



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

*Campus São Gabriel*

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE  
FARMACOLÓGICA INDUZIDA PELO VENENO  
DE *Rhinella schneideri* SOBRE O SISTEMA  
CARDIOVASCULAR DE INSETOS**

MARINES DE AVILA HEBERLE

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA INDUZIDA PELO  
VENENO DE *Rhinella schneideri* SOBRE O SISTEMA  
CARDIOVASCULAR DE INSETOS**

MARINES DE AVILA HEBERLE

Monografia apresentada à Comissão de Trabalho de  
Conclusão do Curso de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Pampa — UNIPAMPA,  
*Campus* São Gabriel, como parte dos requisitos  
necessários à obtenção do grau de Bacharel em  
Ciências Biológicas.

Orientador: Chariston André Dal Belo

Rio Grande do Sul  
Dezembro de 2010

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA INDUZIDA PELO VENENO  
DE *Rhinella schneideri* SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR DE INSETOS**

MARINES DE AVILA HEBERLE

ORIENTADOR: CHÁRISTON ANDRÉ DAL BELO

Monografia submetida à Comissão de Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada por:

---

Presidente, Prof. Dr. Chariston André Dal Belo

---

Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Thaís Posser

São Gabriel, Dezembro de 2010

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter colocado a UNIPAMPA em minha vida me trazendo a oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Chariston André Dal Belo pela oportunidade, confiança, dedicação, paciência, apoio e incentivo sempre dedicado.

Ao Doutorando Sandro Rostelado Ferreira e a Prof<sup>a</sup>. Dra. Léa Rodrigues Simioni, ambos da Universidade Estadual de Campinas - SP (UNICAMP) por terem cedido o veneno.

Também agradeço ao Prof. Dr. Jeferson Luis Franco pela ajuda no laboratório.

Agradeço em especial à minha família que sempre acreditou em mim me apoiando, incentivando e me encorajando a não desistir. E também a alguns amigos que sempre estiveram ao meu lado como o Dr. Cláudio Vinícius de Senna Gastal Jr. pela confiança; Grazielle Daiane Sturmer por sempre estar ao meu lado me ajudando e me apoiando; a Ana Paula de Bairros Lucho, Joelio Dias e Thiago Carrazoni de Freitas pela ajuda.

E por último, porém não menos importante, gostaria de agradecer àqueles que contribuíram de forma indireta para a realização deste trabalho.

## RESUMO

### IVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA INDUZIDA PELO VENENO DE *Rhinella schneideri* SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR DE INSETOS

*Rhinella schneideri* é um sapo da família Bufonidae, nativo da América do Sul, inclusive do Brasil. Seu veneno, quando em contato com o meio externo, apresenta coloração amarela esbranquiçada, tendo como principal função proteger a pele do animal contra fungos e bactérias bem como contra o ataque de predadores. Por outro lado, apesar de ser um animal muito comum em várias regiões do Brasil, aspectos farmacológicos do seu veneno ainda não foram totalmente descritos na literatura. O presente trabalho teve por objetivo demonstrar a atividade farmacológica do veneno do sapo *Rhinella schneideri* sobre parâmetros bioquímicos e em preparação coração semi-isolado de *Phoetalia pallida* (BAUMAN E GERSCH, 1982). A análise bioquímica preliminar desse veneno demonstrou que o mesmo não possui atividade anticolinesterásica. Quando o homogenato das cabeças de baratas foi incubado com o veneno (32µg/g), não houve alterações significativas na enzima acetilcolinesterase. A administração do veneno (4, 16 e 32µg/g) sobre a preparação coração semi-isolado de baratas, induziu um efeito cronotrópico negativo progressivo que foi tempo e dose-dependente (diminuição da frequência cardíaca). A lavagem da preparação com solução salina para insetos não reverteu o efeito do veneno. A adrenalina atua aumentando a atividade da bomba de sódio-potássio ATPase. A administração de adrenalina (5µM) à preparação coração semi-isolado após a adição do veneno de *R. schneideri* (32µg/g), produziu um efeito cronotrópico positivo elevando a frequência cardíaca aos níveis controle. Em conclusão sugere-se preliminarmente que o veneno de *R. schneideri* induz um efeito cronotrópico negativo por bloquear a bomba de sódio-potássio ATPase no coração da barata. A ineficácia do veneno em inibir a enzima acetilcolinesterase associada reforça a hipótese de um efeito inibidor da bomba.

Palavras-chave: Veneno de sapo, *Rhinella schneideri*, Bloqueador da bomba sódio-potássio ATPase, *Phoetalia pallida*, Coração semi-isolado.

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF THE PHARMACOLOGICAL ACTIVITY INDUCED BY *Rhinella schneideri* VENOM IN INSECT CARDIOVASCULAR SYSTEM

*Rhinella schneideri* is a toad of the Bufonidae family, native from South America, including Brazil. When in contact with air, its venom turn to a white yellow coloration, functioning as protection against microorganisms at the animal skin surface, as well as, defense against predators. Although, *R. schneideri* is a common specie encountered in many regions of Brazil, the pharmacology of its venom has not been cited in literature. The aim of this work was to show the pharmacological activity of toad venom *R. schneideri* in an experimental model of semi-isolated *Phoetalia pallida* heart (BAUMAN E GERSCH, 1982). The preliminary biochemical analysis of the venom demonstrated that it does not have anticholinesterasic activity. When cockroaches head homogenates were incubated with venom (32µg/g) no alteration of the enzyme activity was found. The addition of venom at cockroach semi-isolated heart preparation induced a concentration and time-dependent mode of action. In this set of experiments, venom (4, 16 and 32µg/g) induced a progressive negative chronotropic effect (decrease in the frequency of beats). The washing of preparations with insect saline was ineffective to reverse the inhibitory effect. The addition of epinephrine (5µM) after venom addition (32µg/g) in semi-isolated heart preparation reversed the negative chronotropic effect of venom. In conclusion we suggest that the venom of *R. schneideri* decreases the cockroach cardiac frequency by blocking the sodium-potassium ATPase pump at the insect heart. The venom does not interfere with cockroach acetylcholinesterase activity what is a reinforcement for the mechanism of action proposed.

Key-words: Toad venom, *Rhinella schneideri*, Blocker of sodium-potassium ATPase pump, *Phoetalia pallida*, Semi-isolated heart.

## LISTA DE FIGURAS

### SUMÁRIO

Figura 1 .....	11
Figura 2 .....	14
Figura 3 .....	15
Figura 4 .....	16
Figura 5 .....	16
Figura 6.....	21
Figura 7 .....	21
Figura 8 .....	23
Figura 9 .....	24
Figura 10 .....	25
Figura 11 .....	26
Figura 12 .....	26

## SUMÁRIO

Resumo .....	5
<i>Abstract</i> .....	6
Lista de Figuras .....	7
Sumário .....	8
1. INTRODUÇÃO .....	10
1.1 Sapos e seus venenos .....	10
1.2 O sapo <i>Rhinella schneideri</i> .....	10
1.3 Composição química dos venenos de sapos.....	11
1.4 Baratas.....	12
1.5 Sistema cardiovascular de baratas.....	14
1.6 Adrenalina .....	15
1.7 Triclorfon .....	16
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1 Animais.....	18
3.2 Veneno.....	18
3.3 Reagentes e Drogas.....	19
3.4 Solução Nutritiva.....	19
3.5 Ensaio Bioquímico.....	19
3.6 Preparação biológica.....	20
3.7 Análise estatística.....	22
4. RESULTADOS.....	23
4.1 Análise Bioquímica.....	23



4.2 Ensaio Biológico.....	23
5. DISCUSSÃO.....	27
6. CONCLUSÃO.....	29
REFERÊNCIAS.....	30

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Sapos e seus venenos

Os sapos são animais da ordem Anura, encontrados, principalmente, em áreas de clima tropical e úmido temperado. São animais dependentes de ambientes aquáticos, por isso são encontrados próximos a nascentes, riachos, lagoas, rios e banhados. Até o momento foram descritas mais de 4.800 espécies de sapos, sendo que destas, mais de oitocentas são encontradas no Brasil (BASTOS et al., 2003).

Os venenos de anfíbios são substâncias de natureza esteroidea, caracterizadas principalmente pela presença de bufotoxinas que causam apenas pequenas irritações cutâneas em seres humanos, mas se ingerido, geralmente por cães, pode causar sérias complicações envolvendo o sistema nervoso e circulatório (CARDOSO et al., 2003). Nos sapos existem ainda outros tipos de substâncias venenosas, como a bufotenina, que é um derivado metilado da serotonina.

### 1.2 O sapo *Rhinella schneideri*

*Rhinella schneideri* é uma espécie de sapo descrita em 1894 por Werner. Atualmente pode ser encontrado do Uruguai a Bolívia central, passando pelo Paraguai e Argentina. No Brasil, é encontrado principalmente nos estados da Bahia, Pernambuco, Mato Grosso, Goiás e Região Sul (BASTOS et al., 2003; FROST, 2002; COCHRAN, 1955).

O sapo *Rhinella schneideri* pertence à família Bufonidae, gênero *Rhinella*. No Brasil é conhecido popularmente como sapo-boi (FIGURA 1). Esta espécie pertence a um grupo que congrega animais de grande porte possuindo membros curtos e coloração que varia de castanho-claro a escuro. Possui pele áspera com região dorsal bastante rugosa devido à presença de glândulas cutâneas (COCHRAN, 1955). Embora não possuam um sistema de inoculação de veneno, esses animais são considerados peçonhentos, com glândulas que expõem sua

peçonha, distribuídas por toda a superfície da pele (SAKATE E LUCAS DE OLIVEIRA, 2000). Duas dessas, localizadas logo atrás dos olhos, são chamadas de glândulas paratóides, e atrás da tíbia estão as glândulas paracnemis. Quando são espremidas, as glândulas liberam veneno através de grandes poros. O veneno produzido por esses animais traduz-se em um líquido fino e leitoso de cor amarela esbranquiçada e que serve de mecanismo de defesa protegendo-os contra o ataque de predadores, já que não possuem outras formas de defesa como garras, dentes ou espinhos. Além disso, as secreções cutâneas desses anfíbios são importantes para a sua proteção contra os microorganismos que podem proliferar-se em mucosas, pois a respiração, alterações hídricas e eletrolíticas além da termorregulação são realizadas através da pele.



**Figura 1** - *Rhinella schneideri*

(Fonte: <http://www.brumadinhotour.com.br/pordentrodovale/sapocururu.php>)

### 1.3 Composição química dos venenos de sapos

A composição química dos venenos de sapos em geral é muito complexa e varia dependendo da espécie, sendo geralmente utilizada para a classificação taxonômica desse grupo de anfíbios. Em termos biotecnológicos, o

conhecimento da ação destes venenos pode contribuir para a síntese de substâncias quimicamente ativas, com potencial terapêutico, e a possibilidade de seu emprego no tratamento de diversas patologias em seres humanos e animais. O veneno de sapo é principalmente cardiotoxico e provoca ação semelhante a de digitálicos. Em termos químicos, as substâncias que compõem os venenos de sapos podem ser divididas em duas classes principais: os compostos básicos (aminas biogênicas) incluindo a adrenalina, a noradrenalina, as bufoteninas, dihidrobufoteninas e as bufotioninas. Os derivados esteroidais, que compõem a segunda classe de substâncias encontradas nesses venenos representadas pelo colesterol, ergosterol,  $\gamma$ -sistotolol, bufotoxinas, e bufadienolídeos compreendidos pela arenobufogenina, argentinogenina, bufalina, bafarenogina, bufotalina, bufotalinina, cinobufogenina, cinobufotalina, desacetilbufotalina, desacetilcinobufotalina, gamabufotalina, helebrigenina, jamacobufogenina, marinobufogenina, resibufogenina, telocinobufogenina. Dessa forma, a principal diferença entre os venenos de sapos, quando comparados a outros venenos animais, como os de serpentes, abelhas e escorpiões é a presença de componentes protéicos tóxicos em menor quantidade.

Devido aos efeitos cardiotoxicos desencadeados pelas toxinas presentes nos venenos de batráquios, quando esses são ingeridos por animais ou mesmo por seres humanos, podem ser potencialmente fatais, desencadeando fenômenos de intoxicação cardíaca podendo levar à morte por parada cardiorrespiratória (SAKATE E OLIVEIRA, 2000). Por outro lado, o interesse no estudo desses compostos vem crescendo, já que esses venenos são ricas fontes de moléculas-protótipo, que podem ser usadas para o desenvolvimento de novas drogas usadas na terapêutica humana e animal, bem como no desenvolvimento de novos inseticidas naturais.

#### **1.4 Baratas**

Blattaria ou Blattodea é uma ordem de insetos cujos representantes são popularmente conhecidos como baratas. É um grupo cosmopolita, sendo que algumas espécies (menos de 1%) são consideradas sinantrópicas. As baratas são

insetos hemimetábolos, ou seja, apresentam metamorfose incompleta, do tipo paurometabólica (os imaturos e adultos vivem no mesmo hábitat), passando pelos estágios de ovo, ninfa (correspondente à fase larval) e adulto, com a ausência do estágio imóvel (pupa). A fêmea produz uma cápsula protetora dos ovos (ooteca), em forma de bolsa fechada. O número de ovos varia com a espécie podendo chegar até 50 ovos.

O ciclo de desenvolvimento da barata, do ovo à fase adulta, depende de fatores como espécie, condições de temperatura e umidade (alta temperatura e alta umidade favorecem um menor tempo de desenvolvimento), quantidade de alimento e teor de proteína disponível, além de outras condições ambientais. Baratas são animais de hábitos noturnos, quando saem do abrigo para alimentação, cópula, oviposição, dispersão e vôo.

As baratas constituem um grupo de insetos muito utilizados em bioensaios para identificação de novas substâncias com atividade farmacológica, havendo a possibilidade de se avaliar a atividade por contato, ingestão ou ainda como reguladora de crescimento. Possuem também papel importante em saúde pública, transportando diversos agentes patogênicos (CORNWELL, 1968), que ficam aderidos ao corpo, principalmente, em pêlos e cerdas das pernas, sendo transportados mecanicamente de uma área contaminada para uma área limpa (SERRAFREIRE, 1999). A facilidade de criação associada ao baixo custo e ao elevado potencial reprodutivo contribuiu para o uso destes insetos na presente pesquisa.

É grande o interesse em modelos experimentais de baratas no estudo envolvendo a biomedicina. As baratas têm sido usadas em modelos comportamentais de memória, em doenças neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer e outras doenças nas quais o neurotransmissor glutamato está envolvido. Nesses estudos, o interesse por esses animais, se dá pelo fato do glutamato, envolvido nos processos de excitotoxicidade, ser o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso periférico.

A *Phoetalia pallida* (FIGURA 2) apresenta coloração castanho-clara brilhosa; pronoto largo, de cor castanha com mancha centro-basal castanho escura, mais larga na base, estreitando-se para o ápice e cobrindo a cabeça; cabeça com olhos, vértice, espaço interocular, fronte e base do clípeo castanho-escuros bem como as antenas. Pernas ambulatórias, coxas grandes, fêmures e tíbias com pêlos.



© josef dvořák 2001

**Figura 2 - *Phoetalia pallida***

(Fonte: <http://www.insect.cz/details.php?>

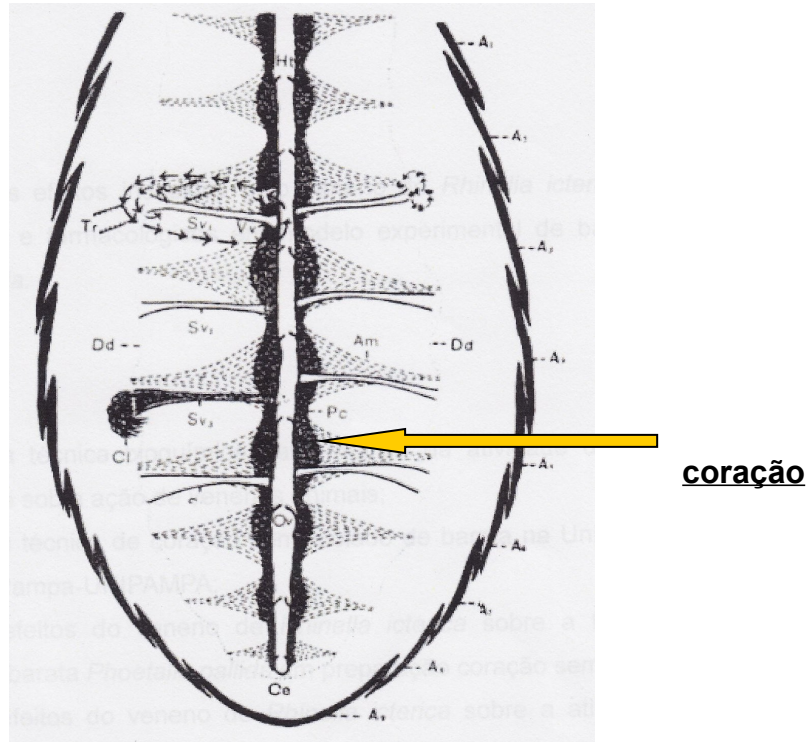
[image\\_id=2226&sessionid=182df16fa46fd251feca2c7c1b8e346a&l=arabic](http://www.insect.cz/details.php?image_id=2226&sessionid=182df16fa46fd251feca2c7c1b8e346a&l=arabic))

### 1.5 Sistema cardiovascular de baratas

A função primária do sistema circulatório de baratas (FIGURA 3), como em outros insetos, é transportar os nutrientes dos sítios de absorção para os tecidos do organismo, produtos da degradação metabólica para os órgãos de excreção e hormônios dos locais de secreção para os sítios-alvos. A circulação da hemolinfa, como em outros insetos, depende de um sistema aberto, por onde se move livremente dentro da cavidade corporal, chamada de hemocele. A hemolinfa penetra no coração de 12 câmaras, através de doze pares de aberturas. As pulsações do coração são geradas primariamente por contrações da parede muscular, possivelmente assistida por músculos alares. A contração do coração de baratas é caracterizada por três fases: sístole (contração), diástole (relaxamento) e diástase (período de repouso).

O coração da barata, tem sido objeto de estudo em bioensaios de agentes farmacológicos e hormônios. Frequentemente a preparação coração semi-isolado é empregada. O coração exposto é banhado em solução salina que deverá

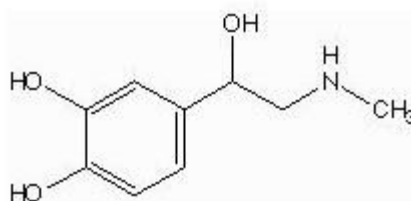
conter os compostos a serem testados. Assim, até o momento foram descritos os efeitos de várias drogas como a acetilcolina, 5-hidroxitriptamina, dopamina, sinefrina, octopamina, triptamina, aminofilina e prostaglandinas cujos respectivos receptores devem estar presentes nesse órgão (COLLINS E MILLER, 1977).



**Figura 3** - Coração de Barata  
(Fonte: The American Cockroach, 2005)

## 1.6 Adrenalina

A adrenalina ( $C_9H_{13}NO_3$ ) ou epinefrina (FIGURA 4) é secretada pela medula das adrenais e por outros tecidos cromafins. Apresenta ações farmacológicas importantes. É um estimulante cardíaco muito potente. Por ação em receptores beta<sub>1</sub>-adrenérgicos, excita tanto as fibras miocárdicas quanto o sistema de condução do coração. Pode ser definida como um agente cronobatmo-dromo-inotrópico positivo, isto é, aumenta o automatismo, a excitabilidade, a condução e a contratilidade. (CRAIG E STITZEL, 2005).

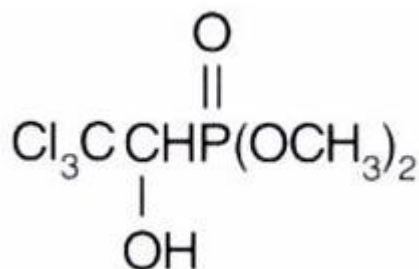


**Figura 4** – Estrutura química da adrenalina  
(Fonte: <http://www.netdrugs.info/dci/epine.shtml>)

### 1.7 Triclorfon

O Triclorfon (dimetil 2,2,2, tricloro-1-hidroximetil fosfonato) (Figura 5) é um inseticida e acaricida organosforado, solúvel em água, amplamente utilizado no controle de várias pragas em campos, lares, plantas e contra parasitas em animais domésticos e comerciais (LOPES *et al*, 2006). Estes compostos apresentam um largo campo de aplicações, uma vez que sua estrutura química permite diversos modos de ação, sendo bastante empregados como potentes inseticidas, cuja função principal é a inibição e interação com a enzima acetilcolinesterase de insetos, causando inativação da mesma (CAVALIERE *et al*, 1996).

Os inseticidas organofosforados são a classe de maior interesse comercial e toxicológico, são ésteres ou tiois derivados de ácidos fosfóricos, fosfônico, fosfínico ou fosforamídico (CAVALIERE *et al*, 1996).



**Figura 5** – Estrutura química do triclorfon.  
(Fonte: <http://www.anvisa.gov.br>)



## 2. OBJETIVOS

### Objetivos gerais

Estudar os efeitos induzidos pelo veneno de *Rhinella schneideri* sobre parâmetros bioquímicos e farmacológicos em modelo experimental de baratas da espécie *Phoetalia pallida*.

### Objetivos específicos

- 1- Extração metanólica do veneno de *Rhinella schneideri*;
- 2- Avaliar os efeitos cronotrópicos do veneno de *R. schneideri* em insetos da espécie *Phoetalia pallida* por meio da preparação coração semi-isolado;
- 3- Identificar o sítio de ação do veneno de *R. schneideri* sobre o sistema cardiovascular de *P. pallida*;
- 4- Avaliar os efeitos do veneno de *R. schneideri* sobre parâmetros bioquímicos associados à atividade da enzima acetilcolinesterase de homogenato de cérebro de baratas *P. pallida*.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram adquiridas baratas adultas de ambos os sexos da espécie *Phoetalia pallida* através de criadouro legalizado (Insetos on line, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) e acondicionadas em caixa especial para insetos. Os animais foram mantidos em temperatura de 20-24°C e alimentados com ração de cachorro (Purina®) e água potável *ad libitum*.

#### 3.2 Veneno

O veneno do sapo *Rhinella schneideri* foi obtido de animais coletados no estado do Tocantins no ano de 2008. Para extração do veneno, os animais capturados foram levados a um posto de coleta. Antes do processo de extração, os animais foram lavados com água destilada para a remoção de resíduos de terra e poeira e secos com papel toalha. A extração foi realizada por compressão manual das glândulas paratóides do animal. O veneno foi coletado com o auxílio de uma espátula plástica e acondicionado em recipiente estéril que foi mergulhado em gelo. Após a coleta os animais foram soltos em seu hábitat de origem. O veneno de *R. schneideri* é insolúvel em solventes orgânicos, portanto, houve a necessidade de se fazer uma extração metanólica do veneno bruto. Foram utilizados 2g do veneno bruto e adicionados em 50mL de metanol, essa mistura foi mantida em repouso por 3 dias e, em seguida, foi realizada a evaporação do metanol. O resultado dessa extração, na forma de pó, está pronto para ser dissolvido em solução nutritiva e ser testada em preparações biológicas.

### 3.3 Reagentes e Drogas

Iodeto de Acetilcolina e ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Adrenalina em ampolas (183,19 M) da Empresa Hipolabor (Belo Horizonte, Minas Gerais-BR), A formulação comercial do pesticida organofosforado triclorfon (dimetil 2,2,2, tricloro-1-hidroximetil fosfonato  $C_4H_8Cl_3O_4P$ ), marca comercial Triclorvet® - Allvet. (Londrina, Paraná-BR)

### 3.4 Solução Nutritiva

#### Solução Fisiológica para Insetos

Solução fisiológica para insetos – composição em mM – NaCl, 150;  $CaCl_2$ , 2; KCl, 10 e Tris-HCl, 10 ajustado para pH 6.8 usando 2N NaOH. Origem dos sais: Quimibrás Indústrias Químicas, Rio de Janeiro. As soluções teste foram preparadas imediatamente antes do início de cada experimento.

### 3.5 Ensaio Bioquímico

#### Medida da atividade anticolinesterásica

A inibição *in vitro* da Acetilcolinesterase foi avaliada de acordo com os ensaios descritos por ELLMAN *et al.* (1961) com algumas modificações (FRANCO *et al.* 2009). Após 6 horas do momento em que os animais foram injetados com o veneno, suas cabeças (n=3) foram removidas com o auxílio de uma tesoura cirúrgica e homogeneizadas com tampão fosfato salina fria (pH – 7,0). Logo após, o preparado foi centrifugado a 500RPM durante 5 minutos a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi retirado e isolado em recipiente estéril, sendo mantido no gelo

até ser utilizado para determinação da atividade anticolinesterase em espectrofotômetro a 412nm.

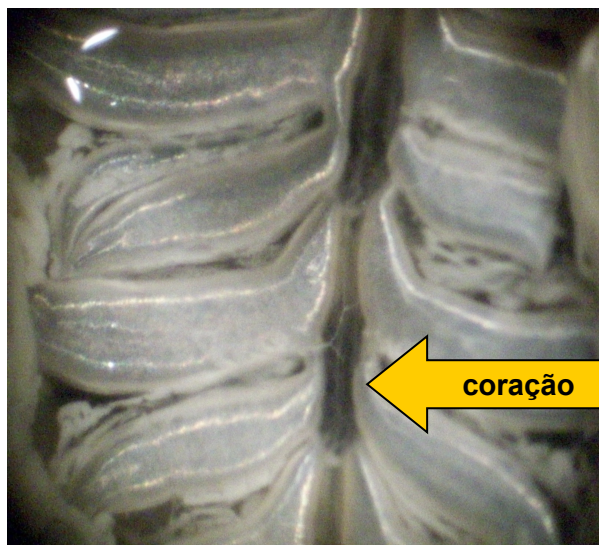
### 3.6 Preparação Biológica

#### Preparação coração semi-isolado de baratas

A preparação coração semi-isolado de barata (BAUMANN E GERSCH, 1982) (FIGURA 6) foi utilizada para avaliar os efeitos farmacológicos induzidos pelo veneno de *Rhinella schneideri*. Para cada dose testada do veneno foram usados quatro animais (n=4). Baratas adultas da espécie *Phoetalia pallida* foram anestesiadas com éter etílico e imobilizadas em placas de isopor por meio de alfinetes entomológicos com o lado ventral voltado para cima. As margens laterais do abdômen foram cortadas ao longo de cada lado com o auxílio de uma tesoura cirúrgica e uma pinça, removendo assim a cutícula abdominal, expondo as vísceras que foram cuidadosamente afastadas para que o coração fosse exposto (FIGURA 7). O coração foi banhado com solução salina 0,015mM em temperatura ambiente. Após os 5 minutos iniciais para a estabilização da frequência cardíaca, as diferentes concentrações do veneno foram adicionadas sobre o coração, em um volume final de 150 µL/animal. A frequência cardíaca foi monitorada durante 30 minutos com o auxílio de um microscópio estereoscópio (Olympus, Damstat, Alemanha). Após esse período, a preparação foi lavada com solução salina e monitorada por mais 5 minutos para verificar se haveria recobro da frequência cardíaca. Os testes foram todos realizados durante a noite, já que as baratas são animais noturnos, Este cuidado foi tomado para evitar grandes variações na frequência cardíaca dos animais.



**Figura 6** – Fotografia de preparação coração semi-isolado de barata.



**Figura 7** – Fotografia de coração de barata

### **3.7 Análise Estatística**

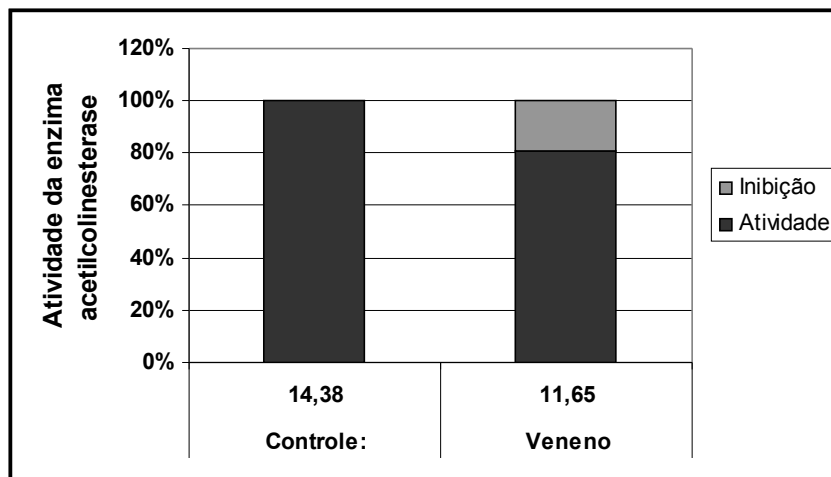
Os dados foram plotados ponto a ponto com média e erro padrão, com auxílio do programa Microsoft Excel (Microsoft Office Excel 2003). Os resultados

foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . A análise estatística foi realizada usando-se o método Anova para medidas repetidas por meio do software OriginPro 8 (OriginLab Co, Northampton, MA, USA).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análise Bioquímica

A análise bioquímica do veneno de *Rhinella schneideri* demonstrou que o mesmo não possui atividade anticolinesterásica. Quando os homogenatos de cabeça de baratas foram incubados com o veneno (32µg/g) nenhuma alteração significativa foi observada quando comparada com o controle sem veneno (n=3,  $p>0,05$ ) (FIGURA 8).

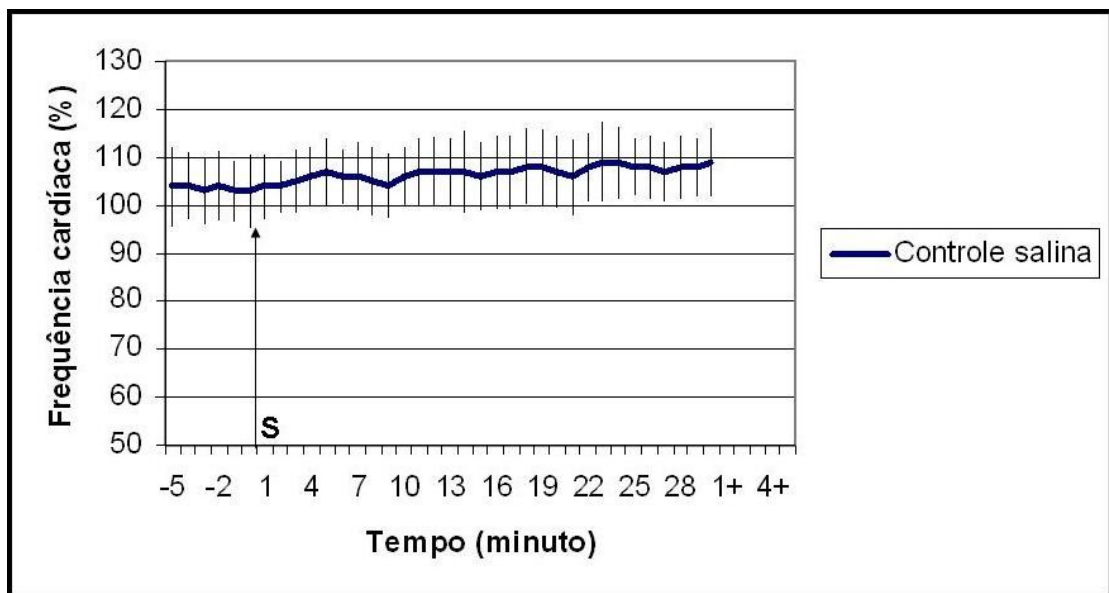


**Figura 8** – Análise da atividade da enzima acetilcolinesterase em homogenato de cérebro de baratas da espécie *Phoetalia pallida*. Note que não houve inibição significativa da atividade da enzima na presença do veneno de *Rhinella schneideri*.

### 4.2 Ensaios Biológicos

#### Atividade em Solução Salina

A adição de solução salina (0,15mM) sobre a preparação coração semi-isolado de baratas não causou alterações significativas na frequência cardíaca do animal (FIGURA 9).

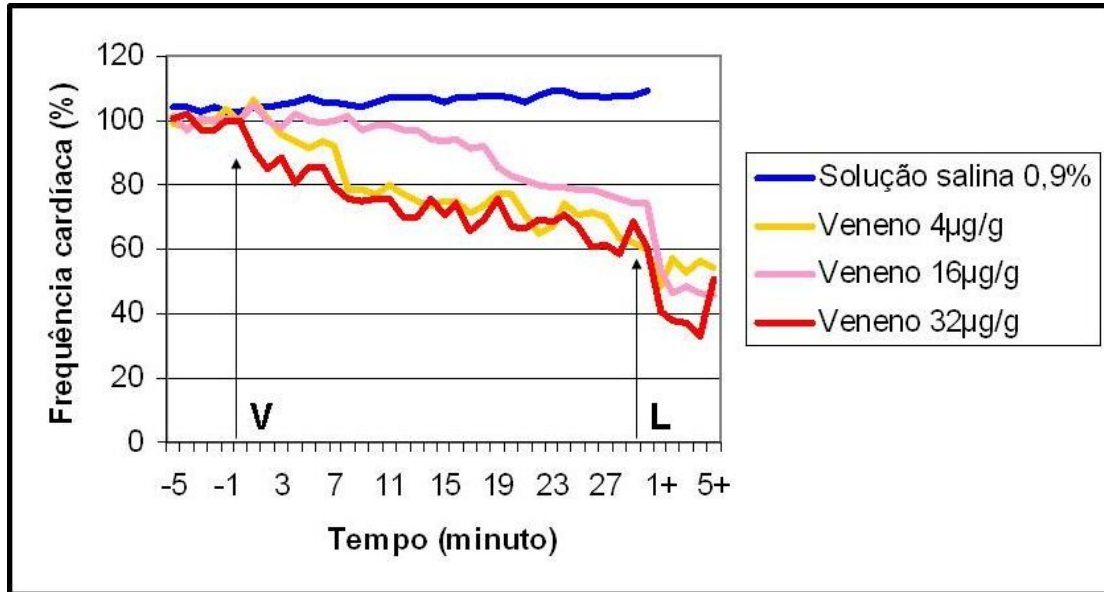


**Figura 9** – Frequência cardíaca de baratas da espécie *Phoethalia pallida* em preparação coração semi-isolado em presença de solução salina. S: aplicação da solução salina.

### **Atividade do veneno de *Rhinella schneideri* em coração semi-isolado de baratas**

A adição de veneno de *R. schneideri* em preparação coração semi-isolado de barata induziu um efeito tempo e dose-dependente. Neste conjunto de experimentos, veneno (4, 16 e 32 $\mu$ g/g), produziu um efeito cronotrópico negativo progressivo, que se iniciou após alguns minutos da adição do mesmo na preparação. Após a retirada do veneno, por meio de lavagem com solução salina, não houve reversão do efeito inibidor (FIGURA 10). Experimentos controle, somente com a solução salina, também foram realizados, não havendo nenhuma alteração significativa com esse protocolo.

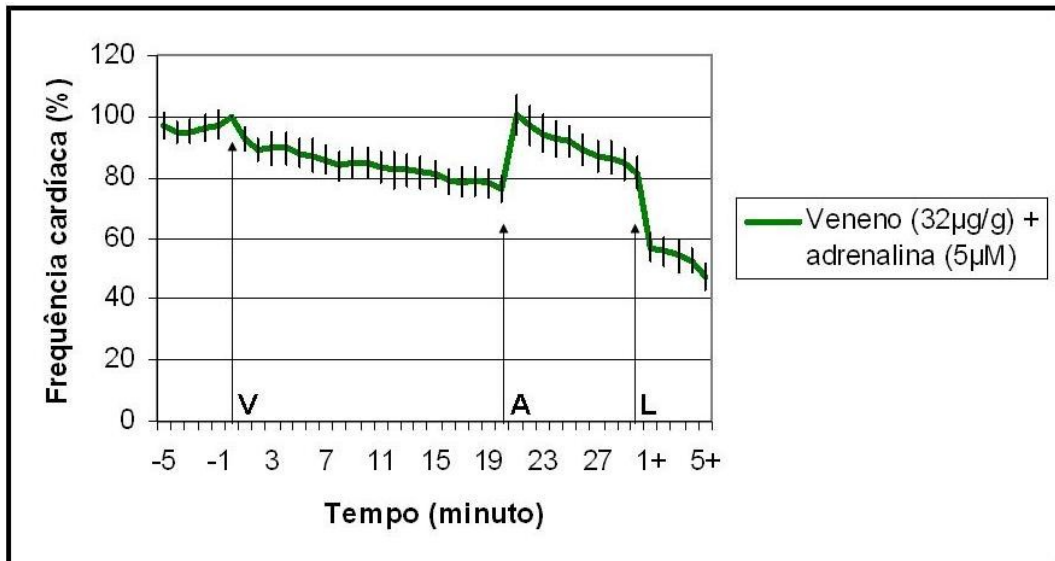




**Figura 10** – Medida dos efeitos cronotrópicos induzidos pelo veneno de *R. schneideri* em preparação coração semi-isolado de *P. pallida*. O gráfico representa a média de três experimentos. V: adição do veneno. L: lavagem da preparação com solução salina para insetos.

### **Atividade do veneno de *R. schneideri* + Adrenalina em preparação coração semi-isolado de barata**

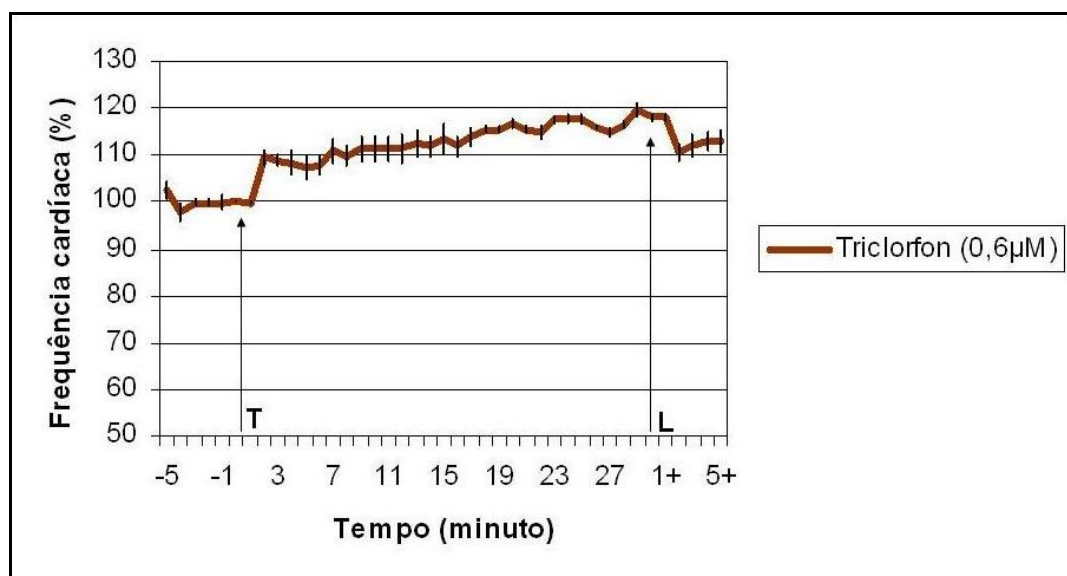
A administração da adrenalina em mamíferos produz um efeito cronotrópico positivo, que é caracterizado pelo aumento da frequência cardíaca. Assim, o objetivo deste protocolo foi o de avaliar se o efeito cronotrópico negativo causado pelo veneno de *R. schneideri* sobre a preparação coração semi-isolado de *P. pallida* era revertido com o uso da adrenalina ( $5\mu\text{M}$ ), o que sugere que o veneno de *R. schneideri* estaria agindo sobre a bomba de sódio-potássio ATPase (FIGURA 11).



**Figura 11** – Avaliação dos efeitos induzidos pelo uso do veneno de *R. schneideri* + adrenalina. O gráfico representa a média em um experimento usando a maior dose (32 $\mu$ g/g) de veneno de *R. schneideri* onde também foi aplicada adrenalina. Note a reversão do efeito cronotrópico negativo causada pela adrenalina. V: aplicação do veneno. A: aplicação da adrenalina. L: lavagem com solução salina.

### Atividade do Triclorfon sobre a preparação coração semi-isolado de barata

O uso de Triclorfon (22 $\mu$ g/g) sobre a preparação coração semi-isolado de barata causou um efeito cronotrópico positivo, caracterizado pelo aumento da frequência cardíaca (FIGURA 12).



**Figura 12** – Atividade do Triclorfon sobre a preparação coração semi-isolado de barata. Note que o triclorfon produz aumento da frequência cardíaca. T: aplicação do triclorfon. L: lavagem com solução salina.

## 5. DISCUSSÃO

Neste estudo foi demonstrado que o veneno de *Rhinella schneideri* exerce uma atividade cardiopéssica importante sobre o sistema cardiovascular de baratas da espécie *Phoetalia pallida*.

Venenos de sapos são uma mistura complexa de compostos que compreendem a família dos esteróides cardioativos, conhecidos como bufodienolídeos (bufaginas) e bufotoxinas, bem como as catecolaminas adrenalina e noradrenalina além de indoalquilaminas indólicas (HALLIDAY et al., 2009). Em mamíferos, a toxicidade associada ao envenenamento pelo veneno de sapo resulta na ligação dos esteróides cardiotônicos ao sítio da bomba de sódio-potássio ATPase (ELLMAN et al, 1961).

O coração da barata foi considerado inicialmente, um órgão neurogênico, sendo essa idéia logo descartada, pelo fato de que, mesmo após a remoção dos nervos cardíacos e o tratamento com tetrodotoxina, um bloqueador dos canais de sódio capaz de paralisar a condução nervosa, o coração continuava a bater ritmicamente (ADIYODI, 1981). Assim, sugeriu-se que os nervos cardíacos marginais ao sistema cardiovascular da barata não controlariam os batimentos cardíacos em relação ao número de sístoles e diástoles, mas seria capaz de controlar a frequência cardíaca (ADIYODI, 1981).

A preparação coração semi-isolado de barata tem sido usada em bioensaios de agentes farmacológicos e hormônios. Várias drogas já foram testadas até o momento e seus efeitos cardiomoduladores descritos. Por exemplo, a contração do músculo cardíaco de barata é completamente inibida em presença de solução salina livre de sódio (ADIYODI, 1981). A acetilcolina, um colinérgico de ação direta sobre os receptores nicotínicos e muscarínicos, acelera a frequência cardíaca, provavelmente por atuar nos nervos cardíacos laterais (COLLINS e MILLER, 1976). A catecolamina dopamina, um derivado do aminoácido tirosina, e a 5-hidroxitriptamina, um neurotransmissor de ação central em mamíferos, aumentam a frequência cardíaca nesses animais. Já o ácido gama aminobutírico não produz efeitos nessa preparação.

Quanto aos efeitos de drogas colinérgicas sobre o músculo cardíaco das baratas, foi demonstrado, em nossas condições experimentais, que o veneno

de *R. schneideri* não possui atividade anticolinesterásica, reforçando o fato de não termos evidenciado aumento significativo da frequência cardíaca, em nenhuma das doses testadas com este veneno. Se o efeito do veneno estivesse relacionado a um aumento da concentração da acetilcolina nos nervos cardíacos, ocasionada pela inibição da enzima colinesterase, um efeito cronotrópico positivo deveria ser evidenciado, como foi demonstrado com a aplicação do anticolinesterásico triclorfon.

Como demonstrado neste estudo, o veneno de *R. schneideri* induz somente a diminuição da frequência cardíaca na barata. Como a literatura demonstra que em sua grande maioria, os venenos de sapos atuam sobre a bomba de sódio-potássio ATPase, resolvemos investigar esse sítio de ação como principal alvo de atuação do veneno em questão. Para tanto, foi feito um controle com a catecolamina adrenalina, com o objetivo de evidenciar o seu efeito sobre o sistema cardiovascular da barata. Drogas bloqueadoras de bomba, como a digoxina e a ouabaina possuem a característica peculiar de aumentar a força de contração da musculatura cardíaca (inotropismo positivo), enquanto diminuem a frequência (cronotropismo negativo). Dessa forma, o mecanismo de ação, em mamíferos, está associado ao bloqueio da bomba de sódio-potássio ATPase. Como consequência, ocorre elevação do sódio intracelular, resultando em aumento do efluxo de sódio através do trocador de sódio- $\text{Ca}^{++}$  no interior da célula, que funciona para manter níveis relativamente constantes de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{++}$  no interior da célula. Normalmente o trocador sódio-cálcio remove cálcio em troca de sódio. Todavia, na presença de concentrações aumentadas de sódio intracelular, haverá efluxo de sódio e sua troca com o  $\text{Ca}^{++}$  extracelular. Essa reversão na atividade do trocador sódio-cálcio resulta em um aumento da concentração intracelular de cálcio ionizado livre e conseqüentemente aumento da força de contração do miocárdio (CRAIG e STITZEL, 2005). Por outro lado, a adrenalina atua de maneira contrária, ativando a bomba de sódio potássio ATPase fazendo com que a frequência cardíaca seja aumentada (cronotropismo positivo) (NIKOLSKY et al., 1991). Em nossas condições experimentais a adição de adrenalina após a instalação do efeito cronotrópico negativo pelo veneno reverteu esse efeito momentaneamente, o que demonstra uma atividade antagonista ao veneno.

Dessa forma, sugere-se que o veneno de *R. schneideri*, induza alterações cronotrópicas em preparação coração semi-isolado de *Phoetalia pallida* por inibir a bomba de sódio-potássio ATPase.

## 6. CONCLUSÃO

Os ensaios bioquímicos e farmacológicos realizados com o veneno de *Rhinella schneideri* em modelo de *Phoetalia pallida*, permitem concluir que:

- 1- O veneno de *R. schneideri* não exerce ação sobre a atividade da enzima colinesterase;
- 2- O veneno de *R. schneideri* exerce um efeito cronotrópico negativo sobre o sistema cardiovascular da barata *Phoetalia pallida*, provavelmente por inibir a bomba de sódio-potássio ATPase;
- 3-; A adrenalina reverte o efeito cronotrópico negativo induzido pelo veneno.

## REFERÊNCIAS

ADIYODI, K.G. **The American Cockroach**. Kluwer Academic Publishers, V.6, p.34-35, 1981.

BAUMANN, H. & GERSCH, M. **Purification and identification of Neurohormone D, a heart accelerating peptide from the corpora cardiaca of the cockroach, *Periplaneta americana***. *Insect Biochem.* v.12, p.7—14, 1982.

BASTOS, et al. **Sapos, rãs e pererecas: desvendando o segredo dos anfíbios**. Goiânia: R. P. Bastos, v.1, p.12, 2003.

CARDOSO, J. L. C., et al. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, v.1, p.469, 2003.

CAVALIERE, M.J. et al. **Miotoxicidade por organofosforados**. *Revista de Saúde pública.* 30 (3) 1996.

COCHRAN, D. M. **Frogs of southeastern Brazil**. *Bull. U.S. Nat. Mus.*, n.206, p.1-423, 1955.

COLLINS, C. & MILLER, T. **Studies on the action of biogenic amines on cockroach heart**. Department of Entomology. Division of Toxicology and Physiology; University of Califórnia, *Exp. Bio.* v.67, p.1-15, 1977.

CORNWELL, P.B. **The cockroach. A laboratory insect and an industrial pest**. London: Hutchinson, v.1, 1968.

CRAIG, C., STITZEL, R. E. **Farmacologia Moderna com Aplicações Clínicas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v.13, p.415, 2005.

ELLMAN, G.L. et al. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**. v.7, p.88, 1961.

EXTOXNET – Extension Toxicology Network. **Pesticide Information Profiles – Trichlorfon**. Disponível em: <http://extoxnet.orst.edu/pips/trichlor.htm>

FRANCO J.L., POSSER T., MATTOS J.J., et al. Zinc reverses malathion-induced impairment in antioxidant defenses. **Toxicology Letters**. v.187 (3), p.137-143, 2009.

FROST, D. R. **Amphibian Species of the World: an online reference**. V.2, 2002.

GALLO, D. et al. **Entomologia agrícola**. Piracicaba- SP, FEALQ, v.10, 2002.

HALLIDAY, D. C. Cane toad toxicity: an assessment of extracts from early developmental stages and adult tissues using MDCK cell culture. **Toxicon**. Glasgow, Escócia, v.53, p.385-391, 2009.

LOPES, R. B. et al. Bioconcentration of trochlorfon insecticide in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Chemosphere**. v.64, 2006.

NIKOLSKY, E. E. **Depression of miniature endplate potential frequency by acetylcholine and its analogues in frog**. Kazan, Republic of Tatarstan, U.S.S.R., 1991.

OGA, S. et al. **Fundamentos de Toxicologia**. Atheneu Editora, São Paulo, v.3, 2008.

POTENZA, M. R., et al. **Avaliação De Produtos Naturais Irradiados Para o Ccontrolle De *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae)**. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.71, n.4, p.485-492, out./dez., 2004)

SANTOS, et al. **Compostos Organofosforados Pentavalentes: Histórico, Métodos Sintéticos de Preparação e Aplicações como Inseticidas e Agentes Antitumorais**. Quim. Nova, v.30, n°.1, 159-170, 2007.

SAKATE, M.; OLIVEIRA, P.C.L. Toad envenoming in dogs: effects and treatment. **Journal Venomous Animals and Toxins**. v.6, n.1, p.1-7, 2000.

SERRA-FREIRE, N. M. Protozoários parasitos de baratas: mais um problema no controle da *Periplaneta americana*. **Vetores & Pragas**. v.2, n.5, p.16-19, 1999.

<http://www.brumadinhotour.com.br/pordentrodovale/sapocururu.php>

[http://www.insect.cz/details.php?  
image\\_id=2226&sessionid=182df16fa46fd251feca2c7c1b8e346a&l=arabic](http://www.insect.cz/details.php?image_id=2226&sessionid=182df16fa46fd251feca2c7c1b8e346a&l=arabic)

[http://www4.icmbio.gov.br/ran/index.php?id\\_menu=124&id\\_arq=30](http://www4.icmbio.gov.br/ran/index.php?id_menu=124&id_arq=30)  
<http://www.netdrugs.info/dci/epine.shtml>

<http://www.anvisa.gov.br>