| Tratamento | 2 | 82,9321 | 41,4660 | 10,0954 (**) |
| Resíduo | 61 | 250,5523 | 4,1074 | |
| TOTAL | 63 | 333,4844 | - | CV=62,66% |

(**) Significativo a 1%

* Existe uma diferença significativa entre as médias dos tratamentos.

Os resultados do teste de Tukey são representados a seguir:

$$q_{1\%}(3,61) = 4,28$$

“Pico 12” - 2,0mg/kg

Diazepan - 1,0mg/kg

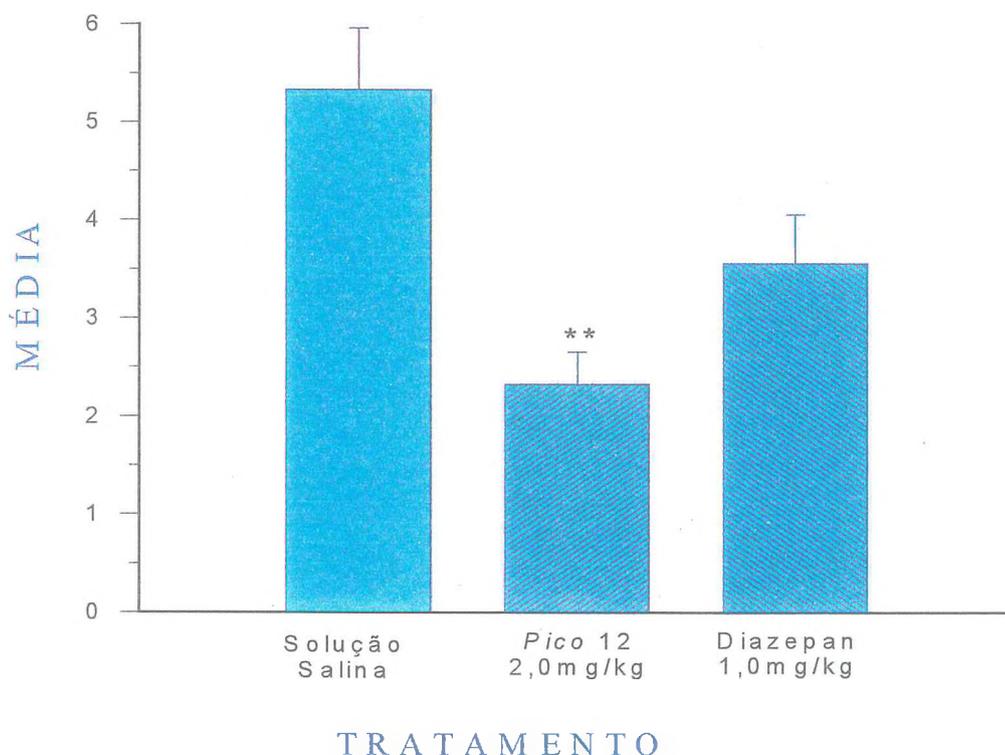
Salina

As médias sobre um mesmo traço, são consideradas estatisticamente iguais a 1% de significância.

Tabela 06 - Valores Médios e Desvios Padrão Por Tratamento

| Tratamento | Média | Desvio Padrão | Erro Padrão da Média |
|----------------------|--------|---------------|----------------------|
| Solução Salina | 5,3333 | 2,1881 | 0,6316 |
| “Pico 12” - 2,0mg/kg | 2,3235 | 1,9183 | 0,3289 |
| Diazepan - 1,0mg/kg | 3,5556 | 2,1205 | 0,4998 |

Gráfico 02 - Número Médio de Entradas no Braço Fechado



• Tempo nos Braços Abertos

Teste não Paramétrico de Kruskal-Wallis - A variável tempo (em segundos) nos braços abertos também não atendeu à pressuposição de homogeneidade das variâncias. Nenhuma transformação (procedimento primeiramente tentado), solucionou o problema. Por esse motivo aplicou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para amostras independentes, testando-se a hipótese

$$H_0: t_1 = t_2 = t_3,$$

onde:

t_1 = solução salina

t_2 = Veneno - “Pico 12” - 6mg/ml ou 2mg/kg

t_3 = Diazepan - 1mg/kg

Para a realização do teste classificam-se as N observações, onde a menor delas recebe ordem 1 e a maior, N . Calcula-se a estatística

$$\chi^2 = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{i=1}^K \frac{R_i^2}{n_i} - 3(N+1),$$

onde neste caso:

$$K = 3;$$

R_i . a soma das ordens do tratamento i .

Comparando-se com o valor teórico da distribuição $\chi^2 (k - 1)$ tem-se que:

se $\chi^2 > \chi^2 (K - 1)$ rejeita-se H_0 .

Comparações Múltiplas - Caso o teste de Kruskal-Wallis dê significativo, realiza-se o teste de comparação múltiplas para testar as diferenças entre os pares de tratamentos. Estas diferenças são determinadas por:

$$|\bar{R}_i - \bar{R}_j| \text{ } i < j, \text{ onde } \bar{R}_i = \frac{R_i}{n_i} \text{ e } \bar{R}_j = \frac{R_j}{n_j},$$

Estas diferenças são comparadas com :

$$d. m. s. = Z_{\alpha} / [k(k-1)] \sqrt{\frac{N(N+1)}{12} \left(\frac{1}{m} + \frac{1}{n_j} \right)}$$

onde:

$Z_{\alpha} / [k(k-1)]$ - é o limite superior da distribuição normal, considerando-se o nível de significância α .

O tempo (em segundos) que o animal passou nos braços abertos foi avaliado através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e os resultados são apresentados a seguir:

$\chi^2 = 9,3510$ e $p\text{-value} = 0,01$, ou seja, existe uma diferença significativa entre os tratamentos a 1% de significância.

$$Z_{\alpha} / [k(k-1)] = 2,93$$

Tabela 07 - Tempo (s) - Braços Abertos

| Tratamento | Média dos Pontos |
|----------------------|------------------|
| Solução Salina | 18,38 |
| “Pico 12” - 2,0mg/kg | 34,19 |
| Diazepan - 1,0mg/kg | 38,72 |

$$|\bar{R}_1 - \bar{R}_2| = 15,81$$

$$|\bar{R}_2 - \bar{R}_3| = 4,53$$

$$|\bar{R}_1 - \bar{R}_3| = 20,34$$

Salina

“Pico 12” - 2,0 mg/kg

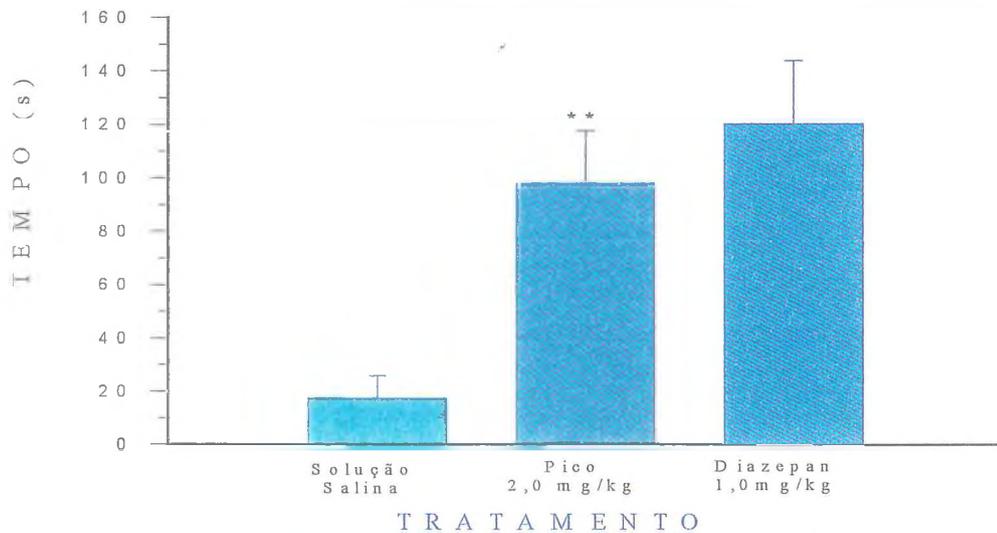
Diazepan 1,0mg/kg

As médias sobre um mesmo traço do Veneno “Pico 12” e do Diazepan, são consideradas estatisticamente iguais a 1% de significância.

Tabela 08 - Valores Médios e Desvios Padrão por Tratamento

| Tratamento | Média | Desvio Padrão | Erro Padrão da Média |
|----------------------|--------|---------------|----------------------|
| Solução Salina | 17,50 | 28,72 | 8,29 |
| “Pico 12” - 2,0mg/kg | 98,15 | 115,70 | 19,28 |
| Diazepan - 1,0mg/kg | 120,06 | 101,25 | 23,86 |

Gráfico 03 - Tempo Médio (s) nos Braços Abertos



Tempo nos Braços Fechados

Para o Tempo (em segundo) que o animal passou nos braços fechados, a análise também foi realizada pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

$$\chi^2 = 9,1486 \text{ e}$$

$$p\text{-value} = 0,0103.$$

Assim constata-se que existe diferença significativa entre os tratamentos, a 5% de significância.

$$Z_{\alpha} / [K(K-1)] = 2,39$$

Tabela - 9 Tempo (s) - Braços Fechados

| Tratamento | Média dos Pontos |
|----------------------|------------------|
| Solução Salina | 46,42 |
| “Pico 12” - 2,0mg/kg | 30,91 |
| Diazepan - 1,0mg/kg | 26,22 |

$$|\bar{R}_1 - \bar{R}_2| = 15,51 \quad |\bar{R}_2 - \bar{R}_3| = 4,69 \quad |\bar{R}_1 - \bar{R}_3| = 20,20$$

Salina

“Pico 12” - 2,0mg/kg

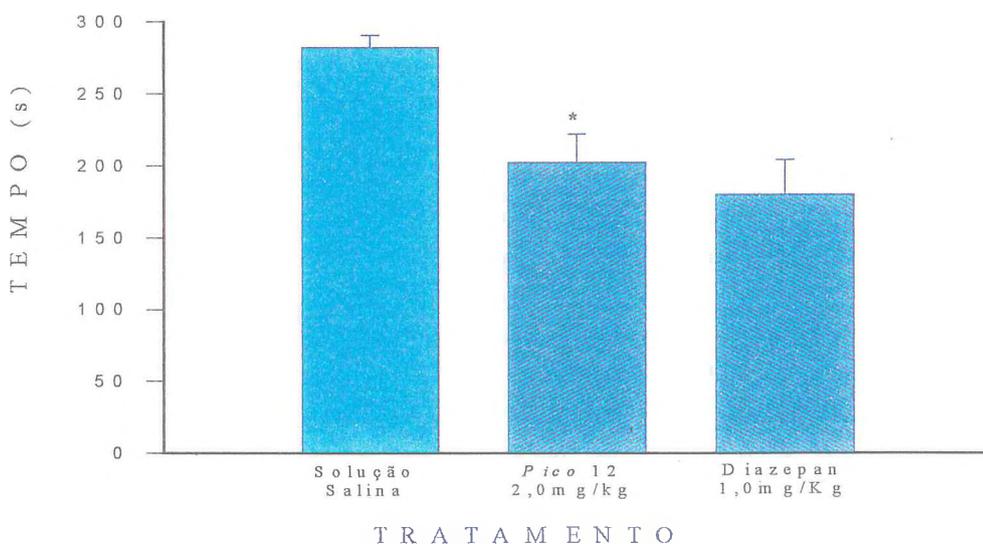
Diazepan - 1,0mg/kg

As médias do “Pico 12”, e do Diazepan sobre um mesmo traço são consideradas estatisticamente iguais a 5% de significância.

Tabela 10- Valores Médios e Desvios Padrão por Tratamento

| Tratamento | Média | Desvio Padrão | Erro Padrão da Média |
|----------------------|--------|---------------|----------------------|
| Solução Salina | 282,50 | 28,72 | 8,29 |
| “Pico 12” - 2,0mg/kg | 202,15 | 115,91 | 19,87 |
| Diazepan - 1,0mg/kg | 180,00 | 101,29 | 23,87 |

Gráfico 04 - Tempo Médio (s) no Braço Fechado



4.7 - “Hole-Board” - Atividade Exploratória

Esse teste tem como objetivo medir a atividade ansiolítica de animais diante do Fator Ansilítico “Pico 12”, comparando-o com o Diazepan.

Os camundongos controle injetados pela via intraperitoneal com solução salina, foram colocados no “Hole-Board” para avaliar a atividade exploratória, que é medida através do número de vezes que os animais colocam a cabeça em cada furo.

Os camundongos injetados pela via intraperitoneal com Diazepan em doses de 0,5mg/kg e 2,0mg/kg têm o mesmo comportamento exploratório, diminuindo para os injetados com Diazepan em dose de 1,0mg/kg.

Os camundongos injetados com o “Pico 12” em doses de 0,83mg/kg e 2,0mg/kg também têm o mesmo tipo de comportamento e significativamente são semelhantes ao do Diazepan em dose de 0,5mg/Kg.

Os resultados das análises estatísticas estão apresentados a seguir na tabela 11 e no (gráfico 5). A análise de Variância foi a técnica utilizada para a comparação dos tratamentos.

Tabela 11 - Análise de Variância (N° de furos explorados pelo Animal)

| FV | GL | SQ | QM | F |
|--------------|----|-----------|---------|-----------|
| Tratamento | 5 | 2880,577 | 576,115 | 3,197 (*) |
| Resíduo | 88 | 15859,900 | 180,226 | |
| TOTAL | 93 | 18740,500 | - | CV=6,60% |

(*) Significativo a 5%

Aplicando-se o teste de Tukey obteve-se:

$$q_{5\%} (6,88) = 3,19$$

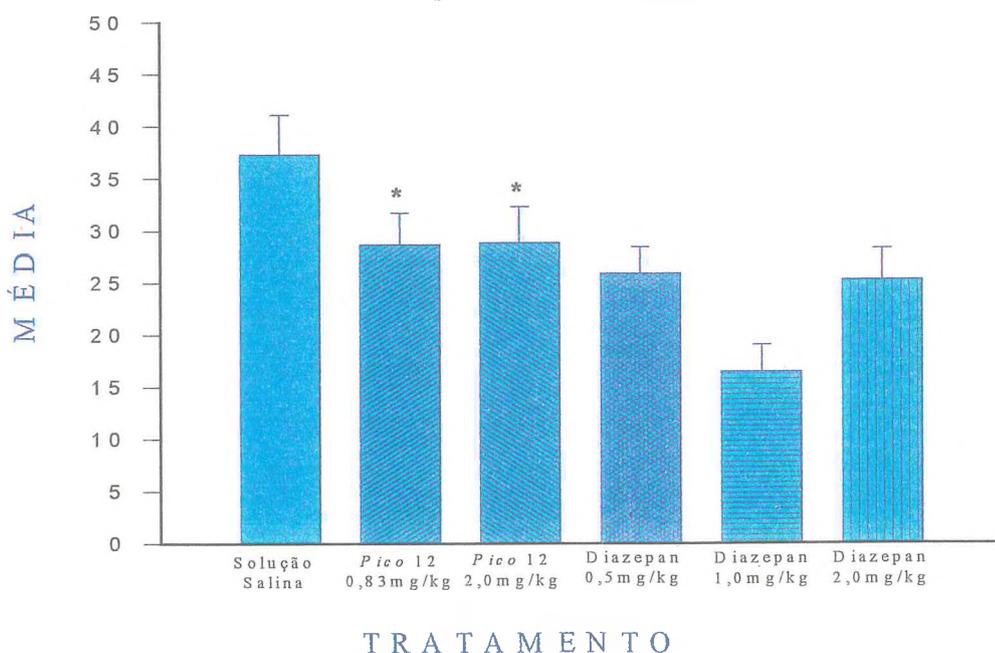
Diazepan 1,0mg/kg Diazepan - 2,0mg/kg Diazepan 0,5mg/kg “Pico 12” - 0,83mg/kg ““Pico 12”” - 2,0mg/kg
 Salina

As médias sobre um mesmo traço são consideradas estatisticamente iguais a 5% de significância, como mostra a tabela 12.

Tabela 12 - Valores Médios e Desvio Padrão por Tratamento

| Tratamento | Média | Desvio Padrão | Erro Padrão da Média |
|-----------------------|---------|---------------|----------------------|
| Solução Salina | 37,2941 | 15,8065 | 3,833 |
| “Pico 12” - 0,83mg/kg | 28,6500 | 13,7162 | 3,066 |
| “Pico 12” - 2,0 mg/kg | 28,8333 | 14,8374 | 3,497 |
| Diazepan 0,5mg/kg | 25,9000 | 7,9784 | 2,522 |
| Diazepan - 1,0mg/kg | 16,4444 | 7,8440 | 2,614 |
| Diazepan - 2,0mg/kg | 25,3000 | 13,5340 | 3,026 |

Gráfico 05 - Número Médio de Buracos Explorados pelo Animal



4.8 - Teste da Escada

O teste da escada é um dos mais usados para medir o efeito de drogas ansiolíticas em animais. Durante o teste mediu-se a atividade exploratória dos animais em subir e descer os degraus da escada e ficar de pé “rearing” explorando o ambiente e a capacidade de se locomoverem.

Os camundongos na caixa de teste foram observados um a um por 4min onde o primeiro minuto foi de adaptação e os outros 3 últimos de teste.

Os camundongos controle, injetados com solução salina pela via intraperitoneal ao serem colocados na caixa de teste exploraram bastante o ambiente, subiram e desceram os degraus da escada, ficaram de pé “rearing” como mostram os gráficos 6 e 7.

Os camundongos injetados com 0,5mg/kg de Diazepan ficaram bem mais agitados, exploraram bastante o ambiente, subiram e desceram a escada em um total maior de degraus do que os camundongos injetados com a solução salina, mas o número de “rearing” diminuiu. Já os camundongos injetados pela via intraperitoneal com Diazepan 1mg/kg diminuíram a atividade exploratória de subir e descer os degraus, como também diminuíram o número de “rearing”.

O veneno da rã - “Pico 12” na dose de 2mg/kg diminuiu de maneira significativa o número de subida e descida dos degraus da escada, bem como o número de “rearing”, quando comparado com a solução salina. Comparando-se com o Diazepan na dose de 1mg/kg o número de “rearing” deste, é significativamente menor que o do “Pico 12” na dose de 2mg/kg. Observando-se os números de “rearing” correspondentes às doses de 2mg/kg do “Pico 12” e 0,5 mg/kg do Diazepan, verificou-se que estes são iguais, assim como os números de degraus de subida e descida da escada nas doses de 2mg/kg do “Pico 12” e 1,0mg/kg do Diazepan.

Esses dados são apresentados de forma estatística a seguir:

Número “rearing” - realizou-se o teste F da análise de variância e o teste de Tukey de maneira semelhante ao descrito no teste do “Plus-Maze”.

Análise Estatística - a suposição de homogeneidade das variâncias não foi atendida pela variável número “rearing”. Para a análise utilizou-se então a variável transformada $\sqrt{n^\circ}$ de “rearing”.

Tabela 13 - Análise de Variância (Variável Transformada)

| FV | GL | SQ | QM | F |
|--------------|----|---------|--------|-------------|
| Tratamento | 4 | 63,871 | 15,968 | 14,628 (**) |
| Resíduo | 79 | 86,233 | 1,092 | |
| TOTAL | 83 | 150,104 | - | CV=28,36% |

(**) Significativo a 1%

Pelo teste de Tukey obtém-se $q_{1\%}(5,79) = 4,78$

Diazepan - 1.0mg/kg “Pico 12” - 0,83mg/kg “Pico 12” - 2mg/kg Diazepan - 0,5mg/kg Sol. Salina

As médias sobre um mesmo traço (acima) relativas ao Diazepan - 1,0mg/Kg e ao “Pico 12” - 0,83mg/Kg, bem como as do “Pico 12” - 2mg/Kg e ao Diazepan - 0,5mg/Kg são consideradas estatisticamente iguais a 1% de significância.

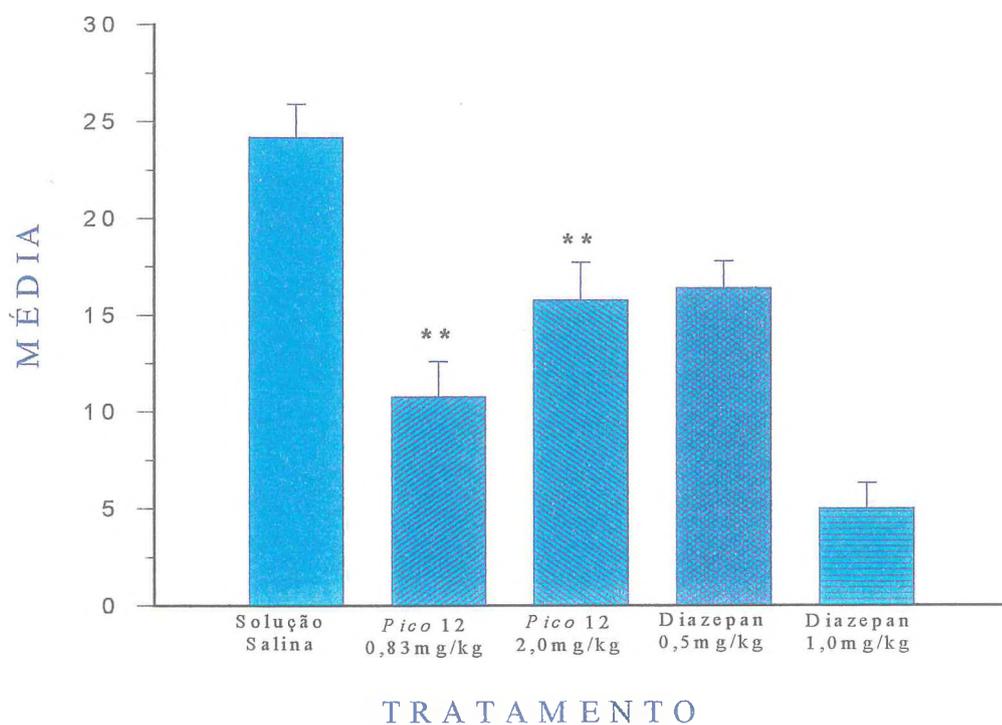
Tabela 14 - Valores Médios e Desvios Padrão por Tratamento (Variável Transformada)

| Tratamento | Média | Desvio Padrão |
|-----------------------|--------|---------------|
| Solução Salina | 4,8601 | 0,7603 |
| “Pico 12” - 0,83mg/kg | 2,9876 | 1,4004 |
| “Pico 12” - 2,0mg/kg | 3,8298 | 1,0882 |
| Diazepan - 0,5mg/kg | 3,9743 | 0,8130 |
| Diazepan - 1,0mg/kg | 2,0036 | 1,0464 |

Tabela 15 - Valores Médios e Desvio Padrão por Tratamento (Variável Original)

| Tratamento | Média | Desvio Padrão | Erro Padrão da Média |
|-----------------------|---------|---------------|----------------------|
| Solução Salina | 24,1667 | 7,2942 | 1,719 |
| “Pico 12” - 0,83mg/kg | 10,7778 | 7,7502 | 1,826 |
| “Pico 12” - 2,0 mg/kg | 15,7895 | 8,5087 | 1,952 |
| Diazepan - 0,5mg/kg | 16,4211 | 6,1402 | 1,372 |
| Diazepan - 1,0mg/kg | 5,0000 | 4,2164 | 1,333 |

Gráfico 06 - Número de Rear



• Número de Degraus

A análise do número de degraus foi realizada através da análise de variância e do teste de Tukey.

Tabela 16 - Análise de Variância

| FV | GL | SQ | QM | F |
|--------------|----|-----------|----------|-------------|
| Tratamento | 4 | 12189,527 | 3047,382 | 19,170 (**) |
| Resíduo | 79 | 12558,140 | 158,964 | |
| TOTAL | 83 | 24747,667 | - | CV=48,80% |

(**) Significativo a 1%

O resultado do teste de Tukey é: $q_{1\%}(5;79) = 4,78$

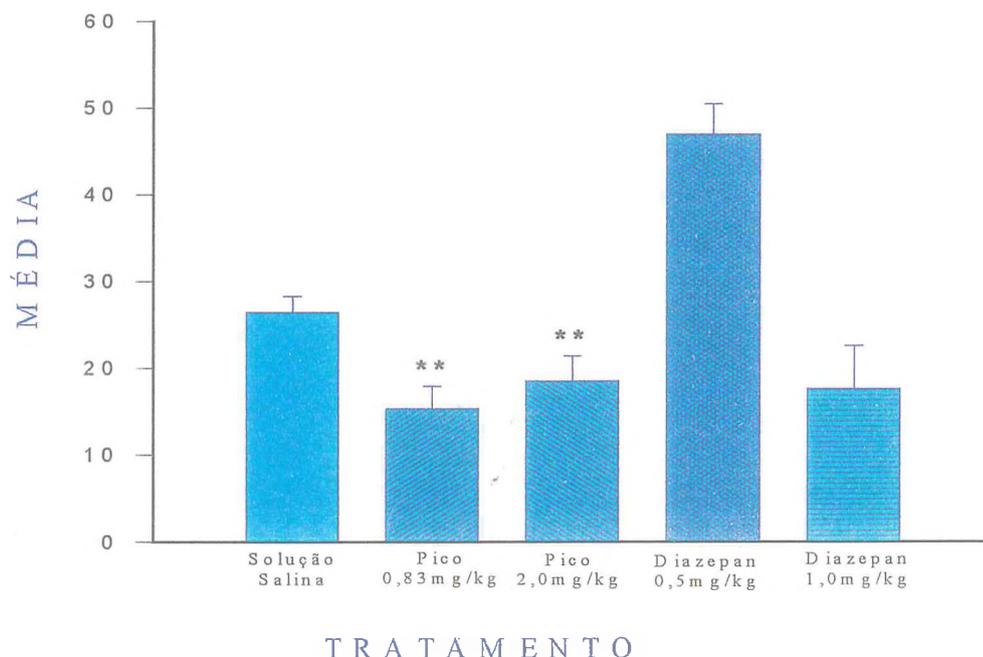
“Pico 12” - 0,83mg/kg Diazepan - 1.0mg/kg “Pico 12”- 2mg/kg Sol. Salina Diazepan - 0,5mg/kg

As médias sobre um mesmo traço, do “Pico 12”- 0,83mg/kg, Diazepan - 1,0mg/kg, “Pico 12”- 2mg/Kg e a solução salina 0,9%, são consideradas estatisticamente iguais com 1% de significância.

Tabela 17 - Valores Médios e Desvio Padrão por Tratamento

| Tratamento | Média | Desvio Padrão | Erro Padrão da Média |
|-----------------------|---------|---------------|----------------------|
| Solução Salina | 26,4444 | 7,7628 | 1,829 |
| “Pico 12” - 0,83mg/kg | 15,2778 | 11,0070 | 2,594 |
| “Pico 12” - 2,0 mg/kg | 18,4737 | 12,5847 | 2,887 |
| Diazepan - 0,5mg/kg | 46,9474 | 15,6861 | 3,507 |
| Diazepan - 1,0mg/kg | 17,6000 | 15,6148 | 4,937 |

Gráfico 07 - Número de Degraus



4.9 - Teste de Natação

Neste teste observou-se o estado depressivo induzido em camundongos forçando-os a nadar em um cilindro estreito do qual eles não podem escapar. Após um breve período de atividade rigorosa eles adotam uma postura de imobilidade característica, que é rapidamente identificada. O objetivo deste teste é diferenciar a atividade ansiolítica, depressiva e antidepressiva através da administração das drogas (Diazepan, “Pico 12” e Anafranil). O teste tem uma duração de 6 min, sendo 1 min para a adaptação e o restante para o teste. Os animais controle injetados com a solução salina 0,9% permaneceram pouco tempo sem imobilidade aparente, já para o anafranil observou-se uma mobilidade com significância no experimento, enquanto que os animais injetados com Diazepan e “Pico 12”, apresentaram um tempo de imobilidade relativamente maior, como mostra a estatística abaixo.

Tabela 18 - Análise de Variância e Tempo (s) que o Animal Permanece Parado

| FV | GL | SQ | QM | F |
|--------------|----|----------|-----------|------------|
| Tratamento | 3 | 67568,0 | 22522,700 | 4,252 (**) |
| Resíduo | 43 | 227788,0 | 5297,394 | |
| TOTAL | 46 | 295356,0 | - | CV=40,2% |

(**) Significativo com 1%

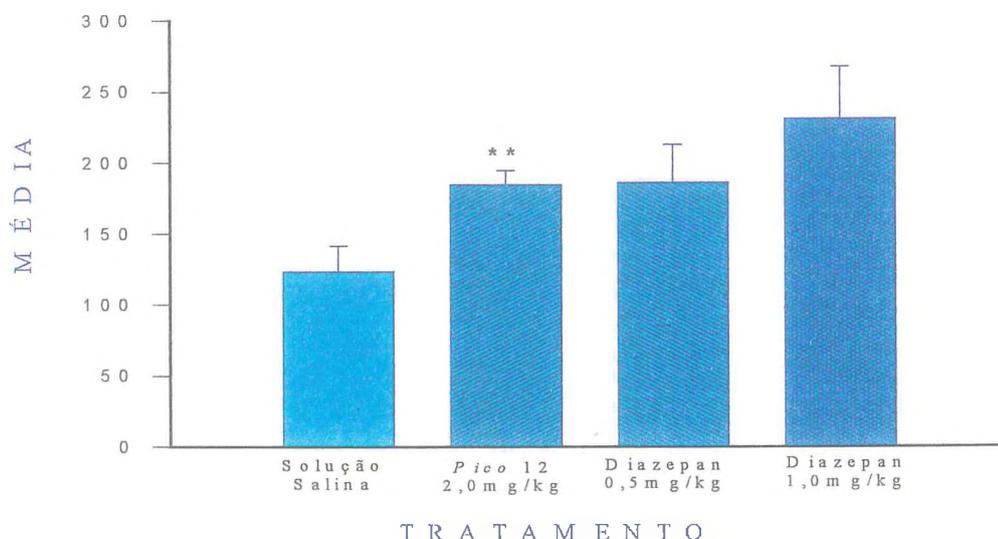
Pelo teste de Tukey obtém-se $q_{1\%}(4;43) = 4,68$

Solução Salina “Pico 12” - 2,0mg/kg Diazepan - 0,5mg/kg Diazepan - 1,0mg/kg

As médias sobre um mesmo traço, são consideradas estatisticamente iguais, com 1% de significância.

Tabela 19 - Valores Médios e Desvios Padrão por Tratamento

| Tratamento | Média | Desvio Padrão | Erro Padrão da Média |
|-----------------------|----------|---------------|----------------------|
| Solução Salina | 123,0667 | 70,9824 | 18,32 |
| “Pico 12” - 2,0 mg/kg | 184,5714 | 36,8943 | 9,860 |
| Diazepan - 0,5mg/kg | 185,7000 | 84,5971 | 26,75 |
| Diazepan - 1,0mg/kg | 230,7500 | 103,6088 | 36,63 |

Gráfico 08 - Tempo Médio (s) que o Animal Permanece Parado

CAPÍTULO 5
DISCUSSÃO

5 - DISCUSSÃO

A necessidade da busca do conhecimento levou muitos grupos de pesquisas a descobrirem fontes ricas em substâncias químicas e farmacológicas que beneficiariam o homem. O veneno que compõe as glândulas granulares dos anfíbios, tem essa capacidade.

Os resultados mostraram que substâncias venenosas ocorrem na natureza e são particularmente bem conhecidas como as plantas, onde elas presumivelmente servem na defesa química contra herbívoros. Venenos podem ocorrer em invertebrados e vertebrados. Eles funcionam como defesa contra predadores ou microrganismos. Muitas substâncias poderiam ser classificadas como nocivas, ao invés de venenosas, embora em doses elevadas todos estes compostos seriam venenosos (Daly, 1995).

Dentre os vertebrados, os anfíbios são notáveis por uma larga variedade de agentes farmacológicos que estão contidos nas glândulas granulares da pele (Toledo & Jared, 1992). Esses compostos tóxicos têm ações farmacológicas; cardiotoxica, neurotóxica, hematóxica, miotóxica, alucinogênica, hipotensiva, hipertensiva e anestésica local (Harbermeth, 1994).

Entre outros compostos tóxicos encontram-se proteínas, lipídios, derivados guanidínicos, aminas biogênicas, esteróides e alcalóides no veneno desses anfíbios. (Daly *et al.*, 1987; Toledo & Jared 1989 e Harbermeth, 1994).

Inúmeros peptídeos foram identificados, sendo estes semelhantes aos encontrados no sistema nervoso central e gastrointestinal dos mamíferos (Erspamer, 1971, 1983, 1984, Bevins & Zasloff, 1990; Spencer, 1992 e Lazarus & Attila 1993).

Os peptídeos bioativos foram identificados na secreção granular do *X. laevis* (Dockray & Hopkins, 1975 e Ball *et al.*, 1981) e certas enzimas e seus precursores (Mallay *et al.*, 1986).

Uma endopeptidase foi isolada da secreção granular de algumas anuras, outros peptídeos, hormônios, angiotensina, bombezina, tacininas, (Carvalho *et al.*, 1992) também se encontram presentes nas glândulas desses anfíbios.

Existem poucas evidências na literatura a respeito das glândulas da pele da rã *Leptodactylus labyrinthicus* (Spix, 1824), isso deve-se ao fato desta espécie ser encontrada em poucas regiões do Brasil e numa pequena parte da América do Sul.

Estudos mostraram que em algumas *Leptodactylus* foram encontrados aminas biogênicas, serotoninas, histaminas, leptodactylina e bufoteinidina (Cei & Erspamer, 1966 e Daly & Witkop, 1971).

A leptodactylina causa um bloqueio na transmissão sináptica neuromuscular com efeito semelhante ao “curare” (Roseghini *et al.*, 1986). Também foram encontrados na pele dessa família peptídeos como cerulein e fizalemin com ação hipotensiva em cachorros e coelhos (Toledo & Jared, 1995).

Surgiu um grande interesse em investigar a secreção da pele das rãs, *Leptodactylus labyrinthicus* após testes iniciais, quando uma porção do material foi injetada intraperitonealmente em animais. Estes rapidamente mudavam de comportamento, ficavam tranquilos, sem agressividade, conscientes e as reações biológicas aparentemente sem alterações.

Foi então, desenvolvido uma metodologia para o estudo. A extração da secreção das glândulas foi obtida com a ajuda de uma solução de 1,0ml de adrenalina (100µg/ml), injetada pela via subcutânea nas rãs *Leptodactylus labyrinthicus*, com a finalidade de aumentar o estresse causando um aumento na liberação da secreção venenosa. Após 30 minutos da injeção esse material foi centrifugado, e o sobrenadante liofilizado até obter-se um pó, onde novamente foi diluído e o sobrenadante passado no HPLC.

O HPLC fracionou o sobrenadante em vários picos e o “Pico” 12 foi o único escolhido para análise farmacológica, sendo este repassado em HPLC com coluna analítica revelando um elevado grau de pureza do material. Como o “Pico 12” apresentou um pequeno contaminante, acredita-se que este contaminante tenha propriedade físico-química semelhante a do próprio pico, não acarretando problemas nos testes farmacológicos.

A cromatografia em HPLC, utiliza instrumentos automatizados realizando separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes nas amostras em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (Guimarães & Collins, 1990 e Lindsay, 1992).

Estudos da toxicidade do Fator ansiolítico “Pico 12” proporcionaram um certo direcionamento da sua atividade biológica. As doses utilizadas deram importantes informações, pois tanto as menores como as maiores, sempre apresentaram os mesmos sintomas, sendo as doses mais elevadas, com maior intensidade da resposta.

Os animais injetados apresentavam-se quietos, parados e as vezes ficavam sonolentos quando elevava-se a dose, mas quando eram estimulados, ficavam atentos e respondiam em seguida, retornando imediatamente ao estado de tranquilidade sem demonstração de estresse. O estágio de normalidade retornava à medida que passava o tempo, ou seja, à medida que a substância era metabolizada pelo animal.

Não se observou uma dose letal para o Fator ansiolítico “Pico 12”. Os estudos de toxicidade e efeitos colaterais não foram mais profundos por se tratar de uma substância possivelmente metabolizada pelos animais, quando injetados pelas vias intraperitoneal e peniana.

A hipótese de que o “Pico 12” seria um Fator Ansiolítico, levou-nos a estudá-lo em vários modelos de testes comportamentais, como: “Plus-Maze”, Escada, “Hole-board” e Natação. Desta maneira, cada teste tem uma validade para os modelos de

ansiedade com animais, respondendo a determinados agentes farmacológicos com maior clareza, seletividade, estabilidade e eficiência no estudo da ansiedade.

O Diazepan, uma droga que foi usada como controle positivo, tem sido amplamente estudado no campo da ansiedade por ser uma droga padrão e os resultados bastantes satisfatórios. Este trabalho mostrou uma identificação do potencial ansiolítico do Diazepan quando comparado aos trabalhos de (Rodgers e Shepherd, 1993; Santucci *et al.*, 1993 e Rex *et al.*, 1992). Dessa forma, pode-se afirmar que o Diazepan se enquadra muito bem nos modelos animais de ansiedade. (Rodger *et al.*, 1997 e Pellow & File, 1985). Temos como principais modelos, os seguintes:

- **“Plus-Maze”** - o “Plus-Maze” é o modelo usado na atualidade para estudo do comportamento animal, especialmente para as medidas de ansiedade. Este teste determina observações, que consistem na passagem de animais dos braços fechados para os braços abertos. O teste é muito utilizado em ratos e camundongos, mas poderia ser atendido a outras espécies de animais.

As vantagens deste teste se encontram dentro dos padrões ecológicos, econômicos, rápidos, simples e facilmente conduzidos, pelo fato de que o procedimento com os animais não requer treino prolongado e não envolve privações de água e comida e nem tão pouco o sacrifício dos mesmos. Segundo os autores (Rodgers *et al.*, 1997; Artaiz *et al.*, 1995 e Andreatini & Leite, 1994) o “Plus-Maze” é altamente sensível para influenciar a manipulação dos receptores do GABA com o uso dos benzodiazepínicos.

No presente trabalho procurou-se mostrar os benefícios do modelo padrão em ratos e camundongos, que tem encabeçado importantes desenvolvimentos contemporâneos para aproximar a pesquisa neurológica do medo e da ansiedade. A metodologia convencional do “Plus-Maze” evidenciou elementos defensivos neste teste, como: frio, defecação, estiramento da postura (SAP), estiar a cabeça e olhar para

baixo “head-deapping”, ficar de pé “rearing” e explorar os braços fechados, enquadrando os mais variados comportamentos exploratórios.

A dificuldade encontrada foi a não disponibilização de uma câmera de vídeo para o acompanhamento nos movimentos contínuos dos animais. Contudo mediu-se com rigor a entrada nos braços abertos e fechados e o tempo de permanência nos mesmos, bem como na execução dos outros testes que mensurariam as atividades exploratórias, locomotoras, o medo e a ansiedade.

As pesquisas recentes mostram que o teste do “Plus-Maze” adapta-se muito bem a vários tipos de pesquisas relacionadas ao sistema nervoso central, como o estresse psicossocial, o qual mede de maneira convencional a passagem do animal para os braços abertos, estiramento da postura (SAP) e o retorno aos braços fechados. Essa descoberta coincide com a hipótese da ansiedade crônica à analgesia não opióide (June & Lewis, 1994 e Winsouer, *et al.*, 1995), mas mostra que o “Plus-Maze” é sensível para qualquer estresse artificial, variando na medida apresentada por comportamentos significativos que podem ser interpretados em certos perfis de drogas. (Jon *et al.*, 1994 e Rodgers *et al.*, 1997).

Estudos mostram que os benzodiazepínicos, agonistas parciais de receptores, produzem uma variação no comportamento em reduzir a ansiedade. Típicamente estes agentes reduzem a entrada nos braços abertos e a taxa de estiramento da postura (SAP) e da cabeça “head-deapping” à medida que caminham explorando o ambiente. Estes comportamentos apresentam uma variação geral dependente da dose. Altas doses do Diazepan aumentam a medida de imobilidade, de modo facilmente observável (File *et al.*, 1993; David *et al.*, 1993 e Abe *et al.*, 1996).

A literatura mostra que o 5HT_{1A} receptor ligado, está relacionado ao modelo animal de ansiedade e tem rendimento no perfil do agonista parcial de cada 8-OH-DPAT e buspirona com o ‘Plus-Maze’ nos efeitos para ansiedade, e o efeito do grupo

do receptor 5HT ligado ao inibidor ofensivo da agressão (Rodgers *et al.*, 1997; Abe *et al.*, 1996 e Forster *et al.*, 1994).

- **“Hole-board”** - um teste simples que envolve o mínimo de material para sua realização, mede a atividade ansiolítica através da exploração dos camundongos.

O aparelho utilizado mediu de maneira automática o número de vezes que os camundongos enfiam a cabeça nos buracos. A exploração foi diminuída nos camundongos injetados com o Fator ansiolítico “Pico 12” e o Diazepan.

Apesar da simplicidade do teste, este não tem capacidade para medir o efeito de drogas ansiolíticas, tendo em vista só existir um parâmetro de exploração, entretanto tem o poder de junto a outros testes fazer parte dos modelos de comportamento animal para medidas de drogas ansiolíticas (Boisser & Simon, 1963).

- **Natação** - os experimentos mostraram que um estado de imobilidade foi facilmente visível nos camundongos quando imersos na água. Isto justifica que o estado depressivo dos camundongos pode estar relacionado com a atividade ansiolítica dos mesmos, quando submetidos a um tipo de estresse induzido pela natação.

A imobilidade dos camundongos foi determinada apenas por um observador, e diante da inexistência de uma câmera de vídeo, não houve a possibilidade de detectar qualquer variação além do tempo parado do teste.

Farmacologicamente o teste aparenta ser válido, visto que os animais são sensíveis ao antidepressivo Anafranil, o que está de acordo com os resultados de (Porsolt *et al.*, 1997),

- **Escada** - um outro teste com capacidade de medir o efeito ansiolítico de ratos e camundongos, apesar de evidências empíricas no alto conceito de distribuição entre locomoção e exploração. Este teste foi desenvolvido por Thiebot *et al.*, 1976, onde ratos e camundongos têm um espaço e uma escada, onde se contam o número de

subidas dos degraus e o número de vezes que o animal fica de pé “rearing”. Este foi modificado para camundongos por Simiand *et al.*, 1984, onde foi mostrado que os benzodiazepínicos foram efetivos no aumento do número de subidas dos degraus e uma diminuição no número de “rearing”.

Neste teste os resultados foram semelhantes aos apresentados nos trabalhos de (Thiebot *et al.*, 1976 e Simiand *et al.*, 1984). A hipótese era de que, um aumento no número de degraus subidos representaria a sensível medida da atividade ansiolítica, e a diminuição do número de “rearing”, indicaria uma atividade sedativa.

Estes resultados indicaram a clara dissociação entre os efeitos das drogas com os dois comportamentos descritos acima.

Os resultados obtidos no presente estudo são largamente consistentes com os já estudados usando o teste da escada em ratos e camundongos e sugere-se que os dois parâmetros investigados podem ser claramente dissociados.

CAPÍTULO 6
CONCLUSÕES

6 - CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nos testes comportamentais utilizados no presente estudo, concluiu-se que:

1. Um fator identificado na pele da rã *Leptodactylus labyrinthicus* (Spix, 1824), apresentou propriedades ansiolíticas semelhantes ao Diazepam, conforme testes realizados no modelo do “Plus-Maze”.
2. De acordo com o teste da Natação forçada, o Fator Ansiolítico provavelmente não apresenta propriedades anti-depressivas.
3. No teste de “Hole-board” e da Escada, os resultados demonstraram que o Fator Ansiolítico “Pico 12” diminuiu a atividade exploratória.
4. O grau de pureza do Fator ansiolítico “Pico 12” determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) apresentou um valor em torno de 95%, entretanto sua estrutura química não foi identificada até o presente momento.

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

- ABE, M., TABATA, R., SAITO, K., MATSUDA, T., BABA, A. and EGAWA, M., Novel Benzodioxan Derivative, 5-{3-[(2S)-1,4-Benzodioxan - 2 - ylmethyl) Amino] Propoxy} - 1,3 - Benzodioxole HCL (MKC-242), with Anxiolytic - Like and Antidepressant - Like Effects in Animal Models. *The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1996, Vol. 278 (2), p. 898-905.
- ANASTASI, A., BERTACCINI, G., CEI, J. M., de CARO, G., ERSPAMER, V., IMPICCIATORE, M. and ROSEGHINI, M., Presence of caerulein in extracts of the skin of *Leptodactylus pentadactylus labbyrinthicus* and of *Xenopus laevis*. *Br. J. Pharmacol*, 1970, Vol. 38, p. 221-228.
- ANDREATINI, R. and LEITE, J.R., Effect of valepotriates on the behavior of rats in the elevated plus-maze during diazepam withdrawal. *European Journal of Pharmacology*, 1994, Vol. 260, p. 233-235.
- ANSELONI, V.Z., MOTTA V., LIMA, G. and BRANDÃO, M.L., Behavioral and pharmacological validation of the elevated plus maze constructed with transparent walls. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1995, Vol. 28, p. 597-601.
- ARTAIZ, I., ROMERO, G., ZAZPE, A., MONGE, A., CALDERÓ, J.M., FOCA, J., LASHERAS, B. and DEL RIO, J., The Pharmacology of VA2/B7: an atypical 5-HT₃ receptor antagonist with anxiolytic - like properties in animal models. *Psychopharmacology*, 1995, Vol. 117, p. 137-148.
- BENTO, A.C., REGO, E., PEDROSO-MARIANI, S.R., MANCUSO, L.C., GIGLIO, J.R., NOVELLO, J.C., MARANGONI, S., CARACELLI, I., OLIVEIRA B., ANTUNES, E. and de NUCCI G., Isolation of a Polypeptide from phoneutria nigriventer spider venom responsible for the increased vascular permeability in rabbit skin. *Toxicon*, 1995, Vol. 33(2), p. 171-178.

- BEVINS, C.L. and ZASLOFF, M., Peptides from frog skin. *Annu. Ver. Biochem.*, 1990, Vol. 59, p. 395-414.
- BOULTON, A. A., BAKER, G. B. and MARTIN, I. M. T., Animal Models in Psychiatry II. In: *Neuromethods*. Humana Press New Jersey, 1991, 386 p.
- CAMARA, S.A., *Manual de Farmacologia Prática*. Ed. Atheneu, São Paulo, 1967, 175 p.
- CAMARÃO, G. C., *Purificação e caracterização de um complexo protéico multicatalítico do exsudato da pele do Xonipus laevis*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1995.
- CARVALHO, K. M., JOUDIQU, C. and BOUSSETTA, H., A peptide hormone-inactivating endopeptidase in Xonopus laevis skin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1992, Vol. 89 (1), p. 84-88.
- CARVALHO, K. M., *Metabolismo de hormônios-peptídios: descoberta de uma nova família de metaloenzimas*. Tese (Professor Titular), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1995.
- CHIARUGI, G. and FICALBI, E., *Monitore zoologico italiano. Italian Journal of Zoology*, 1980, p. 244-245.
- COOPER, J. R., BLOOM, F. E. and ROTH, R. H., *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*. Oxford University Press, New York, 7^a ed., 1996, Cap. 6, p. 126-193.
- DALY, J. W., Alkaloids from frog skins: selective probes for ion channels and nicotinic receptors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1995, Vol. 28, p. 1033-1042.

- DALY, J. W., MYERS, C. W. and Whittaker, N., Further classification of skin alkaloids from neotropical poison frogs (Dendrobatidae), with a general Survey of toxic/noxious substances in the Amphibia. *Toxicon*, 1987, Vol. 25 (10), p. 1023-1025.
- DALY, J. W., The chemistry of poisons in amphibian skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, Vol. 92, p. 9-13.
- DAVIES, M. F., ONAIVI, E. S., CHEN, S. W., MAGUIRE, P. A., TSAI, N. F. and LOEW, G. H., Evidence for Central Benzodiazepine Receptor Heterogeneity From Behavior Tests. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1994, Vol. 49, (1), p. 47-56.
- DUELLMAN, W. E. and TRUEB, L., *Biology of Amphibians*. Mc Grall-Hill, New York, 1986, 670 p.
- FILE, S. E., ZANGROSSI, H. Jr., VIANA, M. and GRAEFF, F.G., Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear?. *Psychopharmacology*, 1993, Vol. 111, p. 491-494.
- FLUCHER, B. E., BACHINGER, C. L., POHLHAMMER, K., ADAM, H. and MOLLAY, C., Skin Peptides in *Xenopus laevis*: Morphological Requirements for Precursor Processing in Developing and Regenerating Granular Skin Glands. *The Journal of Cell. Biology*, 1986, Vol. 103, p. 2299-2309.
- FORSTER, M.J., PRATHER, P.L., PATEL, S. R. and LAL, H., The Benzodiazepine Receptor Inverse Agonist RO 15-3505 Reverses Recent Memory Deficits in Aged Mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1995, Vol. 51 (2/3), p. 557-560.
- GARETT, R.H., GRISHAM, C.M., *Molecular aspects of Cell Biology*. Saunders College, Florida, 1995, 380 p.

- GRIEBEL, G., SANGER, D. J. and PERRAULT, G., The use of the rat elevated plus-maze to discriminate between non-selective and BZ - 1 (w1) selective, benzodiazepine receptor ligands. *Psychopharmacology*, 1996, Vol. 124, p. 245-254.
- HABERMEHL, G. G., Exocytosis of Toxins in Amphibians and Fisher. *Annals New Yorks Academy of Sciences*, 1994, p. 149-152.
- HARVEY, S., Hipnóticos e Sedativos. In: GILMAN, A. G., GOODMAN, L. S., RALL, T. W. and MURAD, F., *As Basees Farmacológicas da Terapêutica*. Ed. Guanabara, Rio de Janeiro, 7ª Ed., 1987, Cap. 17, p. 222-243.
- JAISWAL, A. K., BHATTACHARYA, S. K. and ACHARYA, S. B., Anxilytic Activity of Azadirachta indica leaf extractic in rats. *Indian Journal of Experimental Biology.*, 1994, Vol. 32, July, p. 489-491.
- JOFFE, R. T., LEVITT, A.J. and SOKOLOV. T.H., Augmentation Strategies: Focus on Anxilyotics. *J. Clin. Psychiatry*, 1996, Vol. 57 (supp/7), p. 25-31.
- JONES, G.H.,SCHNEIDER, C., SCHNEIDER, H.H., SEIDLER, J., COLE, B. J. and STEPHENS, D.N., Comparison of several benzodiazepine receptor ligands in two models of anxilytic activity in the mouse: an analysis based on fraccional receptor occupancies. *Psychopharmacology*, 1994, Vol. 114, p. 191-199.
- JUNE, L. H. and LEWIS, M. J. , Interactions of Ro 15-4513, Ro 15-1788 (flumazenil) and ethanol on measures of exploration and locomotion in rats. *Psychopharmacology*, 1994, Vol. 116, p. 309-316.
- KANG, M., YOSHIMATSU, H., OOHARA, A., KUROKAWA, M., OGAWA, R. and SAKATA, T., Ginsenoside Kg1 Modulates Ingestive Behavior and Thermal Response Induced by Interleukin - 1 β in Rats. *Physiology & Behavior*, 1995, Vol. 57 (2), p. 393-396.

- KARALLIEDDE, L., Animal toxins. *British Journal of Anaesthesia*, 1995, Vol. 74, p. 319-327.
- KELLAR, K. J., Epibatidine: Its Pharmacological Actions and Utility for Studying Neuronal Nicotinic Receptors. *Neurotransmissions*, 1995, Vol. XI (4), p. 1-5.
- KICLITER, E. and GOYTIA, E. J., A comparison of spectral response functions of positive and negative phototaxies in two anuran amphibians, *Rana pipiens* and *Leptodactylus pentadactylus*. *Neuroscience Letters*, 1995, Vol. 185 p. 144-146.
- LAZARUS, H. L., and ATTILA M., The Toad, Ugly and Venomous, Wears yet a Precious Jewel in His skin. *Progress in Neurobiology*, 1993, Vol. 41, p. 473-507.
- LAZARUS, L. H., BRYANT, S. D., ATTILA M. and SALVADORI, S., Frog. Skin Opioid Peptides: A Case for Environmental Mimicry. *Environmental Health Perspectives*, 1994, Vol. 102 (8), August, p. 648-654.
- LISTER R. G., The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, 1987, Vol. 92, p. 180-185.
- MÄNNISTÖ, P.T., LANG, A. HARRO, J. PEURANEN, E., BRADWENJN, J. and VASSAR, E., Opposite effects mediated by CCK_A and CCK_B receptors in behavioural and hormonal studies in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 1994, Vol. 349, p. 478 - 484.
- MUTHAL, A V. and CHOPDE, C.T., Anxiolytic Effect of Neuropeptide FMRF amide in Rats. *Neuropeptides*, 1994, Vol. 27, p. 105-108.
- O'NEILL, B. A and BRIONI J.D., Benzodiazepine Receptor Mediation of the Anxiolytic-Like Effect of (-) - Nicotine in Mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1994, Vol: 49 (3), p. 755-757.

- PAPPAS, B. A. and WALSH, P., Behavioural Comparison of Pentylenetetrazol, Clonidine, Chlordiazepoxide and Diazepam in Infant Rats. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 1983, Vol. 19, p. 957-961.
- PÉLISSOLO, A., Récepteur des benzodiazépines: l'énigme du ligand endogène. *L'Encéphale*, 1995, Vol. XXI, p. 133-140.
- PELLOW, S. and FILE, S. E., Anxiolytic and Anxiogenic Drug Effects on Exploratory Activity in an Elevated Plus-Maze: a Novel Test of Anxiety in the Rat. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, Vol. 24, p. 525-529.
- POKK, P. and ZHARKOVSKY, A., The Effects of Drugs Acting at GABA - Benzodiazepine - Barbiturate Receptor Complex on the Behaviour of Sleep-Deprived Mice. *Pharmacology & Toxicology*, 1995, Vol. 76, p. 23-28.
- PORSOLT, R.D., BERTIN, A. and JALFRE, M., Behavioural Despair in Mice: A Primary Screening Test for Antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 1977, Vol. 229, p. 327-336.
- RANG, H.P. and DALE, M.M. Drogas Ansiolíticas e Hipnóticas In: *Farmacologia*, Ed. Guanabara Koogan S.A, Rio de Janeiro, 1993, Cap .25, p. 383-417.
- REX, A., MARSDEN, C.A and FINK, H. Effect of diazepam on cortical 5 - HT release and behaviour in the Guinea - pig on exposure to the elevated plus maze. *Psychopharmacology*, 1993, Vol. 110, p. 490-496.
- RODGERS, R.J. and SHEPHERD, J. K., Influence of prior maze experience on behaviour and response to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark tests of anxiety in mice. *Psychopharmacology*, 1993, Vol. 113 p. 237-242.

- RODGERS, R.J., CAO, B.J., DALVI, A. and HOLMES, A., Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1997, Vol. 30 p. 289-304.
- SANGER, D. J., Animal Models of Anxiety and the Scening and Development of Novel Anxiolytic Drugs. In: *Neuromethods*. Humana Press, New Jersey, 1991, p. 147-187.
- SANTUCCI, L.B., DAUD, M.M., ALMEIDA, S.S. and DE OLIVEIRA, L.M., Effects of Early Protein Malnutrition and Enviromental Stimulation Upon the Reactivity to Diazepam in two Animal Models of Anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1994, Vol. 49 (2), p. 393-398.
- SEBBEN, A., SCHWARTZ C. A. and CRUZ, J. dos C., A Defesa Química dos Anfíbios. *Ciência Hoje*, 1993, jan./fev., Vol.15 (87) p. 25-33.
- SHEPHERD, J. K., GREWAL, S. S., FLETCHER, A., BILL, D.J., and DOURISH, C.T., Bahavioural and Pharmacological Characterization of the elevated “Zero-maze” as an animal model of Anxiety. *Psychopharmacology*, 1994, Vol. 116, p. 56-64.
- STEBBINS, R. C. and COHEN, N. W., *A Natural History of Amphibians*. Copyright by Princeton University Press, New Jersey, 1995, 315 p.
- STÉRU, L., THIERRY, B., CHERMAT, R., MILLET, B., SIMON, P. and PORSOLT R.D., Comparing benzodiazepines using the stairlase test in mice. *Psychopharmacology*, 1987, Vol. 92, p. 106-109.
- TOLEDO, R.C. and JARED, C., Cutaneous granular glands end amphibian venoms. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1995, Vol. 111 A, (1), p. 1-29.

- TOLEDO, R.C. de and JARED, C., Considerações sobre o veneno dos anfíbios. *Ciência E Cultura (Revista da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência)*, 1989, março, Vol. 41 (3), p. 250-258.
- TOLEDO, R.C. de, and VILLA, N., Estudo Histopatológico das Glândulas Tibiais (ou Paraccêmicas) de Bufo Paracnemis (Amphibia, Anura, Bufonidae). *Ver. Brasil. Biol.*, Rio de Janeiro, 1987, agosto, Vol. 47 (3), p. 257-264.
- WINSAUER, P. J., BIXLER, M.A. and MELE, P.C., Comparison of the Effects of Typical and Atypical Anxiolytics on Learning in Monkeys and Rats. *The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1996, Vol. 276 (3), p. 1111 - 1127.

APÊNDICES

TESTE DO "PLUS-MAZE"

SOLUÇÃO SALINA

| Nº DE RATOS | ENTRADAS | | TEMPO (s) | |
|-------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| | Braços Abertos | Braços Fechados | Braços Abertos | Braços Fechados |
| 01 | 1 | 4 | 13 | 287 |
| 02 | 2 | 8 | 30 | 270 |
| 03 | 1 | 8 | 2 | 298 |
| 04 | 1 | 6 | 15 | 285 |
| 05 | 3 | 7 | 35 | 265 |
| 06 | 0 | 5 | 0 | 300 |
| 07 | 0 | 7 | 0 | 300 |
| 08 | 3 | 4 | 100 | 200 |
| 09 | 0 | 3 | 0 | 300 |
| 10 | 0 | 4 | 0 | 300 |
| 11 | 0 | 1 | 0 | 300 |
| 12 | 1 | 7 | 15 | 285 |

Dose: 250µl
 Injeção: I.P.
 Ratos: Machos

TESTE DO "PLUS-MAZE"

DIAZEPAN

| Nº DE RATOS | ENTRADAS | | TEMPO (s) | |
|-------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| | Braços Abertos | Braços Fechados | Braços Abertos | Braços Fechados |
| 01 | 3 | 6 | 143 | 157 |
| 02 | 0 | 1 | 0 | 300 |
| 03 | 2 | 5 | 49 | 252 |
| 04 | 5 | 4 | 228 | 72 |
| 05 | 2 | 1 | 226 | 74 |
| 06 | 2 | 2 | 33 | 267 |
| 07 | 2 | 2 | 285 | 15 |
| 08 | 7 | 1 | 273 | 27 |
| 09 | 0 | 1 | 0 | 300 |
| 10 | 0 | 3 | 0 | 300 |
| 11 | 6 | 2 | 265 | 35 |
| 12 | 6 | 5 | 153 | 147 |
| 13 | 5 | 8 | 164 | 136 |
| 14 | 1 | 3 | 22 | 278 |
| 15 | 4 | 5 | 129 | 171 |
| 16 | 6 | 7 | 87 | 213 |
| 17 | 2 | 5 | 65 | 235 |
| 18 | 2 | 4 | 39 | 261 |

Dose: 500µl
 Injeção: I.P.
 Ratos: Machos

TESTE DO "PLUS-MAZE"
FATOR ANSIOLÍTICO "PICO 12"

| Nº DE RATOS | ENTRADAS | | TEMPO (s) | |
|-------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| | Braços Abertos | Braços Fechados | Braços Abertos | Braços Fechados |
| 01 | 3 | 3 | 43 | 257 |
| 02 | 4 | 1 | 274 | 26 |
| 03 | 2 | 0 | 300 | 0 |
| 04 | 1 | 2 | 16 | 284 |
| 05 | 3 | 4 | 72 | 228 |
| 06 | 1 | 2 | 60 | 240 |
| 07 | 1 | 2 | 22 | 278 |
| 08 | 1 | 0 | 300 | 0 |
| 09 | 4 | 3 | 152 | 284 |
| 10 | 0 | 1 | 0 | 300 |
| 11 | 0 | 5 | 0 | 300 |
| 12 | 2 | 7 | 32 | 268 |
| 13 | 3 | 3 | 60 | 240 |
| 14 | 4 | 3 | 150 | 150 |
| 15 | 0 | 1 | 0 | 300 |
| 16 | 2 | 2 | 40 | 260 |
| 17 | 0 | 3 | 0 | 300 |
| 18 | 3 | 6 | 132 | 168 |
| 19 | 1 | 2 | 10 | 290 |
| 20 | 3 | 6 | 105 | 195 |
| 21 | 1 | 5 | 17 | 283 |
| 22 | 3 | 0 | 300 | 0 |
| 23 | 1 | 0 | 300 | 0 |
| 24 | 0 | 1 | 0 | 300 |
| 25 | 2 | 1 | 55 | 245 |
| 26 | 1 | 0 | 300 | 0 |
| 27 | 1 | 2 | 40 | 260 |
| 28 | 0 | 3 | 0 | 300 |
| 29 | 3 | 4 | 63 | 237 |
| 30 | 3 | 1 | 271 | 29 |
| 31 | 0 | 1 | 0 | 300 |
| 32 | 0 | 1 | 0 | 300 |
| 33 | 1 | 0 | 300 | 0 |
| 34 | 1 | 4 | 23 | 287 |

Dose: 80µl

Injeção: Veia Peniana

Ratos: Machos

"HOLE-BOARD" - ATIVIDADE EXPLORATÓRIA
SOLUÇÃO SALINA

| Nº DE CAMUNDONGOS | LATÊNCIA (min.) | Nº DE FUROS |
|-------------------|-------------------|-------------|
| 01 | 5 | 41 |
| 02 | " | 58 |
| 03 | " | 47 |
| 04 | " | 40 |
| 05 | " | 46 |
| 06 | " | 23 |
| 07 | " | 43 |
| 08 | " | 10 |
| 09 | " | 53 |
| 10 | " | 55 |
| 11 | " | 27 |
| 12 | " | 38 |
| 13 | " | 29 |
| 14 | " | 16 |
| 15 | " | 60 |
| 16 | " | 11 |
| 17 | " | 37 |

Dose: 100µl

Injeção: I.P.

Camundongos: Machos

"HOLE-BOARD" - ATIVIDADE EXPLORATÓRIA

DIAZEPAN

| Nº DE RATOS | LATÊNCIA (min.) | Nº DE FUROS | | |
|-------------|----------------------|-----------------|------------------|------------------|
| | | DOSE = 0,5mg/kg | DOSE = 1,00mg/kg | DOSE = 2,00mg/kg |
| 01 | 5 | 37 | 16 | 23 |
| 02 | " | 16 | 09 | 22 |
| 03 | " | 35 | 11 | 28 |
| 04 | " | 28 | 25 | 29 |
| 05 | " | 36 | 21 | 30 |
| 06 | " | 21 | 08 | 12 |
| 07 | " | 25 | 31 | 21 |
| 08 | " | 22 | 11 | 30 |
| 09 | " | 15 | 16 | 14 |
| 10 | " | 24 | - | 21 |
| 11 | " | - | - | 04 |
| 12 | " | - | - | 22 |
| 13 | " | - | - | 26 |
| 14 | " | - | - | 30 |
| 15 | " | - | - | 14 |
| 16 | " | - | - | 34 |
| 17 | " | - | - | 73 |
| 18 | " | - | - | 32 |
| 19 | " | - | - | 21 |
| 20 | " | - | - | 20 |

Dose: 100µl

Injeção: I.P.

Camundongos: Machos

" HOLE-BOARD" - ATIVIDADE EXPLORATÓRIA
FATOR ANSIOLÍTICO "PICO 12"

| Nº DE RATOS | LATÊNCIA (min.) | Nº DE FUROS | |
|-------------|----------------------|-----------------|-----------------|
| | | DOSE = 2,0mg/kg | DOSE = 2,5mg/kg |
| 01 | 5 | 31 | 56 |
| 02 | " | 14 | 34 |
| 03 | " | 26 | 30 |
| 04 | " | 30 | 28 |
| 05 | " | 27 | 33 |
| 06 | " | 45 | 30 |
| 07 | " | 03 | 10 |
| 08 | " | 27 | 23 |
| 09 | " | 55 | 13 |
| 10 | " | 43 | 16 |
| 11 | " | 43 | 69 |
| 12 | " | 49 | 19 |
| 13 | " | 25 | 24 |
| 14 | " | 26 | 23 |
| 15 | " | 12 | 14 |
| 16 | " | 20 | 24 |
| 17 | " | 31 | 33 |
| 18 | " | 38 | 40 |
| 19 | " | 14 | - |
| 20 | " | 14 | - |

Dose: 100µl

Injeção: I.P.

Camundongos: Machos

TESTE DA NATAÇÃO

SOLUÇÃO SALINA

| Nº DE CAMUNDONGOS | LATÊNCIA (min.) | TEMPO DE TESTE (min.) | TEMPO DE ADAPTAÇÃO (min.) | TEMPO PARADO (seg.) |
|-------------------|-------------------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| 01 | 5 | 6 | 1 | 17 |
| 02 | " | " | " | 49 |
| 03 | " | " | " | 185 |
| 04 | " | " | " | 32 |
| 05 | " | " | " | 165 |
| 06 | " | " | " | 140 |
| 07 | " | " | " | 165 |
| 08 | " | " | " | 62 |
| 09 | " | " | " | 205 |
| 10 | " | " | " | 28 |
| 11 | " | " | " | 206 |
| 12 | " | " | " | 111 |
| 13 | " | " | " | 161 |
| 14 | " | " | " | 220 |
| 15 | " | " | " | 100 |

Dose: 100µl

Injeção: I.P.

Camundongos: Machos

NATAÇÃO

FATOR ANSIOLÍTICO (PICO 12)

| Nº DE CAMUNDONGOS | LATÊNCIA (min.) | TEMPO DE TESTE (min.) | TEMPO DE ADAPTAÇÃO (min.) | TEMPO PARADO (seg.) |
|-------------------|-------------------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| 01 | 5 | 6 | 1 | 210 |
| 02 | " | " | " | 195 |
| 03 | " | " | " | 212 |
| 04 | " | " | " | 165 |
| 05 | " | " | " | 225 |
| 06 | " | " | " | 202 |
| 07 | " | " | " | 150 |
| 08 | " | " | " | 138 |
| 09 | " | " | " | 228 |
| 10 | " | " | " | 239 |
| 11 | " | " | " | 134 |
| 12 | " | " | " | 182 |
| 13 | " | " | " | 130 |
| 14 | " | " | " | 174 |

Dose: 100µl

Injeção: I.P.

Camundongos: Machos

TESTE DA NATAÇÃO

DIAZEPAN

| Nº DE CAMUNDONGOS | LATÊNCIA (min.) | TEMPO DE TESTE (min.) | TEMPO DE ADAPTAÇÃO (min.) | TEMPO PARADO (s) | |
|----------------------|----------------------|----------------------------|--------------------------------|--------------------|---------------|
| | | | | DOSE = 0,5mg/kg | DOSE = 1mg/kg |
| 01 | 5 | 6 | 1 | 252 | 322 |
| 02 | " | " | " | 246 | 45 |
| 03 | " | " | " | 90 | 150 |
| 04 | " | " | " | 247 | 295 |
| 05 | " | " | " | 46 | 337 |
| 06 | " | " | " | 145 | 233 |
| 07 | " | " | " | 206 | 304 |
| 08 | " | " | " | 262 | 160 |
| 09 | " | " | " | 92 | - |
| 10 | " | " | " | 271 | - |

Dose: 100µl

Injeção: I.P.

Camundongos: Machos

TESTE DA ESCADA

SOLUÇÃO SALINA

| Nº DE CAMUNDONGOS | LATÊNCIA (min.) | Nº "REARING" (PÉ) | Nº DE DEGRAUS |
|-------------------|-------------------|---------------------|---------------|
| 01 | 10 | 29 | 30 |
| 02 | " | 34 | 31 |
| 03 | " | 10 | 11 |
| 04 | " | 22 | 41 |
| 05 | " | 27 | 31 |
| 06 | " | 40 | 29 |
| 07 | " | 30 | 29 |
| 08 | " | 19 | 30 |
| 09 | " | 15 | 30 |
| 10 | " | 19 | 24 |
| 11 | " | 25 | 30 |
| 12 | " | 30 | 32 |
| 13 | " | 20 | 12 |
| 14 | " | 17 | 17 |
| 15 | " | 29 | 18 |
| 16 | " | 20 | 21 |
| 17 | " | 23 | 28 |
| 18 | " | 26 | 32 |

Dose: 100µl

Injeção: I.P.

Camundongos: Machos

TESTE DA ESCADA

DIAZEPAN

| N° DE CAMUNDONGOS | LATÊNCIA (min.) | N° "REARING" (PÉ) | | N° DE DEGRAUS | |
|----------------------|----------------------|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | DOSE = 0,5mg/kg | DOSE = 1,0mg/kg | DOSE = 0,5mg/kg | DOSE = 1,0mg/kg |
| 01 | 10 | 25 | 05 | 38 | 10 |
| 02 | " | 12 | 00 | 34 | 09 |
| 03 | " | 10 | 06 | 70 | 16 |
| 04 | " | 09 | 05 | 69 | 10 |
| 05 | " | 04 | 02 | 75 | 05 |
| 06 | " | 01 | 15 | 00 | 09 |
| 07 | " | 13 | 03 | 57 | 32 |
| 08 | " | 10 | 06 | 21 | 40 |
| 09 | " | 12 | 01 | 67 | 00 |
| 10 | " | 15 | 07 | 50 | 45 |
| 11 | " | 20 | " | 40 | " |
| 12 | " | 26 | " | 57 | " |
| 13 | " | 15 | " | 49 | " |
| 14 | " | 18 | " | 56 | " |
| 15 | " | 23 | " | 29 | " |
| 16 | " | 16 | " | 35 | " |
| 17 | " | 23 | " | 36 | " |
| 18 | " | 21 | " | 32 | " |
| 19 | " | 23 | " | 40 | " |
| 20 | " | 17 | " | 37 | " |

Dose: 100µl

Injeção: I.P.

Camundongos: Machos

TESTE DA ESCADA

FATOR ANSIOLÍTICO " PICO 12"

| N° DE CAMUNDONGOS | LATÊNCIA (min.) | N° "REARING" (PÉ) | | N° DE DEGRAUS | |
|----------------------|----------------------|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | DOSE = 2,0mg/kg | DOSE = 5,0mg/kg | DOSE = 2,0mg/kg | DOSE = 5,0mg/kg |
| 01 | 10 | 25 | 05 | 38 | 10 |
| 02 | " | 12 | 00 | 34 | 09 |
| 03 | " | 10 | 06 | 70 | 16 |
| 04 | " | 09 | 05 | 69 | 10 |
| 05 | " | 04 | 02 | 75 | 05 |
| 06 | " | 01 | 15 | 00 | 09 |
| 07 | " | 13 | 03 | 57 | 32 |
| 08 | " | 10 | 06 | 21 | 40 |
| 09 | " | 12 | 01 | 67 | 00 |
| 10 | " | 15 | 07 | 50 | 45 |
| 11 | " | 20 | " | 40 | " |
| 12 | " | 26 | " | 57 | " |
| 13 | " | 15 | " | 49 | " |
| 14 | " | 18 | " | 56 | " |
| 15 | " | 23 | " | 29 | " |
| 16 | " | 16 | " | 35 | " |
| 17 | " | 23 | " | 36 | " |
| 18 | " | 21 | " | 32 | " |
| 19 | " | 23 | " | 40 | " |
| 20 | " | 17 | " | 37 | " |

Dose: 100µl

Injeção: I.P.

Camundongos: Machos