

Toxicidade Aguda e Alterações Comportamentais induzidas pela Fração de Alcalóides Totais das Vagens de *Prosopis juliflora* (Sw) D.C. (Leguminosae) em Roedores

Lucindo José QUINTANS-JÚNIOR¹, Reinaldo Nóbrega de ALMEIDA^{1*}, José Maria BARBOSA-FILHO¹, José Crispim DUARTE¹ & Ivon Macedo TABOSA²

¹ Laboratório de Tecnologia Farmacêutica - Universidade Federal da Paraíba.
Caixa Postal 5009, CEP 58051-970, João Pessoa, Paraíba-PB, Brasil

¹ Centro de Saúde e Tecnologia Rural - Universidade Federal da Paraíba.
Caixa Postal 64, CEP 58700-000, Patos, Paraíba-PB, Brasil

RESUMO. *Prosopis juliflora* (Sw) D.C. (Leguminosae) popularmente conhecida como “algaroba” é um arbusto encontrado no Nordeste brasileiro que em estudos preliminares com a fração de alcalóides totais das vagens de *P. juliflora* (FAT) apresentou alterações sugestivas de uma ação no sistema nervoso central (SNC). No presente trabalho foi determinada a toxicidade aguda (DL₅₀) e avaliadas as possíveis alterações comportamentais da FAT em roedores. A FAT apresentou uma DL₅₀ por via intraperitoneal (i.p.) de 10,3 (7,9 - 12,7) mg/kg e por via oral (v.o.) 637,0 (501,4 - 772,8) mg/kg. Na triagem comportamental em camundongos a FAT (2 mg/kg, i.p. e 62,5 mg/kg, v.o.) induziu um aumento da ambulação, irritabilidade e piloereção. Além disso, na dose de 62,5 mg/kg (v.o.) aumentou significativamente ($p < 0,05$) o tempo de permanência na barra do *rota-rod* e os comportamentos de limpeza e ambulação no teste do *open-field*. No teste do labirinto em cruz elevado aumentou de forma significativa ($p < 0,05$) o tempo de permanência e o número de entradas nos braços fechados e ainda diminuiu o número de entradas nos braços abertos. De acordo com os resultados obtidos pode-se sugerir que a FAT apresentou uma toxicidade aguda elevada e, ainda, demonstrou alterações comportamentais sugestivas de um possível efeito ansiogênico.

SUMMARY. “Acute toxicity and behavioral changes induced by total alkaloids fraction of the pods of *Prosopis juliflora* (Sw) D.C. (Leguminosae) in rodents”. *Prosopis juliflora* (Sw) D.C. (Leguminosae), popularly known as “algaroba” is a shrub widely found in Brazilian Northeast. In preliminary studies the total alkaloids fraction (FAT) of the pods of *P. juliflora* caused behavioral changes, suggesting some effect in the Central Nervous System (CNS). The aim of this work was to determinate the acute toxicity (LD₅₀) and evaluate possible behavioral changes promoted by FAT in rodents. FAT showed a LD₅₀ of the 10.3 (7.9 - 12.7) mg/kg (i.p.) and 637.0 (501.4 - 772.8) mg/kg (p.o.). Behavioral screening of FAT in mice (2 mg/kg, i.p and 62.5 mg/kg, p.o.) showed increased ambulation, piloerection and fight behavioral. In *rota-rod* and *open field* tests the FAT caused significant increasing ($P < 0.05$) of motor activity in the animals. In elevated plus-maze test increased significantly ($P < 0.05$) the period of permanence of the animals in closed arms. According to this behavioral changes it is possible to suggest an ansiogenic effect of FAT.

INTRODUÇÃO

Prosopis juliflora (Sw) D.C. (Leguminosae, Mimosaceae), conhecida popularmente como “algaroba” é um arbusto amplamente distribuído nas regiões áridas e semi-áridas do continente americano¹. No Brasil é muito encontrada na Região Nordeste², principalmente, no sertão e nos cariris paraibano devido ao seu alto valor nutricional e resistência a longos períodos de estiagem. Suas vagens são bastante palatáveis e

muito apreciada por bovinos e caprinos, como também são consumidos por populações humanas *in natura* ou em forma de bolos, tortas, doces e pães³. Estudos realizados com o extrato etanólico bruto das partes aéreas da *P. juliflora*, em camundongos, apresentaram algumas atividades farmacológicas, tais como: analgésica, abortiva e antiinflamatória⁴. Numa triagem psicofarmacológica preliminar a Fração de Alcalóides Totais das vagens de *Prosopis juliflora* apresen-

PALAVRAS-CHAVE: Algaroba, Campo aberto, Labirinto em cruz elevado, *Prosopis juliflora*, Rota-rod, Triagem comportamental.

KEY WORDS: Elevated plus-maze, Mesquite, Open-field, *Prosopis juliflora*, Rota-rod, Screening behavioral.

* Autor a quem a correspondência deverá ser enviada: E-mail: reinaldoan@uol.com.br

tou alterações comportamentais indicativa de uma possível ação no Sistema Nervoso Central (SNC) ^{3,5}.

O presente estudo objetivou determinar a toxicidade aguda e avaliar possíveis alterações comportamentais induzidas pela Fração de Alcalóides Totais das vagens de *Prosopis juliflora* (FAT) em roedores.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos machos Swiss, pesando entre 25 e 35 g e ratos machos Wistar, pesando entre 220 e 300 g, ambos com aproximadamente 3 meses de idade. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, a uma temperatura de 23 ± 2 °C, com ciclos de claro-escuro de 12 h, tendo a fase clara iniciando-se às 6 h e terminando às 18 h, com livre acesso a água e ração tipo "pellets" até 60 min antes dos experimentos. Todos os animais foram provenientes do biotério do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Material Botânico

As vagens da *P. juliflora* foram coletadas no município de Patos - Paraíba. Uma exsicata do material encontra-se depositado no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Básicas da Universidade Federal de Minas Gerais sob o registro BHCB 43784.

Preparação da Fração de Alcalóides Totais

Vagens secas e trituradas, pesando 20 kg, foram maceradas com etanol a 95%, a temperatura ambiente, por 72 h. Em seguida, o material foi filtrado e concentrado a vácuo a uma temperatura em torno de 50 °C fornecendo cerca de 2 kg do extrato etanólico bruto (EEB). O EEB foi tratado com uma solução de ácido clorídrico a 3% sob agitação mecânica e filtrado em celite, fornecendo uma parte insolúvel que foi descartada e uma aquosa ácida que foi extraída várias vezes com CHCl_3 . A fase aquosa ácida foi alcalinizada com NH_4OH até pH 8 e extraída com CHCl_3 até apresentar reação negativa com reagente de Drangendorff. A fase clorofórmica obtida em pH alcalino foi seca e concentrada à vácuo fornecendo a Fração de Alcalóides Totais das Vagens de *P. juliflora* (FAT), pesando 5 g (Rendimento de 0,025%).

Determinação da Toxicidade Aguda (DL_{50})

Este protocolo foi baseado no método descrito por Litchfield & Wilcoxon ⁶. A DL_{50} foi de-

terminada a partir da administração de diferentes doses da FAT, por via intraperitoneal (i.p.) e oral (v.o.), em grupos de 10 animais e o número de mortes foi registrado até 48 h após.

Triagem Farmacológica Comportamental

Neste método foi realizado o monitoramento de comportamentos, que na maioria das vezes são exibidos normalmente pelos animais, de forma que qualquer alteração no padrão normal de comportamento pode ser sugestiva de atividade no SNC ⁷. Camundongos foram divididos em grupos de 10 animais. No primeiro grupo (controle) administrou-se o veículo (solução ágar-ágar a 0,25% + uma gota de cremofor), enquanto que nos grupos experimentais administrou-se FAT (2 mg/kg, i.p. e 62,5 mg/kg, v.o.). Após 60 min do tratamento foram observadas as alterações comportamentais até 240 min.

Teste da Coordenação Motora

Foi utilizado neste protocolo o aparelho de rota-rod (Ugo Basile-7750, Itália), inicialmente descrito por Dunham & Miya ⁸. Foram divididos 4 grupos de camundongos (n = 10). No primeiro grupo administrou-se o veículo (controle), em outros dois a FAT nas doses de 2 mg/kg (i.p.) e 62,5 mg/kg (v.o.), e o último grupo foi tratado com anfetamina (5 mg/kg, i.p.). 60 min após os animais foram colocados no rota-rod e registrou-se o tempo de permanência do animal na barra giratória.

Teste do Campo Aberto

O aparelho utilizado no LTF/UFPB é semelhante ao descrito por Broadhurst ⁹ e posteriormente modificado por Carlini ¹⁰. Foram divididos 4 grupos de ratos (n = 10), no grupo controle administrou-se o veículo, nos experimentais FAT (2 mg/kg, i.p. e 62,5 mg/kg, v.o.) e no grupo padrão administrou-se PTZ (35 mg/kg, i.p.). Após 60 min dos respectivos tratamentos avaliou-se os seguintes comportamentos: ambulacção, levantar, limpeza e o número de bolos fecais. Cada animal permanecia no aparelho durante um período de 3 min de observação.

Teste de Esconder Esferas

O comportamento de esconder esferas de vidro distribuídas ao acaso numa superfície coberta por serragem pode demonstrar um perfil ansiogênico ou ansiolítico de uma droga ¹¹. Foram divididos 4 grupos de camundongos (n = 10), onde no primeiro administrou-se o veículo (controle), os grupos experimentais foram tratados com FAT (2 mg/kg, i.p. e 62,5 mg/kg, v.o.)

e no grupo padrão administrou-se PTZ (35 mg/kg, i.p.). Após 60 min as administrações os animais foram colocados individualmente, durante 15 min, em caixas recobertas por serragem com 25 esferas de vidro e posteriormente contabilizava-se o número de esferas escondidas.

Teste do Labirinto em Cruz Elevado

O Labirinto em Cruz Elevado utilizado é semelhante ao descrito por Pellow *et al.*¹² e Lister¹³, que foi desenvolvido a partir de um modelo criado por Montgomery¹⁴. Foram constituídos 4 grupos de ratos (n = 10), sendo que no primeiro administrou-se o veículo, outros 2 grupos foram tratados com a FAT nas doses 2 mg/kg (i.p.) e 62,5 mg/kg (v.o.) e no último grupo (padrão) administrou-se o PTZ (35 mg/kg; i.p.). Após 60 min das administrações os animais foram colocados individualmente no labirinto por um período de 3 min para cada animal, registrando-se o número de entradas nos braços abertos/fechados e o respectivo tempo de permanência.

Análise Estatística

Os dados obtidos foram avaliados através do teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Dunnett. Os dados experimentais foram comparados com os do grupo controle. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Determinação da Toxicidade Aguda (DL₅₀)

A DL₅₀ calculada para FAT, com limite de confiança de 90%, por via intraperitoneal foi de 10,3 (7,9-12,7) mg/kg e por via oral 637,0 (501,4-772,8) mg/kg.

Triagem Farmacológica Comportamental

Os animais tratados com FAT (2 mg/kg, i.p.e 62,5 mg/kg, v.o.) apresentaram as seguintes alterações comportamentais: ptose, pilo-

reção, levantar, hiperatividade, irritabilidade e tremores.

Teste da Coordenação Motora

A Figura 1 mostra que a FAT na dose de 62,5 mg/kg (v.o.) aumentou significativamente ($p < 0,05$) o desempenho dos animais na barra giratória do aparelho, o que não ocorreu com os animais que receberam FAT na dose de 2 mg/kg (i.p.). A anfetamina (5 mg/kg, i.p.) melhorou de forma significativa ($p < 0,01$) a performance na barra do rota-rod.

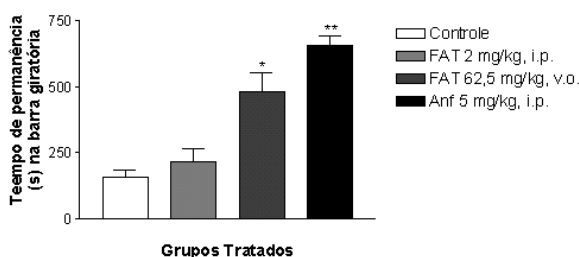


Figura 1. Efeito da FAT (2 mg/kg, i.p. e 62,5 mg/kg, v.o.) no teste da coordenação motora em camundongos. Os dados representam média ± e.p. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (ANOVA seguindo do teste de Dunnett).

Teste do Campo Aberto

A Tabela 1 mostra que a FAT na dose de 62,5 mg/kg (v.o.) induziu um aumento significativo ($p < 0,05$), em relação ao grupo controle, na ambulação e no comportamento de levantar. Com a dose de 2 mg/kg (i.p.) apenas o comportamento de levantar mostrou-se alterado de forma significativa ($p < 0,05$). O grupo tratado com PTZ (35 mg/kg, i.p.) aumentou de forma significativa ($p < 0,01$) a ambulação e o comportamento de levantar.

Teste de Esconder Esferas

Os dados da Figura 2 demonstram que a FAT, por via oral, na dose de 62,5 mg/kg aumentou significativamente ($p < 0,05$) o número

Grupo	Dose (mg/kg)	Via	Parâmetros do campo aberto (média ± e.p.)			
			ambulação	levantar	Limpeza	defecação
Controle	-	i.p.	12,4 ± 1,3	5,0 ± 1,2	1,6 ± 0,5	3,5 ± 0,6
FAT	2	i.p.	21,5 ± 4,5	12,5 ± 3,0 ^a	3,9 ± 1,1	1,2 ± 0,5
FAT	62,5	v.o.	25,3 ± 2,0 ^a	11,9 ± 1,6 ^a	2,6 ± 0,5	4,6 ± 0,7
PTZ	35	i.p.	28,9 ± 2,4 ^b	18,3 ± 2,3 ^b	1,8 ± 0,4	3,0 ± 0,9

Tabela 1. Efeito do tratamento agudo de FAT no teste do campo aberto com ratos. n = 10. ^a $p < 0,05$ (ANOVA seguindo do teste de Dunnett). ^b $p < 0,01$ (ANOVA seguida do teste de Dunnett).

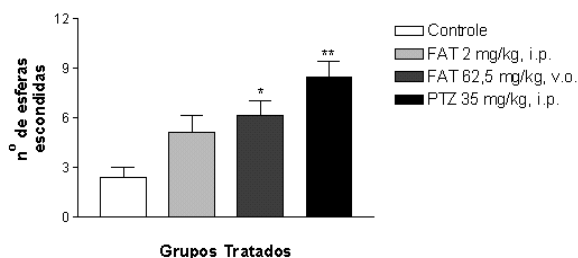


Figura 2. Efeito da FAT (2 mg/kg, i.p. e 62,5 mg/kg, v.o.) no teste de esconder esferas em camundongos. Os dados representam média ± e.p.

* p < 0,05 e ** p < 0,01 (ANOVA seguindo do teste de Dunnett).

de esferas escondidas, entretanto, não produziu nenhuma alteração na dose 2 mg/kg (i.p.). De qualquer maneira, a administração com o PTZ 35 mg/kg (i.p.) aumentou significativamente (p < 0,01) este parâmetro.

Teste do Labirinto em Cruz Elevado

O tratamento com a FAT na dose 62,5 mg/kg (v.o.) diminuiu significativamente (P < 0,05) o número de entradas nos braços abertos (Tabela 2), bem como no tempo de permanência. A FAT (2 mg/kg, i.p.) não apresentou nenhuma alteração. Entretanto, nos braços fechados, a FAT aumentou de forma significativa (p < 0,05) o tempo de permanência, sem promover mudanças significativas no número de entradas.

DISCUSSÃO

A determinação da DL₅₀ foi realizada objetivando-se a obtenção de doses seguras para a utilização nas metodologias experimentais. A FAT de *P. juliflora* apresentou uma toxicidade aguda calculada de 10,3 (7,9 ± 12,7) mg/kg (i.p.) e 637,0 (501,4 ± 772,8) mg/kg (v.o.). Estes resultados indicam que a FAT apresenta uma toxicidade aguda bastante elevada, principalmente quando administrada intraperitonealmente, o que é compatível com resultados anteriores^{3,15}.

Além disso, Tabosa *et al.*²⁴ tem demonstrado que os efeitos tóxicos de *P. juliflora* são atribuídos possivelmente a existência de alcalóides aporfínicos.

Na realização da triagem comportamental, seguindo o modelo descrito por Almeida *et al.*⁷, foi observado que administrações da FAT (2 mg/kg, i.p. e 62,5 mg/kg, v.o.) promoveram alterações comportamentais semelhantes as apresentadas por drogas psicoestimulantes (anfetamina e cocaína), tais como: aumento da ambulação, irritabilidade e hiperatividade^{16,17}.

No teste da coordenação motora (*“rota-rod”*) onde se procura analisar um possível efeito neurotóxico, caracterizado por um relaxamento muscular¹⁸. A FAT demonstrou na dose 62,5 mg/kg (v.o.) um aumento significativo (p < 0,05) do tempo de permanência na barra, semelhante ao ocorreu com a anfetamina (5 mg/kg, i.p.) que é um potente estimulante do SNC¹⁹.

O campo aberto (*“open-field”*) é uma metodologia que possibilita avaliar a “emocionalidade” do animal, pois sabe-se que a ambulação e o comportamento de levantar sejam atividades ligadas, principalmente, a uma boa coordenação motora, enquanto que o comportamento de limpeza e a defecação estejam associados muito mais ao estado emocional do animal²⁰. Contudo, alguns autores não relacionam a modificação deste parâmetro com efeito no SNC²¹. A FAT na dose de 62,5 mg/kg (v.o.) induziu um aumento significativo da ambulação e do comportamento de levantar, entretanto, na dose 2 mg/kg (i.p.) apenas o comportamento de levantar alterou de forma significativa que são características semelhantes ao apresentado por drogas estimulantes motoras.

O comportamento de esconder esferas de vidro, segundo alguns autores é um parâmetro na avaliação de níveis de ansiedade em animais,

Grupo	Dose (mg/kg)	Via	Braços Abertos		Braços Fechados	
			N° de entradas ^a	Tempo de permanência ^a	N° de entradas ^a	Tempo de permanência ^a
Controle	-	i.p.	3,8 ± 0,4	41,9 ± 8,6	3,5 ± 1,2	69,0 ± 26,8
FAT	2	i.p.	1,5 ± 0,5	23,9 ± 9,2	2,7 ± 1,8	127,6 ± 30,5 ^b
FAT	62,5	v.o.	0,6 ± 0,3 ^b	13,7 ± 5,1 ^c	2,9 ± 1,7	132,9 ± 39,2 ^b
PTZ	35	i.p.	0,5 ± 0,2 ^b	7,8 ± 2,9 ^c	1,8 ± 0,7	148,0 ± 27,8 ^b

Tabela 2. Efeito do tratamento agudo de FAT no teste do labirinto em cruz elevado em ratos.

^a Os valores estão expressos em média ± e.p. ^b p < 0,05 (ANOVA seguida do teste de Dunnett).

^c p < 0,01 (ANOVA seguida do teste de Dunnett).

além disso, sabe-se que drogas ansiogênicas aumentam este comportamento ^{11,22}. A FAT (62,5 mg/kg, v.o.) aumentou significativamente o número de esferas escondidas em relação ao grupo controle, semelhante ao que ocorreu com o grupo tratado com PTZ (35 mg/kg, i.p.). Além disso, o aparecimento de alterações comportamentais como irritabilidade e hiperatividade observados na triagem psicofarmacológica que são características de drogas ansiogênicas como o pentilenotetrazol e picrotoxina ²³ podem demonstrar um possível efeito ansiogênico da FAT de *P. juliflora*.

Validado por Pellow *et al.* ¹² o labirinto em cruz elevado (“*elevated plus-maze*”) é uma das metodologias mais importantes na avaliação de drogas que atuam modificando os níveis de ansiedade e baseia-se no medo inato e no comportamento natural exploratório de ratos e camundongos ²³. Sabe-se que drogas ansiogênicas aumentam o número de entradas e o tempo de permanência nos braços fechados do labirinto ^{12,13}. A FAT na dose de 62,5 mg/kg (v.o.) diminuiu o número de entrada e o tempo de per-

manência nos braços abertos, bem como aumentou o tempo de permanência nos braços fechados, caracterizando um possível efeito ansiogênico, enquanto que na dose de 2 mg/kg (i.p.) houve um aumento significativo em relação ao grupo controle do tempo de permanência nos braços fechados.

De acordo com os resultados obtidos pode-se sugerir que os tratamentos com a fração de alcalóides totais das vagens de *Prosopis juliflora* (FAT) apresentou uma toxicidade aguda elevada e, ainda, demonstrou alterações comportamentais sugestivas de um possível efeito ansiogênico. Contudo, os resultados são preliminares sendo necessário um amplo estudo fitoquímico, bioquímico e farmacológico para qualificar melhor os efeitos encontrados.

Agradecimentos. Os autores agradecem a R.N.S. Filho pelo apoio técnico. A contribuição da Universidade Federal de Minas Gerais e ao Centro de Saúde Tecnologia Rural da Universidade Federal da Paraíba pelo valioso auxílio na complementação do projeto. Ao CNPq pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Mendes, B.V. (1986) Alternativas tecnológicas para a agropecuária do semi-árido. Ed Nobel, 2a edição, pp 15-32.
- Franco, H.F. (1984) *Rev. Brasil. Extensão Rural* **5**: 7-11, abril/maio/junho.
- Tabosa, I.M., L.J. Quintans-Júnior, F.V. Pamplona, R.N. Almeida, E.V.L. Cunha, M.S. Silva, J.C. Ouza & J.M. Barbosa-Filho (2000) *Rev. Brasil. Farmacognosia* **9/10**: 11-22.
- Dhawan, B.N., G.K. Pat Naik, R.P. Ratogi, K.K. Singh & J.S. Tandon (1977) *Indian J. Exp. Biol.* **15**: 208-19.
- Quintans-Júnior, L.J., R.N. Almeida, J.M. Barbosa-Filho, I.M. Tabosa & A.C.G.M. Falcão (1998) Avaliação da toxicidade aguda e da atividade psicofarmacológica da fração de alcalóides totais das vagens (FAV) de *Prosopis juliflora* (Sw) D.C. *Livro de Resumos da XIV Reunião Anual da FeSBE*, R 12.024, pp 100.
- Litchfield, L.T & F. Wilcoxon (1949) *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **19**: 388-97.
- Almeida, R.N., A.C.G.M.Falcão, R.S.T. Diniz, L.J. Quintans-Júnior, R.M. Polari, J.M. Barbosa-Filho, M.F.Agra, J.C. Duarte, C.D. Ferreira, A.R. Antonioli & C.C. Araújo (1999) *Rev. Brasil. Farm.* **80**: 72-6.
- Dunham, N.W. & T.S. Miya (1957) *J. Amer. Pharm. Assoc.* **46**: 253-9.
- Broadhurst, P.L. (1960) *Experiments in psychogenetics*. In: *Experiments in Personality* (H.J. Eysenk, ed.). Rutledge and Kegan Paul, London, pp 125.
- Carlini, E.A. (1973) *Farmacologia prática sem aparelhagem*. Savier, Editora de Livros Médicos Ltda, São Paulo, pp145-197.
- Treit, D., J.P. Pinel & H.C. Fibiger (1981) *Pharmacol. Biochem. Behavior* **15**: 619-26.
- Pellow, S., P. Chopin, S.E. File & M. Briley (1985) *J. Neurosci. Meth.* **14**: 149-67.
- Lister, R.G. (1987) *Psychopharmacol.* **92**: 180-5.
- Montgomery, K.C. (1955) *J. Comp.Physiol. Psychol.* **48**: 254-60.
- Quintans-Júnior, L.J., R.N. Almeida, E.V.L. Cunha, F.V. Pamplona & J.M. Barbosa-Filho (1998) Os efeitos tóxicos da algaroba (*Prosopis juliflora*) em bovinos podem estar quimicamente relacionados com os alcalóides piperidínicos. *Livro de Resumos da XV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil*, R 03.111, pp 144.
- Inaba, D.S. & W.E. Cohen (1978) *Drogas estimulantes, depressores, alucinógenos: efeito fisi-*

- cos e mentais das drogas psicoativas*. Trat. de Hélio Pólcoa. Rio de Janeiro, pp. 11-71.
17. Masur, J. & E.A. Carlini (1989) *Drogas:subsídios para uma discussão*. Editora Brasiliense, 2a edição, São Paulo, pp 27-48.
 18. Morais, L.C.S.L., J.M. Barbosa-Filho & R.N. Almeida (1998) *J. Ethnopharmacol.* **62**: 57-61.
 19. Almeida, R.N., M.L.V. Seabra, D.S. Eidman, K. Fujita, R. Andreatini, M.N. Shiotsuki, A.R. Silva-Filho & E.A. Carlini (1992) *Rev. Brasil. Farm.* **73**: 37-42.
 20. Bueno, O.F.A., E.A. Carlini, J.R. Leite, N.G. Silveira-Filho, M.L.O. Souza & S. Tufik (1984) *J. Brasil. Psiquiatria.* **33**: 266-78.
 21. Carlini, E.A. & V. Burgos (1979) *Rev. Assoc. Brasil. Psiquiatria* **1**: 25-31.
 22. Broekkamp, C.L., H.W. Rijik, D. Joly-Gelouin & K.L. Lloyd (1986) *Eur. J. Pharmacol.* **126**: 223-9.
 23. Carvalho, J.G.B. (1998) *Diferenças na Aquisição e Extinção de Medo Condicionado entre Ratos Selecionados como "Ansiosos" e "Não-ansiosos" no Labirinto em Cruz Elevado*. São Paulo, Brasil [Dissertação de Tese - Mestrado - Escola Paulista de Medicina]
 24. Tabosa, I.M., J.C.A. Souza, D.L. Graça, J.M. Barbosa-Filho, R.N. Almeida & F. Riet-Correa (2000) *Vet. Hum. Toxicol.* **42**: 155-58.