UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Silvia Helena dos Santos Moreira

**Análise espectral da atividade elétrica cerebral de equinos
submetidos à cafeína.**

Pirassununga
2013

Silvia Helena dos Santos Moreira

**Análise espectral da atividade elétrica cerebral de equinos
submetidos à cafeína.**

(Versão corrigida)

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ernane José Xavier Costa

Pirassununga

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo

Moreira, Silvia Helena dos Santos
M838a Análise espectral da atividade elétrica cerebral de
equinos submetidos à cafeína / Silvia Helena dos Santos
Moreira. -- Pirassununga, 2013.

63 f.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Ciências Básicas.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade
Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ernane José Xavier Costa.

1. EEG 2. doping 3. Espectro de
potência. I. Título.

DEDICATÓRIA

Ao meu Pai Eufrozino (in memórian) dedico com muito amor essa vitória conquistada, a minha mãe Maria pela sua simplicidade e inestimável presença, aos meus imprescindíveis filhos Filippe, Vitória e Camila pela tolerância em ceder a mãe aos ofícios do estudo e acima de tudo meu marido Cássio por todo o apoio e amor.

AGRADECIMENTOS

A essência divina provedora de minha fé.

Ao Prof. Dr. Ernane José Xavier Costa, pela enorme contribuição a minha formação acadêmica, pela confiança em mim depositada e pela sua amizade.

Ao especialista do laboratório LAFAC, Aldo Ivan Céspedes Arce, pelo grande auxílio na execução do Projeto, pelas valiosas correções e pela boa amizade.

Ao Prof. Dr. Alexandre Gobesso e sua equipe pela grande contribuição no experimento.

Aos amigos do LAFAC que me acompanharam durante todo o desenvolvimento deste projeto.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A compaixão pelos animais está intimamente ligada à bondade de caráter, e pode ser seguramente afirmado que quem é cruel com os animais não pode ser um bom homem.

Arthur Schopenhauer

RESUMO

MOREIRA, S. H. S. Análise espectral da atividade elétrica cerebral de equinos submetidos à cafeína. 2013. 63 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

A cafeína é um potente estimulante do sistema nervoso central dos animais e vem sendo usada para melhorar o desempenho de cavalos atletas devido a sua propriedade de estímulo da atividade motora e redução da fadiga muscular. O objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil eletroencefalográfico de equinos submetidos a cafeína comercial utilizando eletrodos de superfície e biotelemetria. Foram utilizados dois protocolos experimentais. No primeiro protocolo dois equinos (A e B) foram submetidos a cafeína comercial e no segundo protocolo dois animais controle (C e D) foram submetidos a um placebo com solução fisiológica. O EEG obtido dessas situações foi analisado no ambiente Matlab® onde se avaliou os espectros de potência. Os dados foram analisados por One-way ANOVA valores de $p < 0,05$ usando vários testes estatísticos. A análise do espectro resultante mostrou predominância de frequências nas faixas de 20 Hz e 35 Hz para o animal A; 15 Hz, 20 Hz e 25 Hz para o animal B, essas frequências foram verificadas nos animais antes de serem submetidos à cafeína; quando foram submetidos à cafeína foi observado um pico predominante em 10 Hz em ambos indivíduos. Para os animais controle, a frequência observada foi de 15 Hz e 25 Hz para o animal C e para o animal D as frequências foram 15 Hz, 20 Hz, 30 Hz e 35 Hz. Para ambos os animais submetidos à cafeína os resultados estatísticos comprovaram que houve diferenças entre as médias da densidade espectral de potência dos sinais adquiridos. Para os animais que foram submetidos ao placebo os testes estatísticos demonstraram que não houve diferenças das médias dos espectros constatando que a aplicação do placebo não teve efeito na atividade elétrica cerebral nos equinos estudados. Conclui-se que o EEG registrou um padrão diferenciado para os animais que foram submetidos à cafeína.

Palavras-chave: EEG; doping; espectro de potência.

ABSTRACT

MOREIRA, S. H. S. Spectral analysis of brain electrical activity of horses subjected to caffeine. 2013. 63 f. Dissertation (Master's degree) Faculty of Animal Science and Food Engineering – University of São Paulo, Pirassununga, 2013.

Caffeine is a powerful stimulant of the central nervous system of animals and has been used to improve performance in athletic horses due to its property of stimulating motor activity and reduced muscle fatigue. The aim of this study was to evaluate the electroencephalographic pattern of horses undergoing caffeine by the use of surface electrodes and biotelemetry system. Two experimental protocols were carried out. In the first protocol two horses (A and B) were submitted to commercial caffeine and in the second protocol two control horses (C and D) were submitted to a saline placebo. The EEG was obtained and analyzed in Matlab® by evaluating the power spectra. Data were analyzed by one-way ANOVA with p-value <0.05 using several statistical tests. The results of spectrum analysis showed predominance of frequency bands from 20 Hz to 35 Hz for animal A and 15 Hz, 20 Hz and 25 Hz for animal B; these frequencies were observed in the animals before being subjected to caffeine; when they were submitted to caffeine it was observed a predominant peak at 10 Hz in both individuals. For animals used as control the observed frequency was 15 Hz and 25 Hz for animal C; for animal D frequencies were 15 Hz, 20 Hz, 30 Hz and 35 Hz. For both animals submitted to caffeine statistical results showed that there were differences between the means of the power spectral density of signals acquired. For animals that underwent placebo saline statistical tests showed no differences of mean spectra stating that the application of placebo had no effect on brain electrical activity studied in horses. Overall results had shown that the EEG pattern was influenced by caffeine.

Keywords: EEG; doping, power spectrum

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Sistema de transporte ativo na membrana plasmática na célula animal	17
Figura 2 - Canais iônicos de entrada abertos por voltagem produzem os potenciais de ação dos neurônios	18
Figura 3 - Movimentação de elétrons (e-) na direção oposta da corrente do eletrodo e Cátions (C+) movendo-se na direção da corrente	23
Figura 4 – Corte paramediano da cabeça do Equino, enfatizando a parte encefálica	25
Figura 5 – Região da frente do animal indicando o melhor ponto de posicionamento dos eletrodos.....	27
Figura 6 – Diagrama do conceito processamento digital de sinais	30
Figura 7 – Tela do Software de aquisição do sinal	33
Figura 8 – Posicionamento dos eletrodos na parte frontal do equino	34
Figura 9 – Diagrama de bloco do protocolo experimental	36
Figura 10 – Animais experimentais soltos no Piquet	36
Figura 11- Gráficos das médias dos espectros do animal A com e sem cafeína	40
Figura 12 - Gráficos das médias dos espectros do animal B com e sem cafeína	43
Figura 13 - Gráficos das médias dos espectros do animal C com e sem placebo	48
Figura 14 - Gráficos das médias dos espectros do animal D com e sem placebo	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de substâncias proibidas que aumentam o desempenho de animais atletas.....	28
Tabela 2 – Análise da intensidade espectral de potencia de trechos de 5 segundos de EEG livres de artefatos filtrados na banda de frequência alfa (8-12 Hz) e na banda total (02- 59 Hz) para o animal A.....	42
Tabela 3 - Analise da Integral da curva da densidade espectral de potencia de trechos de 5 segundos de EEG livres de artefatos na banda de frequência alfa (8-12 Hz) e na bandatotal (0.2-59 Hz) para o animal B.....	44
Tabela 4- Teste estatístico One Way Anova com análise de variância e comparação entre os grupos para o animal A solto banda alfa.....	46
Tabela 5 - Teste estatístico One Way Anova com análise de variância e comparação entre os grupos para o animal B solto banda alfa.....	47
Tabela 6 – Teste estatístico One Way Anova com análise de variância e comparação entre os grupos para o animal C.....	49
Tabela 7 - Teste estatístico One Way Anova com análise de variância e comparação entre os grupos para o animal D.....	51

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	Atividade elétrica cerebral e a Biossinalização de sinais nervosos	15
2.2	Cafeína como estimulante do sistema nervoso central	19
2.3	Eletroencefalograma (EEG)	21
2.4	O crânio eqüino	23
2.5	O sinal de EEG em eqüinos	25
2.6	Doping em eqüinos.....	27
2.7	Processamento digital de sinais	29
3	OBJETIVOS.....	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	O equipamento	32
4.2	Procedimento de acoplamento do equipamento no animal	33
4.3	Bioensaio.....	34
4.4	Processamento digital dos sinais	37
4.5	Análises estatísticas dos resultados.....	38
4.6	Protocolo do Comitê de Ética	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6	CONCLUSÕES	54
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1 INTRODUÇÃO

A partir da década de 80 as associações de esportes equestres passaram a exigir das autoridades o controle de ingredientes utilizados no balanceamento de rações oferecidas a cavalos de competição a fim de evitar que uma simples substância pudesse exceder os limites de tolerância preestabelecidos. Assim surgiram os limites analíticos quantitativos destinados a fontes de alimentação ou substâncias endógenas. O Termo de aceitação internacional *Threshold* é o limite de tolerância que é medido em massa da substância por ml de fluido biológico (HOUGHTON; MAYNARD, 2010).

O limite de tolerância (*Threshold*) é bem estabelecido para a composição da ração e para substâncias endógenas destinadas aos cavalos de corrida sendo que cada substância tem um *threshold* específico. O comitê de antidopagem da *International Federation of Horseracing Authorities* (IFHA) é o órgão oficial que define esses respectivos *thresholds*.

Durante as competições animais de corrida estão sujeitos a desgastes físicos, os quais podem causar sérios danos ao animal, no que diz respeito principalmente ao sistema locomotor (QUEIROZ et al, 2001).

Há anos estudam-se determinadas substâncias com o poder de estimular o desempenho físico, o uso dessas substâncias qualifica o “*Doping*”. Esse termo surgiu pela primeira vez em 1899 em um dicionário Inglês, com o significado “mistura de narcóticos”. O termo doping é definido como “a administração de qualquer substância em pessoas ou animais que possa modificar o seu comportamento durante uma prova desportiva” (CARDOSO; ROSSI, 2012).

Segundo Salvatori (1997) existe um consenso internacional sobre “doping”, cujo tema principal é evitar a vantagem ilícita, através de substâncias farmacologicamente ativas que potencialmente influenciariam no desempenho de animais de competição.

Políticas de controle antidoping em esportes equestres foram criadas para frear a desonestidade e os potenciais riscos à saúde dos animais de corrida (HOUGHTON; MAYNARD, 2010).

Nesse contexto nenhuma substância proibida deve ser encontrada em fluídos biológicos como sangue ou urina de animais de competição. Para Smith (2001) qualquer substância proveniente de plantas que possuam substâncias farmacologicamente ativas como alcalóides são tidos como uma fonte indesejável de droga.

No mundo dos eventos esportivos a cafeína tem sido utilizada como agente estimulante (doping), vale ressaltar que essa prática é ilegal e, portanto sua utilização passou a ser controlada. Por ser uma substância comum em alimentos, o uso da casca de cacau na ração de cavalos pode ser detectado em exames antidoping mesmo possuindo pequenas quantidades de cafeína, pois os efeitos da cafeína ou de seus derivados são facilmente detectados na urina, mesmo depois de um longo período de ingestão dessas substâncias (TOBIN, 2011).

A zootecnia aplicada à equideocultura visa melhorar a produtividade, o rápido desenvolvimento e animais mais fortes para fins esportivos, reprodução, exercício ou de trabalho. Para isto, desenvolve e melhora suplementos alimentícios. Tendo em vista que o cérebro é o primeiro órgão que responde a qualquer estímulo físico ou químico, a análise da atividade elétrica cerebral pode permitir identificar a presença de fármacos estimulantes do sistema nervoso central.

A utilização de métodos de monitoramento da atividade elétrica cerebral permite importantes investigações de mecanismos fisiológicos. O aumento ou a variação da atividade elétrica em determinadas áreas do cérebro pode ser detectado por inúmeras técnicas como tomografia por emissão de pósitrons (TEP), ressonância magnética funcional (RMf), medidas da atividade magnética cerebral (Magnetoencefalografia- MEG) e medidas da atividade elétrica cerebral (Eletroencefalograma - EEG), esse em especial é o gráfico resultante do registro da atividade elétrica cerebral, obtido através de eletrodos colocados na superfície do encéfalo (COSTA, 2000).

Os neurônios são células relacionadas com o mecanismo de controle do sistema biológico dos animais. A mais importante propriedade das células nervosas é a produção de sinais elétricos que funcionam como unidades de informação. Certos estímulos externos, ou até internos, podem provocar a abertura de canais moleculares embutidos na membrana plasmática, que seletivamente seleciona íons

de fora para dentro e vice-versa, ocorrendo assim à diferença de potencial na membrana, invertendo as cargas internas e externas. Esse fenômeno bioelétrico característico da célula nervosa é compreendido como impulso nervoso. Mediadores químicos os quais são armazenados nas vesículas dos axônios conhecidos como neurotransmissores são liberados nas fendas sinápticas após a mudança do potencial elétrico da membrana neuronal (SINGI, 2007).

No entanto a aquisição de sinais cerebrais em animais apresenta certas dificuldades técnicas, como por exemplo, o manejo animal. Segundo Brockway e Hassler (1993), a minimização e eliminação de fontes externas que possam causar estresse ao animal devem ser evitadas a fim de não comprometer a qualidade da captação dos sinais.

A aquisição dos dados do EEG com o uso da biotelemetria oferece a vantagem de trabalhar com o animal solto e sem contato humano. A radio-telemetria permite adquirir sinais biológicos de animais nessa situação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Atividade elétrica cerebral e a Bioassinalização de sinais nervosos

Os neurônios são unidades funcionais de informação, operam em grandes conjuntos e não isoladamente. Esses conjuntos de neurônios associados formam os chamados circuitos ou redes neurais. A maior diferença entre neurônios e as demais células do organismo animal é sua morfologia adaptada para processamentos de informações. Nesse sentido, o neurônio é o principal centro de controle das funções do cérebro, dentre as inúmeras funções biológicas desempenhadas pelos neurônios a função de coordenar o funcionamento de outras células está em destaque, pois as respostas fisiológicas decorrem de um prévio estímulo que recebem dessa maquinaria fisiológica (LENT et al., 2005).

Um corpo neuronal apresenta inúmeros prolongamentos ramificados, são os dendritos e é neles que cada neurônio recebe informação proveniente dos demais neurônios a que se associa. Um prolongamento mais longo e fino, ramificando-se pouco no trajeto e muito na porção terminal é conhecido como axônio ou fibra nervosa. Cada neurônio tem apenas um único axônio; é através dele que saem as informações dirigidas às demais células de circuito neuronal e todas as saídas de informação da célula são concentradas no axônio, porém devem ser veiculadas a muitos outros neurônios do circuito para conduzir sinais elétricos com a maior velocidade possível. A porção terminal de um axônio em contato com um dendrito constitui-se uma sinapse (SINGI, 2007).

Segundo Nelson e Cox (2006) o estudo da transmissão de sinais nervosos é um dos exemplos de mecanismos de sinalização das células através da membrana plasmática. Esses sinais atuam como receptores de informação, avaliando as condições de pH, a pressão osmótica, a disponibilidade de alimento, oxigênio e luz e quanto a presença de químicos nocivos é através desses sinais que respostas apropriadas serão geradas. A conversão da informação gerando como resultado uma alteração química é conhecida como transdução de sinal, fenômeno comum a todas as células vivas.

As células eucarióticas possuem seis tipos gerais de mecanismos de

sinalização: receptores enzimáticos; proteínas de membrana que atuam por meio de proteína G, proteínas nucleares que se ligam a esteróides e atuam como fatores de transcrição; proteínas de membrana que atraem e ativam proteínas quinases solúveis; receptores de adesão que transportam a informação entre matriz extracelular e o cito esqueleto e os canais iônicos de entrada. A excitabilidade das células sensoriais, neurônios e miócitos são dependentes de canais iônicos que são abertos ou fechados, ou seja, são regulados pela movimentação de íons inorgânicos como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^- , através da membrana plasmática em resposta a vários estímulos. Os canais de íons de sódio das membranas plasmáticas dos neurônios são sensíveis a variações nos gradientes elétricos e respondem abrindo ou fechando os canais de sódio, esse mecanismo é à base da sinalização dos neurônios (NELSON; COX, 2006).

Em toda célula animal a concentração do Na^+ é menor dentro da célula, enquanto que do K^+ é maior. Esse diferencial de concentração é estabelecido e mantido por um sistema de transporte ativo primário na membrana plasmática. A enzima ATPase $\text{Na}^+ \text{K}^+$ está relacionada a quebra do ATP e a movimentação simultânea do Na^+ e do K^+ contra seus gradientes eletroquímicos. Para cada molécula ATP convertida em ADP e P_i , o transportador move dois íons K^+ para dentro e três íons de Na^+ . Essa enzima também é responsável pela geração do potencial transmembrana (-50 a -70 mV) que é fundamental para a condução dos potenciais de ação dos neurônios (Figura 1).

Figura 1- Sistema de transporte ativo na membrana plasmática na célula animal
 Fonte: NELSON; COX (2006).

A sinalização no sistema nervoso é realizada pela rede de neurônios, para que ocorra essa sinalização três tipos de canais iônicos de entrada abertos por voltagem são necessários. Por toda extensão do corpo neuronal estão os canais de Na^+ abertos por voltagem, que são fechados quando a membrana está em repouso ($V_m = -60 \text{ mV}$), entretanto abrem momentaneamente quando a membrana está despolarizada localmente em resposta à qualquer neurotransmissor. A despolarização induzida pela abertura dos canais de Na^+ induz o efluxo dos canais de K^+ que também são abertos por voltagem a se abrirem, como resultado desse mecanismo a membrana volta a ser polarizada (Figura 2).

Figura 2 – Canais iônicos de entrada abertos por voltagem produzem os potenciais de ação dos neurônios. Fonte: NELSON; COX (2006).

A membrana dos neurônios transporta o potencial de ação ao longo do axônio através de uma onda de despolarização (influxo de Na^+) seguido pela repolarização (efluxo de K^+). Com a chegada do potencial de ação o neurotransmissor é difundido para a célula pós-sináptica, liga-se aos receptores específicos da membrana e desencadeia a despolarização. Dessa Forma, a mensagem é passada a diante (NELSON; COX, 2006).

2.2 Cafeína como estimulante do sistema nervoso central

A cafeína é um estimulante metabólico do sistema nervoso central e vem sendo utilizada em equinos para reduzir a fadiga muscular e aumento do desempenho em cavalos atletas, porém a utilização dessa substância caracteriza o doping quer seja administrada através da alimentação ou por via intravenosa ou muscular. Conhecida quimicamente como 1,3,7 – trimetilxantina, pertence ao grupo metilxantinas classificadas como alcalóides, as quais são substâncias com capacidade de restauração ou excitação das funções cerebrais e bulbares e com alto poder de estímulo ao sistema nervoso central, podendo promover o aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial, proporcionando a redução da fadiga (cansaço) e conseqüentemente melhorando o desempenho mental e motor (SPRIET, 1995).

Na América do sul as plantas produtoras de substâncias alcalóides com efeito estimulante são bem conhecidas e popularmente consumidas. O café (*Coffea arabica*) é o que tem maior concentração da substância, porém outras plantas apresentam a cafeína em sua estrutura como, por exemplo, o guaraná (*Paullinia cupana*), o chocolate (*Theobroma cacao*), a cola (*Cola acuminata*) e na erva-mate (*Ilex paraguariensis*).

Para Spinosa, Gorniak e Bernardi (1999) a cafeína é absorvida em pequenas quantidades e possui um efeito estimulante leve, útil no aumento da atividade motora reduzindo a fadiga e levando o animal a um estado de alerta mental. A ocorrência de diferenças individuais na sensibilidade aos efeitos psicotrópicos da cafeína também foi relatada.

A cafeína é altamente solúvel em lipídios e conseqüentemente chega rapidamente à barreira hemato-cerebral (MAC CALL; MILLINGTON; WURTEMAN, 1982).

Um estudo realizado com ratos para testar as concentrações de cafeína no líquido cefalorraquidiano determinou que a cafeína atinge metade do seu nível no plasma entre 4 e 8 minutos e a concentração fica estável pelo menos por um período de uma hora (THITHAPANDHA; MALING; GILLETTE, 1972).

O efeito da cafeína sobre os neurotransmissores tem sido objeto de intenso estudo, entretanto pouco se sabe sobre a concentração limiar de cafeína necessária para induzir alterações no metabolismo dos neurônios. Estudos com ratos sugerem que alguns efeitos de metilxantinas estão relacionados com a maior liberação de catecolaminas (ATKINSON; ENSLEN, 1976), essas substâncias são responsáveis pelo aumento da liberação de neurotransmissores.

Para Kaplan et al., (1989) as concentrações de cafeína no plasma e no cérebro são proporcionais à dose administrada uma hora antes, esta relação de dose administrada é altamente significativa.

Quanto ao efeito na atividade elétrica cerebral acredita-se que a cafeína produz efeito estimulante no sistema nervoso central mediante o aumento da vigilância e diminuição do cansaço eletrofisiológico (SPINOSA; GORNIK; BERNARDI, 1999).

Um estudo realizado em gatos constatou que a atividade elétrica cerebral é estimulada pela administração intravenosa de 10-100 mg/Kg de cafeína (ARUSHANIAN; BELOZERTSEV, 1978).

Já estudos com ratos in vitro testaram a cafeína e outras metilxantinas e comprovaram a elevação da excitabilidade dos animais (GREENE; HAAS; HERMANN, 1985). Outro estudo realizado também em ratos testou doses diárias de 60-75 mg/Kg e constatou aumento da atividade locomotora, nesse estudo também ficou comprovado que mesmo aumentando a dose de cafeína não alterou o evento observado com as doses iniciais (HOLTZMAN; MANTE; MINNEMAN, 1991).

Misra, Vadlamani e Pontani (1984) investigaram o efeito de doses diferenciadas de cafeína no sistema locomotor de ratos e constataram que doses de até 20 mg/Kg de cafeína provocou um aumento na atividade motora, por outro lado doses mais elevadas de 50-100 mg/Kg não produziu nenhum efeito estimulante na atividade locomotora dos ratos. Para Thithapandha, Maling e Gillette (1972) quanto maior a dose de cafeína, maior pode ser o atraso da resposta motora.

Dixit, Vaney e Tandon (2006) realizaram um estudo em humanos testando a dosagem de 3 mg/Kg de cafeína diluídos em 100 mL de água, os resultados da pesquisa indicaram que a cafeína atuou como um facilitador das informações a serem processadas bem como nas atividades motoras.

Em humanos há muitas divergências quanto ao efeito da cafeína no sistema nervoso central, um estudo verificou a dosagem de 200 mg de cafeína em doze homens adultos e constatou diminuição na energia do EEG em condições de repouso porém outros estudos atestam que a cafeína pode aumentar a energia do EEG. Essa discrepância nos resultados encontrados para o mecanismo de ação da cafeína no sistema nervoso central pode ser devido às diferenças na dose administrada, o tempo de gravação e métodos de análise do EEG (POLLOCK et al., 1981). Entretanto para Stavric e Gilbert (1990) nenhuma espécie de animal metaboliza cafeína como os humanos.

Queiroz et al. (2001) testou diferentes doses de cafeína em cavalos para determinar os efeitos da cafeína no sistema locomotor de equinos e constatou que a menor dose efetiva é de 2,5 mg/Kg para produzir atividade locomotora espontânea nos equídeos experimentais após cinco minutos da aplicação e se manteve por até uma hora, nesse estudo foi constatado que o efeito da cafeína tem seu pico de 5 a 25 minutos após a administração e depende da dose administrada.

Outro estudo realizado por Ferraz et al. (2008) testou a administração intravenosa da dosagem de 5 mg/Kg de cafeína em 12 cavalos adultos submetidos a um teste de exercício incremental (IET) em uma esteira e os autores concluíram que a dosagem utilizada foi suficiente para melhorar o desempenho dos animais durante o teste.

2.3 Eletroencefalograma (EEG)

O eletroencefalograma (EEG), quando faz uso de eletrodos de superfície é a principal fonte de informação obtida de forma não invasiva para registrar a atividade elétrica cerebral, quando ocorre à liberação dos neurotransmissores, as correntes elétricas geradas na membrana do neurônio são captadas por eletrodos que estão fixados no crânio do animal. O EEG tem sido usado para inúmeras finalidades, como

interface cérebro computador (BCI – Brain Computer Interface) em indivíduos com relevantes danos motores (COSTA; CABRAL, 2000), para estudos de comportamento e monitoramento de bovinos (SILVA, 2005) e como método de análises sensorial de alimentos (HASHIDA et al., 2005) e em quadros de epilepsia (KOTAGAL; YARDI, 2008) e mais recentemente em parâmetros eletroencefálicos de ratos (FERRARI, 2008).

O padrão de atividade elétrica cerebral não é obtido através do nível total da atividade elétrica do encéfalo e sim pelo número de neurônios que disparam em sincronismo. O EEG representa a atividade elétrica cerebral com característica oscilatória e contínua, sendo que a atividade oscilatória é dependente do nível de atividade do cérebro. Diante de tal fato nenhum padrão pode ser definido levando em conta a variação do EEG na escala do tempo (COSTA, 2000). Entretanto pessoas normais podem apresentar durante o sono padrões no domínio do tempo que permitem identificar distúrbios mentais como epilepsia e o mal de Parkinson (KELLAWAY; PETERSEN, 1976).

O sistema eletrônico de aquisição de sinais cerebrais é formado por amplificadores de instrumentação e filtros ativos que amplificam sinais da ordem de $1 \mu\text{V}$. Esse equipamento pode possuir até 256 canais, onde um par de eletrodos corresponde a um canal, esse sistema contém também um eletrodo de referência (terra). Todos os canais estão ligados ao sistema de amplificação eletrônica (COSTA, 2000).

A captação do EEG é feita através de eletrodos, que atuam como transdutores que transformam uma corrente iônica no cérebro em uma corrente elétrica no aparelho medidor (WEBSTER, 1992; ASTON, 1995; TOAZZA, 1998). O método consiste no registro bipolar, destacando a diferença de potencial entre dois eletrodos que estão posicionados em locais onde ocorre atividade elétrica neuronal (MARTIN, 1991).

Os eletrodos compõem o sistema de captação do sinal biológico e funcionam como uma interface entre a superfície do escalpo do animal e o sistema eletrônico que irá medir o sinal. Os eletrodos são específicos para essa aplicação já que os sinais elétricos cerebrais apresentam características oscilatórias e amplitudes diferentes dos sinais elétricos provenientes do coração, com isso a escolha dos

eletrodos é fundamental para uma correta medida do sinal biológico. O contato entre eletrodo e o escalpo é mediado por um eletrólito, o qual forma uma interface entre o escalpo e o eletrodo. Essa relação entre aparelho medidor e eletrólito apresenta uma diferença de potencial própria de acordo com os tipos de materiais utilizados e podem ocorrer em função de dois fatores, temperatura e movimentação do eletrodo (COSTA; CABRAL, 2000). A figura 3 mostra o fluxo de corrente que atravessa a interface.

Figura 3 - Movimentação de elétrons (e^-) na direção oposta da corrente do eletrodo e Cátions (C^+) movendo-se na direção da corrente. Fonte: COSTA (2005).

2.4 O crânio equino

Segundo Costa (2000), o sinal elétrico cerebral possui amplitude reduzida e, portanto é muito comum a introdução de artefatos durante a coleta oriundos da movimentação do animal. O EEG também pode ser afetado por ruídos gerados por movimentos musculares que apresentam frequências dentro da faixa beta, na qual predominam frequências entre 0,5- 4 Hz (WEBSTER, 1992). Por isso, a localização dos pontos de coleta influencia na qualidade do sinal adquirido. Para determinar a melhor localização dos pontos de coleta, é fundamental analisar a

anatomia do crânio equino para que se escolha o melhor posicionamento dos eletrodos.

Segundo Dyce, Sack e Wensing (2004) o aspecto geral da cabeça de um eqüino é determinado pela idade, pelo sexo e pela raça, sendo que no potro jovem a abóbada craniana é abaulada para adapta-se aos contornos do encéfalo, projetando-se acima da face, curta e rasa. A conformação adulta ocorre quando a face se alonga e se aprofunda, acomodando o pleno acabamento dos dentes e a expansão dos seios paranasais, os quais ocupam a parte dorsal do crânio, medial à órbita, na junção de face do crânio é aplainado com o aumento dos seios frontais. As diferenças sexuais e raciais não são totalmente separáveis daquelas devidas à idade, assim o aumento de face é desproporcional em grandes animais. Tipicamente uma face mais alongada é de característica de um animal adulto em comparação com um animal jovem, do garanhão com a égua e do cavalo de tração com o pônei. Um perfil relativamente retilíneo, mas com certa convexidade (“cabeça de carneiro”) é de característica de certas raças mais fortes. No que se diz respeito à concavidade é regra dos cavalos da raça Árabe e nos mestiços da mesma raça.

A conformação anatômica do crânio equino permite observar a presença de seios paranasais frontais o que inviabiliza o posicionamento dos eletrodos nessa região devido a distancia do eletrodo ao cérebro. Na região do osso frontal encontram-se vários músculos orbiculares e nervos cranianos que poderiam introduzir artefatos no sinal, inviabilizando o posicionamento dos eletrodos nessa região, elegendo assim a região X destacada na Figura 4 a melhor opção para colocação dos eletrodos.

Figura 4 -Corte paramediano da cabeça do Equino, enfatizando a parte encefálica.
Fonte: Adaptado de Dyce, Sack e Wensing (2004).

2.5 O sinal de EEG em eqüinos

Na década de 1960, o pesquisador Ruckebusch investigou o sono em equinos domesticados utilizando electrocorticografia (ECOG) que mede atividade elétrica cerebral diretamente do córtex cerebral, nesse estudo os eletrodos foram implantados cirurgicamente para mensurar a atividade do hipocampo e verificou-se quatro fases de vigília: vigília, sonolência, ondas lentas do sono e do sono paradoxal (sono) vale lembrar que essa metodologia é caracterizada invasiva.

Métodos semelhantes foram utilizados em outros estudos com (ECOG) com eletrodos implantados. Um estudo comparou o uso da profundidade dos eletrodos agulhas com eletrodos de superfície em um cavalo e os autores relataram maior tensão e maior complexidade no sinal de eletrodos implantados (GRABOW, ANSLOW ; SPALATIN, 1969).

Um estudo realizado por Mysinger e colaboradores (1985) registrou dados de EEG em 25 cavalos adultos testando os sinais com os animais em estado de alerta e tranquilizados com xilazina e acetilpromazina, o experimento constatou uma frequência dominante de atividade rápida (25 a 40 Hz). Outro estudo com equinos

avaliou a resposta de analgesia entre halotano e isoflurano e constataram-se frequências nas faixas 13-32 Hz (EKSTROM, SHORT; GEIMER, 1993).

Otto et al. (1996) identificou alterações no EEG durante cirurgias em cavalos, mas alertou que o EEG não foi padronizado, sendo assim essa variação não poderia ser um bom indicador de sensibilidade.

Outro estudo com cavalos testando os anestésicos xilazina e ketamina apresentou as seguintes faixas: quando os animais não estavam sedados apresentaram atividade dominante de 25-35 Hz, com xilazina exibiram um padrão de atividade dominante na faixa de 1-3 Hz, após três minutos foram sedados com ketamina e apresentaram faixas de 1-3 Hz (PUROHIT; MYSINGER; REDDING, 1981).

Segundo Murrell et al. (2003) em seu trabalho para identificar mudanças na amplitude do espectro EEG, durante a castração em cavalos, constatou-se que em toda espécie existem discrepâncias nos resultados com EEG, mas em boa parte essa discrepância pode ser explicada pela falta de padronização da metodologia.

Williams et al. (2008) observou os parâmetros normais de EEG para vários estágios de vigília em cinco cavalos normais e verificaram-se faixas de 10-14 Hz, nesse estudo foi realizada uma reprodução não invasiva no método de colocação dos eletrodos, e comparou com o eletrocorticografia (ECOG) que utiliza eletrodo implantados obteve frequências similar de 10-12 Hz.

Johnson, Young e Taylor (1994) verificaram em nove pôneis com anestesia induzida com tiopental e mantidos com halotano apresentaram três picos registrados de forma consistente de 1-3 Hz, 5-8 Hz e 9-11 Hz, esses picos evidenciam as ondas delta, teta e alfa que são características do EEG humano.

Estudos adicionais demonstram a possibilidade de se fazer à aquisição de EEG com eletrodos de superfície em cavalos. Moreira et al. (2009) realizou um ensaio com dois animais soltos no piquete com eletrodos de superfície realizando a captação dos sinais de EEG com um sistema telemétrico a uma distância de 100 metros dos animais, nesse estudo foram testadas várias posições para colocação dos eletrodos e a posição P1 foi a mais adequada para coleta de sinais cerebrais (Figura 5). Essa metodologia se mostrou muito promissora, pois se trata de uma técnica não invasiva onde o animal se vê livre de estresse.

Figura 5 – Região da frente do animal indicando o melhor ponto de posicionamento dos eletrodos. Fonte: MOREIRA et al., (2009).

2.6 Doping em equinos

Para Cardoso e Rossi (2012) o teste antidoping consegue determinar fármacos e seus resíduos em concentrações mínimas, atualmente são verificadas mais de 5000 substâncias as principais são os anti-inflamatórios esteroides ou não e esteróides anabolizantes. Substâncias como anfetaminas, anestésicos e os narcóticos são proibidos para animais de competição a tabela 1 cita alguns exemplos de substâncias proibidas.

Tabela 1 - Exemplos de substâncias proibidas que aumentam o desempenho de animais atletas.

SUBSTÂNCIAS	FÁRMACOS	EFEITO ESPERADO
Bases Xânticas	Cafeína, Teofilina, Teobromina	Tem efeito cardiovasculares, broncodilatadores, nervoso e renais.
Opióides	Pentazocina e Butorfanol	Atuam como potentes analgésicos
Esteróides Anabólicos	Nandrona	Capacidade de produzir uma retenção positiva de azoto (ação anabólica)
Anfetaminas	Dextroanfetamina, metanfetamina	Atuam no sistema nervoso central, liberando toda anora-adrenalina cerebral (hormônios), e atrasam o aparecimento da fadiga
Antihistamínicos	Difenidramina e Pirilamina	Bloqueiam a ação da histamina. Normalmente deprime o sistema nervoso central, causando sonolência e taquicardia.
Anestésicos locais	Xilocaína, Lidocaína, Procaína	Utilizado para anestesiá feixes nervosos.
Analgésicos anti-inflamatórios não esteróides	Fenilbutazona, Dipirona, AAS e Flunixin Meglume	Possui propriedades anti-inflamatória, analgésica e antipirética.
Corticosteróides	Hidrocortisona, Prednisolona, Dexametasona	Utilizado no tratamento de doenças articulares
Diuréticos	Furosemida	Provoca maior excreção de urina aumentando a hemoconcentração .
Broncodilatadores	Clembuterol	Tratamento de doenças pulmonares crônicas
Mucolíticos, Expectorantes	Guaisina, Ambroxol, Bromexina	Retira secreções do trato respiratório e ação miorrelaxante.
Anti-tussígeno	Dextrometorpan, Butorfanol	Diminuem a frequência da tosse.
Vasodilatadores	Isoxsuprina	Tratamento de doença cardíaca aguda ou crônica. Aumentam a perfusão e oxigenação dos tecidos.
Relaxantes da musculatura esquelética	Guaisina, Metocarbamol	Ação miorrelaxante, diminuem dores musculares.

Fonte: CARDOSO; ROSSI, (2012).

2.7 Processamento digital de sinais

Segundo Qian (2002) a primeira coisa a fazer para interpretação do sinal é entender que tipo de informações pode ser obtido de um determinado sinal e como obter essas informações. A maioria dos sinais emitidos na natureza apresenta uma variável contínua e com valores contínuos no tempo ou no espaço, são os sinais analógicos, esses não podem ser processados, o sinal deve ser convertido em um sinal digital o qual possui tempo discreto com valores discretos num conjunto de possíveis valores.

Para se fazer a conversão de um sinal analógico para um sinal digital, primeiramente o valor deve ser amostrado e quantizado, ou seja, os seus valores devem ser aproximados, ou por arredondamento, ou por truncamento. Uma das maneiras é a uniforme ou periódica que é realizada em intervalos de tempo equidistantes (SILVA, 2005).

O processamento do sinal ocorre quando o mesmo é transmitido a um sistema com um dispositivo físico (hardware) e procedimentos algorítmicos (softwares) que realiza operações sobre o sinal. Uma vez que o sinal é transmitido para um sistema diz-se que o sinal foi processado. Um sistema será caracterizado pelo tipo de operação que realiza em um sinal e essas operações serão classificadas por processamento de sinais (PROAKIS; MANOLAKIS, 2002).

Uma das maneiras de se realizar a análise dos sinais é compará-los a conjuntos de funções conhecidas e, desta maneira diferentes informações poderão ser obtidas.

Dentre algumas técnicas de processamento de sinais, podemos destacar a Transformada de Fourier e a série de Fourier que segundo Silva (2005) permite a decomposição de sinais através de senos e cossenos. A Transformada é aplicável para sinais aperiódicos, enquanto que a série de Fourier se usa para sinais periódicos.

Para Costa (2000) O processamento digital de sinais é definido como a matemática, o algoritmo e os procedimentos computacionais usados para quantificar os sinais obtidos do mundo real. A figura 6 ilustra o diagrama de blocos que resume o conceito de processamento digital de sinais.

Figura 6 – Diagrama do conceito processamento digital de sinais. Fonte: COSTA (2000).

3 OBJETIVOS

O objetivo deste projeto foi desenvolver uma metodologia de aquisição de sinais elétricos cerebrais de equinos adultos de forma não invasiva, transmitir os dados telemetricamente e analisá-los utilizando técnicas de processamento digital de sinais para obter informações de interesse zootécnico.

Para esse fim, foram realizadas as seguintes tarefas:

- Coletar sinais de EEG de equinos sem qualquer tipo de sedação ou composto químico;
- Validação dos sinais obtidos como provenientes da atividade cerebral através de técnicas de processamento digital que possibilitem comparações com estudos anteriormente realizados;
- Induzir um “doping” em animais utilizando cafeína e comparar os registros de sua atividade elétrica cerebral antes e depois da indução do doping.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 O equipamento

A técnica de captação de sinais elétricos cerebrais (EEG) utilizou o sistema de aquisição desenvolvido por Silva (2005) vale lembrar que o aparelho desenvolvido para bovinos segue as normas padrões de segurança e qualidade para equipamentos médicos e, portanto utilizam componentes eletrônicos desenvolvidos para esta área de instrumentação. O equipamento foi adaptado para realização desse trabalho com equinos.

O sistema telemétrico utilizado é composto por dois módulos, cada um deles mede aproximadamente 2,5 x 7,0 x 11 cm e pesa 180 g. O primeiro módulo fica alocado dentro de uma bolsa impermeável acoplada a um cabresto e coleta os sinais elétricos cerebrais, os acondiciona e transmite utilizando rádio frequência. O segundo módulo é responsável pela recepção e conexão do sistema com o computador, ou seja, capta o sinal emitido pelo primeiro módulo e o disponibiliza para o computador fazendo o papel de uma estação rádio-base.

A interface entre o módulo dois e a estação rádio-base é feita através de um software que gera uma saída gráfica dos sinais de EEG do animal na tela e armazena a informação em um banco de dados.

Figura 7 – Tela do Software de aquisição do sinal

4.2 Procedimento de acoplamento do equipamento no animal

Três dias antes do experimento foi realizada a tricotomia na região craniana eleita para colocação dos eletrodos. Na primeira etapa do experimento os animais foram conduzidos ao tronco de contensão para colocação do cabresto contendo uma bolsa impermeável de couro portando o equipamento. Um par eletrodo foi aderido na superfície da fronte do animal e um eletrodo (terra) foi aderido no pescoço próximo à bolsa impermeável para servir como referência do equipamento, foi utilizado um eletrólito (Gel condutor para EEG) nos eletrodos e um fixador a base de resina poliéster para fazer a fixação dos mesmos. A figura 8 indica o posicionamento dos eletrodos na fronte dos animais, essas posições já foram testada em um estudo anterior realizado por Moreira et al. (2009).

Figura 8 – Posicionamento dos eletrodos na frente do equino.

4.3 Bioensaio

A coleta de dados foi realizada na Universidade de São Paulo (USP), no município de Pirassununga, coordenadas (21° 58' 54" S, 47° 25' 50" W). Os animais que foram utilizados no experimento pertencem ao Laboratório de Pesquisa em Alimentação e Fisiologia do Exercício de Equinos – FMVZ- USP e as análises de dados foram realizadas no Laboratório de Física Aplicada e Computacional (LAFAC) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos.

Foi utilizado quatro equinos, machos, com idade média de dois anos, hígidos, castrados, pesando aproximadamente 350 kg, da raça puro sangue Árabe.

Logo após a colocação do equipamento, com os animais ainda presos no tronco de imobilização, foram coletados sinais por um período de 5 minutos e posteriormente os animais foram soltos no piquete onde foram coletados dois trechos de cinco minutos de sinal. Para o processamento digital, esses intervalos

foram divididos em trechos de 5 segundos, ou seja, trechos com 600 pontos devido a frequência de amostragem de 120 Hz.

Em um segundo momento do experimento os animais foram submetidos ao medicamento Revitam V (caféina) da União Química Farmacêutica Nacional S/A SP-Brasil por via endovenosa. A dose utilizada foi de 10 ml de Revitam V diluída em 250 mL de solução fisiológica 0,9 % aplicada imediatamente após o preparo na veia jugular. Para os animais controle procedeu-se o mesmo protocolo de coletas, porém a substância injetada foi de solução fisiológica. Estabeleceram-se então os protocolos experimentais para cada animal, apresentados resumidamente na Figura 9.

Figura 9 – Diagrama de bloco do protocolo experimental para os dois procedimentos experimentais.

Após aplicação da droga os animais foram soltos novamente no piquete e iniciou-se a coleta de dois trechos com cinco minutos de duração (correspondendo a 72 mil pontos coletados) (Figura 10).

Figura 10 – Animais experimentais soltos no Piquete.

Os dados coletados foram processados utilizando a transformada rápida de Fourier (FFT), implementada no software matlab®. A densidade espectral de frequência obtida durante a situação de doping foi comparada com os dados obtidos dos mesmos animais sem o fármaco.

Essa metodologia foi repetida para cada animal de forma individual visto que as informações contidas nos sinais cerebrais têm características específicas para cada indivíduo, sendo assim os sinais obtidos como resposta a um determinado tratamento pode ser comparado exclusivamente com sinais do mesmo indivíduo. Por tanto, apesar de serem utilizados apenas quatro indivíduos no experimento, a quantidade de trechos de cinco minutos coletados permitiu compor um espaço amostral suficientemente amplo para o estudo proposto.

4.4 Processamento digital dos sinais

Após a aquisição e a digitalização dos sinais cerebrais as informações contidas no sinal foram avaliadas utilizando técnicas de processamento digital de

sinais que compreenderam basicamente a análise do espectro de frequências do sinal inteiro e na banda de frequência alfa (8-12 Hz). O espectro de frequência da onda alfa permitiu observar picos nessa faixa para os animais quando submetidos a cafeína. Para ressaltar o observado visualmente nos espectros foi calculada a integral para os espectros obtidos em ambas as situações. A integral foi calculada numericamente usando o método de Newton-Cotes (CAMPOS FILHO, 2007). A integral é uma medida da área compreendida sob a curva do espectro fornecendo um número que quantifica tal área.

Os valores de média e desvio padrão para a integral da curva da densidade espectral de potencia foi realizada usando o algoritmo (Anexo 2) codificados no matlab®.

4.5 Análises estatísticas dos resultados

Os resultados obtidos da integração dos espectros de potencia foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, utilizando o algoritmo (Anexo 2) codificado no matlab® conforme descrito na seção anterior.

A comparação entre as medias da integração dos espectros dos sinais coletados com a substância estimulante e sem a substância foi realizada através do software StatPlus - teste One Way ANOVA onde é realizada uma análise de variância, testando a hipótese de que as médias de duas ou mais amostras são diferentes. A hipótese é rejeitada se não houver diferenças entre as medias e aceita quando as medias são diferentes.

Essa técnica abrange os testes para duas médias em nível de significância de 95% com $p < 0.05$. Os seguintes testes estatísticos foram usados:

- 1- Teste de Scheffe de comparação de pares de médias;
- 2- Teste de Tukey HSD (diferença honestamente significativa) de diferenças entre médias;
- 3- Teste de Tukey de comparação de médias ordenadas;
- 4- Teste de Tukey-Kramer de diferenças entre as médias;
- 5- Teste de Neuman-Keuls de comparação de médias ordenadas;

- 6- Teste de Bonferroni de diferenças entre médias;
- 7- Fisher LSD (ou teste das diferenças menos significativas).

4.6 Protocolo do Comitê de Ética

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo - FZEA (Anexo 2).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme metodologia descrita, para cada um dos tratamentos (cafeína e placebo), foram obtidos os espectros de frequência X_{f_s} dos trechos de 5 segundos de sinal de EEG, onde $f_s = 120 \text{ Hz}$ é a frequência de amostragem utilizada.

Para o conjunto de espectros de cada tratamento, foi calculada a média de potência para cada frequência no intervalo discreto de 0.2 a 60 Hz. Foram obtidos desta maneira vetores $\bar{X}_{f_s}$ que representam as médias dos espectros de potência do sinal de EEG de cada animal segundo o tratamento.

A figura 11 ilustra os gráficos da média dos espectros $\bar{X}_{f_s}$ do animal A nas situações: solto sem cafeína e solto com aplicação de cafeína para os dois dias de experimento.

Figura 11- Gráficos das médias dos espectros do animal A com e sem cafeína.

O animal A mostrou-se calmo durante o experimento, aceitou todos os procedimentos experimentais sem demonstrar agitação; após a administração da cafeína apresentou contrações involuntárias do lábio superior que permaneceram mesmo após a soltura no piquete. Para este animal os gráficos das médias dos espectros mostrados na figura 11 visualmente contêm “picos” dominantes nas frequências da ordem de 10 Hz quando o animal foi submetido a cafeína, essa frequência está dentro da faixa conhecida como Alfa (8- 12 Hz), e predominância de frequências entre 20 e 40Hz sem a administração de substância estimulante.

Os perfis gráficos obtidos se assemelham aos obtidos em outros estudos com equinos onde foram identificados picos nas mesmas faixas quando os animais foram tranquilizados com xilazina e acetilpromazine, a faixa dominante entre os animais em estado de alerta para atividade rápida foi de 25-40 Hz, para atividade lenta foi de 0,5–4,0 Hz (MYSINGER, et al., 1985). Outro estudo realizado em equinos avaliou a resposta de analgesia entre halotano e isoflurano e constataram frequências na faixa 13-32 Hz para os animais em estado de alerta (EKSTROM, SHORT; GEIMER, 1993).

Para quantificar os efeitos observados nos espectros dos sinais foram calculados a integral dos espectros na banda que compreende as frequências de 0.2 Hz à 60 Hz e na banda que compreende as frequências de 8 Hz à 12 Hz (Banda alfa área hachurada na figura 11). A tabela 2 e 3 mostra a média e desvio padrão de $\bar{X}_{fs}$ da integral calculada para cada banda.

Tabela 2 – Análise da Integral da curva da densidade espectral de potencia de trechos de 5 segundos de EEG livres de artefatos na banda de frequência alfa (8-12 Hz) e na banda total (0.2-59 Hz) para o animal A.

1º dia de Experimento			
Tratamento	Média± (desvio) (dB)		Situação
	Banda 02-60 Hz	Banda 8-12 Hz	
Sem cafeína	3.71 (1.31)	0.30 (0.12)	Tronco
Sem cafeína	4.00 (0.64)	0.36 (0.11)	Solto
Com cafeína	3.81(1.13)	0.35 (0.19)	Tronco
Com cafeína	4.22(0.93)	0.40(0.15)	Solto

2º dia de Experimento

Tratamento	Média± (desvio) (dB)		Situação
	Banda 02-60 Hz	Banda 8-12 Hz	
Sem cafeína	4.10(0.35)	1.15(0.18)	Tronco
Sem cafeína	4.08(0.34)	0.57(0.18)	Solto
Com cafeína	3.33(0.29)	1.28(0.17)	Tronco
Com cafeína	4.79(0.46)	0.81(0.16)	Solto

Dados de média ± desvio padrão.

A figura 12 ilustra o gráfico da média dos espectros $\bar{X}_{fs}$ do animal B nas situações: solto sem cafeína e solto com aplicação de cafeína para os dois dias de experimento.

Figura 12 - Gráficos das médias dos espectros do animal B com e sem cafeína.

Os resultados da média espectral de potências demonstraram no primeiro dia do experimento para tratamentos sem cafeína picos relevantes nas faixas de 15, 20 e 25 Hz, e quando administrado a cafeína o animal apresentou um padrão eletroencefalográfico diferenciado, ou seja, o gráfico apresenta um pico relevante na faixa de 10 Hz. Esse resultado foi observado no outro animal submetido ao mesmo protocolo. No segundo dia do experimento o gráfico se manteve similar ao primeiro dia, com os mesmos picos para quando o animal ainda não tinha recebido cafeína e quando se administrou a substância apresentou picos de 25 e 35 Hz além do pico de 10 Hz. A tabela 3 mostra a média e desvio padrão de $\bar{X}_{fs}$ para o animal B.

Tabela 3 – Análise da Integral da curva da densidade espectral de potencia de trechos de 5 segundos de EEG livres de artefatos na banda de frequência alfa (8-12 Hz) e na banda total (0.2-59 Hz) para o animal B.

1º dia de Experimento			
Tratamento	Média± (desvio) (dB)		Situação
	Banda Total	Banda Alfa	
Sem cafeína	5.47(0.43)	1.79(0.28)	Tronco
Sem cafeína	2.50(0.11)	1.33(0.10)	Solto
Com cafeína	2.06(0.12)	0.68(0.06)	Tronco
Com cafeína	4.32(0.43)	0.99(0.16)	Solto

2º dia de Experimento

Tratamento	Média± (desvio) (dB)		Situação
	Banda Total	Banda Alfa	
Sem cafeína	2.13(0.05)	1.19(0.04)	Tronco
Sem cafeína	4.12(0.15)	2.07(0.14)	Solto
Com cafeína	2.83(0.05)	2.14(0.03)	Tronco
Com cafeína	5.10(0.20)	1.67(0.14)	Solto

Dados de média ± desvio padrão.

A partir dos dados das tabelas 2 e 3 podem ser observados indícios de mudanças nas características do sinal cerebral para estas unidades experimentais. No entanto nota-se que existe um comportamento mais homogêneo da média

quando considerado a banda alfa quando comparada com a banda de 0.2-60 Hz, levando-se em conta a repetição do experimento. Por exemplo, na tabela 2, a diferença entre o valor da integral com cafeína e o valor da integral sem cafeína no primeiro dia de tratamento, considerando o animal solto, foi de 0.22 dB e de 0.1 dB para o animal no tronco, para a banda de 02-60 Hz. No segundo dia a diferença foi de 0.71 dB para o animal solto e 0.77 para o animal no tronco na mesma banda. Para a banda alfa a diferença entre os dois experimentos foi de 0.5 dB no primeiro experimento para 0.13 dB no segundo considerando o animal no tronco e de 0.4 dB no primeiro experimento para 0.24 dB no segundo para o animal solto. Estes resultados mostram que a variação da média e do desvio foi menor considerando o animal solto e a banda alfa. O mesmo resultado pode ser observado na tabela 3. Esses resultados demonstram que o estresse do animal confinado no tronco é claramente identificado por esta metodologia através das alterações induzidas no espectro $\bar{X}_{fs}$ pelos processos cerebrais tanto na banda de 0.2 – 60 Hz quanto na banda alfa. Além disso, estes resultados mostram preliminarmente que existe um efeito mais consistente na banda alfa. Desta forma, foi analisado o efeito da cafeína considerando-se os dois dias de experimento na banda alfa e o animal solto.

O resultado do teste estatístico One-way Anova na tabela 4 mostra a significância das diferenças observadas considerando os dois dias experimentos na banda alfa para o animal A solto.

Tabela 4 - Teste estatístico One Way Anova com análise de variância e comparação entre os grupos para o animal A solto banda alfa.

Análise de variância (Fator Exclusivo) Animal 1 (Shawan)							
Estatística Descritiva							
Grupos	Tamanho da amostra	Soma	Média	Variancia			
Com doping	24	8,43	0,3513	3,4105			
Sem doping	47	20,01	0,4257	9,5665			
Total	71		0,4006	0,0226			
ANOVA							
Origem de variação	d.f.	SS	MS	F	p-nível	Crit. F	Omega quadr.
Entre grupos	1	0,0882	0,0882	4,0643	0,0477	3,9798	0,0414
Dentro de grupos	69	1,4968	0,0217				
Total	70	1,585					
Hartley Fmax	1,1651	Graus de liberdade	2	46			
Cochran C	0,5381	Graus de liberdade	2	46			
Bartlett Chi-square	0,173	Graus de liberdade	1	p-nível	0,6775		
Comparações entre os grupos (Fator 1 - Factor #1)							
Teste de Scheffe de comparação de pares de médias							
Grupo vs. Grupo (Contraste)	Diferença	95% Intervalo de confiança	Estatísticas do teste	p-nível			
Com doping vs Sem doping	-0,0745	-0,1482	-0,0008	4,0643	0,0477		
Teste de Tukey-HSD (diferença honestamente significante) de diferenças entre as médias							
Grupos	Diferença	Estatísticas do teste	p-nível	Aceito?			
Com doping vs Sem doping	-0,0745	2,4778	0,0843	rejeitado			
Teste de Tukey de comparação de médias ordenadas							
Grupos	Diferença	Estatísticas do teste	Graus de liberdade	Erro DF	p-nível	Aceito?	
Com doping vs Sem doping	-0,0745	2,4778	2	69,	0,0843	rejeitado	
Teste de Tukey-Kramer de diferenças entre as médias							
Grupos	Diferença	Estatísticas do teste	p-nível	Aceito?			
Com doping vs Sem doping	-0,0745	2,8511	0,0477	aceito			
Teste de Neuman-Keuls de comparação de médias ordenadas							
Grupos	Diferença	Estatísticas do teste	Graus de liberdade	Erro DF	p-nível	Aceito?	
Com doping vs Sem doping	-0,0745	2,4778	2	69,	0,0843	rejeitado	
Teste de Bonferroni de diferenças entre as médias							
Alpha/N	0,05						
Grupo vs. Grupo (Contraste)	Diferença	95% Intervalo de confiança	Estatísticas do teste	p-nível			
Com doping vs Sem doping	-0,0745	-0,1482	-0,0008	2,016	0,0477		
Fisher LSD							
Grupo vs. Grupo (Contraste)	Diferença	Estatísticas do teste	p-nível	Aceito?			
Com doping vs Sem doping	-0,0745	2,016	0,0476	rejeitado			

Os testes de comparação de grupos de médias para o animal A submetido ao protocolo experimental apresentado anteriormente, considerando valores de $p < 0,05$ mostram estatisticamente que nos testes Scheffe, Tukey- Kramer e Bonferroni é aceita a diferença nas médias dos tratamentos. A hipótese de diferença é rejeitada somente nos testes que consideram a ordenação na média com $p > 0.05$.

O resultado do teste estatístico One-way Anova na tabela 5 mostra a significância das diferenças observadas para o animal B.

Tabela 5 - Teste estatístico One Way Anova com análise de variância e comparação entre os grupos para o animal B solto banda alfa.

Análise de variância (Fator Exclusivo) Animal 2 (Talize)							
Estatística Descritiva							
Grupos	Tamanho da amostra	Soma	Média	Variância			
Com doping	40	5,21	0,1303	1,2727			
Sem doping	65	22,28	0,3428	9,9204			
Total	105		0,2618	0,0384			
ANOVA							
Origem de variação	d.f.	SS	MS	F	p-nível	Crit. F	Omega quadr.
Entre grupos	1	1,1184	1,1184	40,0302	0,	3,9333	0,271
Dentro de grupos	103	2,8776	0,0279				
Total	104	3,996					
Hartley Fmax	2,3422	Graus de liberdade	2	64			
Cochran C	0,7008	Graus de liberdade	2	64			
Bartlett Chi-square	7,9173	Graus de liberdade	1	p-nível	0,0049		
Comparações entre os grupos (Fator 1 - Factor #1)							
Teste de Scheffe de comparação de pares de médias							
Grupo vs. Grupo (Contraste)	Diferença	95% Intervalo de confiança	Estatísticas do teste	p-nível			
Com doping vs Sem doping	-0,2125	-0,2791 -0,1459	40,0302	0,			
Teste de Tukey-HSD (diferença honestamente significativa) de diferenças entre as médias							
Grupos	Diferença	Estatísticas do teste	p-nível	Aceito?			
Com doping vs Sem doping	-0,2125	8,0414	0,0001	aceito			
Teste de Tukey de comparação de médias ordenadas							
Grupos	Diferença	Estatísticas do teste	Graus de liberdade	Erro DF	p-nível	Aceito?	
Com doping vs Sem doping	-0,2125	8,0414	2	103,	0,0001	aceito	
Teste de Tukey-Kramer de diferenças entre as médias							
Grupos	Diferença	Estatísticas do teste	p-nível	Aceito?			
Com doping vs sem doping	-0,2125	8,9476	0,0001	aceito			
Teste de Neuman-Keuls de comparação de médias ordenadas							
Grupos	Diferença	Estatísticas do teste	Graus de liberdade	Erro DF	p-nível	Aceito?	
Com doping vs Sem doping	-0,2125	8,0414	2	103,	0,0001	aceito	
Teste de Bonferroni de diferenças entre as médias							
Alpha/N	0,05						
Grupo vs. Grupo (Contraste)	Diferença	95% Intervalo de confiança	Estatísticas do teste	p-nível			
Com doping vs Sem doping	-0,2125	-0,2791 -0,1459	6,3269	0,			
Fisher LSD							
Grupo vs. Grupo (Contraste)	Diferença	Estatísticas do teste	p-nível	Aceito?			
Com doping vs Sem doping	-0,2125	6,3269	0,	aceito			

Os testes de comparação das médias para o animal B submetido ao protocolo experimental apresentado anteriormente, considerando valores de $p < 0,05$ mostram que estatisticamente há diferenças significativas para todos os testes, pois aceitam a hipótese de que as médias são diferentes dos contrastes apresentados. Esse resultado corrobora com os relatos da literatura que mostram a cafeína como uma substância estimulante do sistema nervoso central com poder de promover o aumento da atividade motora (QUEIROZ et al., 2001).

O gráfico da média dos espectros $\bar{X}_{fs}$ do animal controle C nas situações: solto sem placebo e solto com placebo é mostrado na figura 13. Como esse animal mostrou-se arredio os dados do segundo dia do experimento foi inutilizado devido ao numero de artefatos e ruídos introduzidos no sinal.

Figura 13 - Gráficos das médias dos espectros do animal controle C com e sem placebo.

Esse animal apresentou desde o início muita agitação, não aceitava os procedimentos experimentais e houve a necessidade da utilização de métodos de contenção física (pito), quando o animal já portava o equipamento foi solto no piquete e apresentou movimentos estereotipados e tentava tirar o equipamento a todo o momento.

O resultado do teste estatístico One-way Anova na tabela 6 mostra a significância das diferenças observadas para este animal controle.

Tabela 6 - Teste estatístico One Way Anova com análise de variância e comparação entre os grupos para o animal C.

Análise de variância (Fator Exclusivo) Animal 3 (malcom)							
Estatística Descritiva							
Grupos	Tamanho da amostra	Soma	Média	Variância			
Com placebo	8	4,07	0,5088	2,4763			
Sem placebo	20	8,33	0,4165	4,4377			
Total	28		0,4429	0,0527			
ANOVA							
Origem de variação	d.f.	SS	MS	F	p-nível	Crit. F	Omega quadr.
Entre grupos	1	0,0486	0,0486	0,9202	0,3462	4,2252	-0,0029
Dentro de grupos	26	1,3739	0,0528				
Total	27	1,4226					
Hartley Fmax	1,1373	Graus de liberdade	2	19			
Cochran C	0,5321	Graus de liberdade	2	19			
Bartlett Chi-square	0,041	Graus de liberdade	1	p-nível	0,8395		
Comparações entre os grupos (Fator 1 - Factor #1)							
Teste de Scheffe de comparação de pares de médias							
Grupo vs. Grupo (Contraste)	Diferença	95% Intervalo de confiança	Estatísticas do teste	p-nível			
Com placebo vs Sem placebo	0,0923	-0,1054	0,2899	0,9202	0,3462		
Teste de Tukey-HSD (diferença honestamente significante) de diferenças entre as médias							
Grupos	Diferença	Estatísticas do teste	p-nível	Aceito?			
Com placebo vs Sem placebo	0,0923	1,135	0,4293	rejeitado			
Teste de Tukey de comparação de médias ordenadas							
Grupos	Diferença	Estatísticas do teste	Graus de liberdade	Erro DF	p-nível	Aceito?	
Com placebo vs Sem placebo	0,0923	1,135	2	26,	0,4293	rejeitado	
Teste de Tukey-Kramer de diferenças entre as médias							
Grupos	Diferença	Estatísticas do teste	p-nível	Aceito?			
Com placebo vs Sem placebo	0,0923	1,3566	0,3464	rejeitado			
Teste de Neuman-Keuls de comparação de médias ordenadas							
Grupos	Diferença	Estatísticas do teste	Graus de liberdade	Erro DF	p-nível	Aceito?	
Com placebo vs Sem placebo	0,0923	1,135	2	26,	0,4293	rejeitado	
Teste de Bonferroni de diferenças entre as médias							
Alpha/N	0,05						
Grupo vs. Grupo (Contraste)	Diferença	95% Intervalo de confiança	Estatísticas do teste	p-nível			
Com placebo vs Sem placebo	0,0923	-0,1054	0,2899	0,9593	0,3462		
Fisher LSD							
Grupo vs. Grupo (Contraste)	Diferença	Estatísticas do teste	p-nível	Aceito?			
Com placebo vs Sem placebo	0,0923	0,9593	0,3456	rejeitado			

Todos os testes estatísticos rejeitaram a hipótese das médias serem diferentes, portanto as médias são iguais, esse resultado permite inferir que o procedimento de injeção intravenosa com placebo não causou nenhuma alteração na atividade elétrica do animal.

A figura 14 ilustra o gráfico da média dos espectros $\bar{X}_{fs}$ do animal D nas situações: solto sem placebo e solto com placebo.

Figura 14 - Gráficos das médias dos espectros do animal controle D com e sem placebo.

O ultimo animal experimental mostrou-se um animal bem mais acessível aos procedimentos experimentais, tornando a aquisição dos sinais cerebrais com mais qualidade devido a pouca movimentação do animal. O animal mostrou-se muito acessível que mesmo depois do procedimento de injeção do placebo ficou muito calmo, conforme demonstrado nos gráficos acima, essa conduta animal nos permitiu fazer coletas contínuas do animal, ou seja, no tronco e bem próximo ao equipamento.

Esse animal controle na maioria dos gráficos apresentou picos nas faixas de 10, 20, 25, 30 e 35 Hz esses resultados corroboram com os anteriores atestando que através das médias dos espectros pode se sugerir que os animais quando

submetidos a substância estimulante como cafeína tendem apresentar picos nas frequências da banca alfa (8 – 12 Hz).

O resultado do teste estatístico One-way Anova na tabela 7 mostra a significância das diferenças observadas para este animal.

Tabela 7 - Teste estatístico One Way Anova com análise de variância e comparação entre os grupos para o animal D.

Análise de variância (Fator Exclusivo) Animal 4 (Darius)							
Estatística Descritiva							
Grupos	Tamanho da amostra	Soma	Média	Variância			
Com placebo	20	33,71	1,6855	71,6609			
Sem placebo	19	21,66	1,14	37,0278			
Total	39		1,4197	0,7915			
ANOVA							
Origem de variação	d.f.	SS	MS	F	p-nível	Crit. F	Omega quadr
Entre grupos	1	2,8994	2,8994	3,9472	0,0544	4,1055	0,0703
Dentro de grupos	37	27,1781	0,7345				
Total	38	30,0775					
Hartley Fmax	1,1399	Graus de liberdade	2	19			
Cochran C	0,5327	Graus de liberdade	2	19			
Bartlett Chi-square	0,0771	Graus de liberdade	1	p-nível	0,7813		
Comparações entre os grupos (Fator 1 - Factor #1)							
Teste de Scheffe de comparação de pares de médias							
Grupo vs. Grupo (Contraste)	Diferença	95% Intervalo de confiança	Estatísticas do teste	p-nível			
Com placebo vs Sem placebo	0,5455	-0,0108 1,1018	3,9472	0,0544			
Teste de Tukey-Kramer de diferenças entre as médias							
Grupos	Diferença	Estatísticas do teste	p-nível	Aceito?			
Com placebo vs Sem placebo	0,5455	2,8097	0,0544	rejeitado			
Teste de Bonferroni de diferenças entre as médias							
Alpha/N	0,05						
Grupo vs. Grupo (Contraste)	Diferença	95% Intervalo de confiança	Estatísticas do teste	p-nível			
Com placebo vs Sem placebo	0,5455	-0,0108 1,1018	1,9868	0,0544			
Fisher LSD							
Grupo vs. Grupo (Contraste)	Diferença	Estatísticas do teste	p-nível	Aceito?			
Com placebo vs Sem placebo	0,5455	1,9868	0,054	rejeitado			

Os testes estatísticos rejeitaram a hipótese das médias serem diferentes, esse resultado confirma a mesma observação feita para o outro animal controle que também apresentou rejeição de diferenças das médias constatando que o placebo não teve efeito estimulante da atividade elétrica cerebral no equino. O procedimento de injeção que poderia causar irritabilidade e alterações comportamentais nos animais não tem efeito efetivo mensurado na atividade elétrica cerebral dos equinos.

A manipulação do animal foi rápida o suficiente para não permitir uma alteração significativa em sua atividade elétrica cerebral. A literatura mostra que a contenção e manipulação do animal por um longo período pode alterar a atividade elétrica cerebral (SILVA, 2005).

Do ponto de vista da fisiologia animal é de se esperar que drogas alterem o nível da atividade neuronal no cérebro como reporta Spinoso; Gorniake e Bernardi, 1999. Os resultados estatísticos permitem verificar que mesmo em trechos de sinais de 5 segundos o espectro de potencia é uma boa ferramenta para analisar o efeito de fármacos corroborando assim o que já foi observado por (JOHNSON; YOUNG; TAYLOR, 1994).

6 CONCLUSÕES

Os resultados permitem concluir que a metodologia de aquisição de sinais elétricos cerebrais de equinos adultos de forma não invasiva, transmitida telemetricamente e analisados utilizando técnicas de processamento digital de sinais foi eficiente para obter informações de interesse zootécnico.

A metodologia empregada nesse trabalho permitiu coletar os sinais cerebrais dos equinos sem qualquer tipo de sedação em duas situações: no tronco e em liberdade. Os resultados obtidos demonstram ainda existência de um padrão de atividade elétrica cerebral diferente para cada uma dessas situações.

Além disso os resultados permitem a validação dos sinais cerebrais adquiridos como sendo de fato sinais de EEG visto que os resultados foram similares com os trabalhos realizados na literatura.

Conclui-se ainda que os animais quando submetidos ao doping com cafeína apresentaram um perfil de sinais de EEG diferenciado em relação aos animais controle na banda alfa com os animais soltos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARUSHANIAN, E.B; BELOZERTSEV, Y.B., The effect of amphetamine and caffeine on neuronal activity in the neocortex of the cat, **Neuropharmacology**, 17, p. 1-6. 1978.
- ASTON, R. Principles of biomedical instrumentation and measurement. New York: **Macmillan Publishing Company**, 1995.
- ATKINSON, J; ENSLEN, M. Self-administration of caffeine by the rat, **Arzneimittelforsch.**, 26, p. 2059-2061. 1976
- BROCKWAY, B.P.; HASSLER, C.R. Application of radiotelemetry to cardiovascular measurements in pharmacology and toxicology. In: SALEM, H.; BASKEN, S. I. (Ed.) **New technologies and concepts for reducing drug toxicities**. Boca Raton: CRC Press, p.109-132. C1993.
- CAMPOS FILHO, F. F. Integração numérica. In: _____ **Algoritmos Numéricos**. 2 ed. Rio de Janeiro: LTC. p.211-226. 2007.
- CARDOSO, H. I; ROSSI, R. **O doping em cavalos e seus efeitos tóxicos**. Disponível em http://www.abqm.com.br/php/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=773:o-doping-em-cavalos-e-seus-efeitos-toxicos&catid=36:materias&Itemid=39> Acesso em 28 Out.2012.
- COSTA, E. J. X. **Interface cérebro-computador usando redes neurais artificiais e técnicas avançadas de processamento digital de sinais**. 2000. 216 f. tese (Doutorado) - escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- COSTA, E. J. X.; CABRAL, E. F. Short time fractal dimension for EEG signal processing in brain-computer interface. In: International Conference On Signal Processing Application And Technology, 2000. Dallas. **Proceeding...** Dallas: CMP Media Inc., 2000. CD-ROM.
- DIXIT, A.; VANEY, N.; TANDON, O.P. Evaluation of cognitive brain functions in caffeine users: A P3 evoked potential study. **Indian J Physiol Pharmacol**; v.50, n.2, p.175-180. 2006.
- DYCE, K. M.; SACK, W.O.; WENSING, C. J. G. Cabeça e Parte Ventral do Pescoço do Equino. In: **Tratado de Anatomia Veterinária**. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. Cap.18, p. 467-495.
- EKSTROM, PM; SHORT, CE; GEIMER, TR. Electroencephalography of Detomidine-Ketamine-Halothane and Detomidine-Ketamine-Isoflurane Anesthetized Horses During Orthopedic Surgery A Comparison. **Veterinary Surgery** V. 22, i. 5, p. 414-418, September 1993.

FERRARI, R. **Efeitos da administração de ácido indol-3-acético (AIA) sobre parâmetros metabólicos e eletroencefalográficos de ratos**. 2008. 107 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

FERRAZ, G.C et al., Effects of intravenous administration of caffeine on physiologic variables in exercising horses. **Am J Vet Res** Dec; v.69, n.12, p. 1670-1675. 2008.

GRABOW, JD; ANSLOW, RO; SPALATIN J. Electroencephalographic recordings with multicontactdeph probes in a horse. **Am J Vet Res**; 30: p.1239-1243.1969.

GREENE, R.W; HAAS, H.L; HERMANN, A. Effects of caffeine on hippocampo pyramidal cells in vitro, Er. **J. Phurmacol**, 85, p. 163-169. 1985.

HASHIDA, J. C. et al., EEG pattern discrimination between salty and sweet taste using adaptative Gabor transform. **Neurocomputing**, v.68, p. 251-257, 2005.

HOLTZMAN, S.G; MANTE, S; MINNEMAN, K.P., Role of adenosine receptors in caffeine tolerance, **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 256, p.62-68. 1991.

HOUGHTON, E; MAYNARD, S. Some aspects of doping and medication control in equine sports. Disponível em

<http://www.anabolicsteroidcalculator.com/resources/articles/ebooks/doping/chapter17.pdf>.

Acesso em 30 jul. 2011.

JOHNSON, C. B; YOUNG, S. S; TAYLOR P. M. Animal health trust, Lanwades Park, Newmarker, Suffolk CB8 7Pn. **Research in Veterinary Science**, 56 p.373-378. 1994.

KAPLAN, G.B. et al., Relationship of plasma and brain concentrations of caffeine and metabolites to benzodiazepine receptor binding and locomotor activity, **J. Pharmacol.Exp. Ther.**248, p.1078-1083. 1989.

KELLAWAY, P.; PETERSÉN, I. **Quantitative analytic studies in epilepsy**.New York: Raven Press, 1976.

KOTAGAL, P.; YARDI, N. Relationship Between Sleep and Epilepsy. **Seminars in Pediatric Neurology**, v. 15, n.2, p. 42-49, 2008.

LENT, R. et al. Neurônios. In_____ **Cem Bilhões de Neurônios: Conceitos fundamentais de Neurociência**. 2ed.São Paulo: Atheneu. p. 14-26. 2005.

MC CALL, A. L; MILLINGTON, W. R; WURTEMAN, R. J. Blood-brain barrier transport of caffeine: dose related restriction of adenine transport, **Life Sci**, v.31, p.2709-2715. 1982.

MARTIN, J. H. The collective electrical behavior of cortical neurons.The electroencefalogram and mechanisms of Epilepsy. In: **Principles of neural Science**. 3ed. New York: Elsevier, 1991.

MISRA, A.L; VADLAMANI, N.L; PONTANI, R.B. Effect of caffeine on cocaine

locomotor stimulant activity in rats, **Pharmacol Biochem Behav.**24,p. 61-764. 1984.

MOREIRA, S. H. S.et al., Monitoração da atividade elétrica cerebral em eqüinos através de método não invasivo. In: **47 Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Zootecnia.** 2010 . Salvador. Empreendedorismo e Progresso Científicos Na Zootecnia Brasileira de Vanguard, 2010.

MURRELL, J. C. et al., Changes in the EEG during castration in horses and ponies anaesthetized with halothane. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia.** 30, p.138-146. 2003.

MYSINGER, PW et al., Electroencephalografic patterns of clinically normal, sedated and tranquilized newborn foals and adult horses. **Am J Vet Res.** Jan; v.46, n.1, p.36-41. 1985.

NELSON, D.L; COX, M.M. Biossinalização. In:_____ **Lehninger Princípios de bioquímica.** 4 ed. São Paulo: Sarvier,2006. Cap.12, p. 419-426.

OTTO, KA et al., Differences in quantitated electroencephalographic variables during surgical stimulation of horses anaesthetized with isoflurane. **Vet Surg** v.25, p. 249-255.1996.

POLLOCK, V.E et al., Effects of caffeine on resting EEG and response to sine wave modulated light. **Electroencephalogr. Chn. Neurophysiol.**, v.51 p. 470-476. 1981.

PROAKIS, J. G.; MANOLAKIS, D.G. **Digital signal processing:** principles, algorithms, and applications. 3rd ed. New Delhi: Prentice-Hall, 2002.

PUROHIT, R.C; MYSINGER, P. W; REDDING, R.W. Effects of xylazine and ketamine hydrochloride on the on the electroencephalogram and the electrocardiogram in the horse. **Am J Vet Res**, v.42: p.615-619. 1981.

QIAN, S. **Introduction to time-frequency and wavelets transforms.** New Jersey: Prentice-Hall, 2002.

QUEIROZ, A. N .et al. Effects of Caffeine on Locomotor Activity of Horses: Determination of the No-effect Threshold**Journal of Applied Toxicology.** V.21,p. 229–234, 2001.

SALVATORI, M. C. Aspectos gerais do doping no cavalo de esporte. **Cad. Téc. Esc. Vet., UFMG**, n.19, p.77-86, 1997.

SILVA, A. C. S. **Aplicação de técnicas de processamento digital de sinais na caracterização de sinais cerebrais de bovinos.** 2005. 106 f. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

SINGI, G. **Fisiologia Dinâmica.** 2 ed. São Paulo:Atheneu. p.272. 2007.

SMITH, R. L. The zero tolerance approach to doping control in horseracing: A fading

illusion In: INTERNACIONAL CONFERENCE OF RACING ANALYSTS AND VETERINARIANS, 13, 2000. Cambridge. **Proceedings Cambridge**, p.9-14, 2001.

SPINOSA, H. S; GORNIK, S. L; BERNARDI, P. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, p. 158-164, 1999.

SPRIET, L. L. Caffeine and Performance. **International Journal of Sport Nutrition**.v.5, p.84-89.1995.

STAVRIC, B; GILBERT, S.G. Caffeine metabolism: a problem in extrapolating results from animal studies to humans, **Acta Pharm. Jugosl**. V.40, p. 475-489. 1990.

THITHAPANDHA, A; MALING, H.M; GILLETTE, J.R., Effects of caffeine and theophylline on activity of rats in relation to brain xanthine concentrations, **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 139, p.582-586. 1972.

TOAZZA, A. L. **sistema micro-controlado para medição de impedância pele-eletrodo em registradores biolétricos**. Florianópolis. Dissertação de mestrado(Mestrado em engenharia elétrica) - Centro Tecnológico Universidade Federal de Santa Catarina, 1998.

TOBIN, T. Equine drugs, medications and performance altering substances: their performance effects, detection and regulation. Disponível em <http://www.thomastobin.com/drugsmeds/drugsmed.htm>. Acesso em 29 jul.2011.

WEBSTER, J. G. Medical instrumentation Application and Design. 2ed. Houghton Mifflin, Boston, 1992.

WILLIAMS, D. C. et al., Qualitative and Quantitative Characteristics of the Electroencephalogram in normal Horses during Spontaneous Drowsiness and Sleep. **J Vet Inter Med** v.22.p.630-638, 2008.

ANEXO 1 – Emissão de parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, referente ao projeto envolvendo equinos e iniciado em 2010 na FZEA.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciências Básicas

Pirassununga, 25 de maio de 2010.

Assunto: Emissão de parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal da FZEA.

Prezado Professor,

Tendo por base os princípios estabelecidos no Regimento Geral do Comitê de Ética em Experimentação Animal da FZEA/USP, informo que o projeto de pesquisa "Efeito do doping induzido na atividade elétrica cerebral de equinos", coordenado pelo Prof. Dr. Ernane José Xavier Costa recebeu parecer favorável de um pesquisador que atua na área de experimentação animal. Deste modo, a Comissão de Ética em Experimentação Animal da FZEA considerou-o aprovado.

Atenciosamente,

Prof. Dr. João Alberto Negrão
Presidente da Comissão de Ética

Prof. Dr. Ernane José Xavier Costa
Departamento de Ciências Básicas

ANEXO 2 – Código fonte desenvolvido no software MATLAB® para o processamento de EEG de equinos.

```

function EEGE
% programa para ler e calcular a integral dos espectros de potencia
%do eeg dos equinos
%versao para ler multiplos arquivos
[arq, caminho]= uiputfile('*.dat', 'salvar dados');
fid1 = fopen(arq,'w');
files = dir ('tre*');
num_arq = length(files)
for (i=1:num_arq)
[fid,msg]=fopen(files(i).name,'rt');
iffid<0
str=['Arquivo' files(i).name 'nao pode ser aberto'];
titulo = 'falha de abertura no arquivo';
errordlg(str,title,'modal');
else
    fprintf(fid1,'%s % s',files(i).name,' ');
    h= spectrum.welch;
    [in, count]= fscanf(fid, '%g');
    x=in - mean(in)
    e = size(x);
t = 1:e(1);
    t = t/120;
Hpsd = psd(h,x,'Fs',120);
%[b,a] = ellip(4,0.1,20,[2 30]*2/120);
    %sf = filter(b,a,x);
    %hline=plot(t,sf);

```

```

energia(i) = 10000*trapz(Hpsd.Frequencies,Hpsd.Data);
fprintf(fid1,' %6.2f ',energia(i));
end
fprintf(fid1,'\n');
    %grid on;
    %set(hline,'Uicontextmenu', handles.ContextMenu1);
%handles.hline=hline;
end
media = mean(energia);
desvio= std(energia);
fprintf(fid1,'%s %6.2f %s %6.2f ','media ', media, 'desvio ', desvio );
fclose(fid);
fclose(fid1);
end

```