

C-167418  
R-897663  
02/12/94

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA  
NOVA SUBSTÂNCIA COM ATIVIDADE ANESTÉSICA  
LOCAL DO VENENO DAS GLÂNDULAS  
PAROTÓIDES DO *Bufo paracnemis***

Manoel Cláudio Azevedo Patrocínio

Fortaleza- Ceará  
1997

TESE  
615.942  
P31.3P  
1997

FC-00006136-6

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA  
SUBSTÂNCIA COM ATIVIDADE ANESTÉSICA LOCAL DO  
VENENO DAS GLÂNDULAS PAROTÓIDES DO**  
*Bufo paracnemis*

Manoel Cláudio Azevedo Patrocínio

Dissertação submetida à coordenação do Curso de Pós-Graduação em  
Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do  
Centro de Ciências da Saúde da UFC, como requisito parcial para  
obtenção do título de Mestre em Farmacologia

1997

TESE

P342p Patrocínio, Manoel Cláudio Azevedo

Purificação e caracterização de uma nova substância com atividade anestésica local do veneno das glândulas parotóides do *Bufo paracnemis*/ Manoel Cláudio Azevedo Patrocínio.- Fortaleza, 1997.

98f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho.

Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Ceará.  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia

1. Sapo-veneno. 2. Farmacologia. I. Título.

CDD 615.942

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA SUBSTÂNCIA  
COM ATIVIDADE ANESTÉSICA LOCAL DO VENENO DAS  
GLÂNDULAS PAROTÓIDES DO *Bufo paracnemis***

**Manoel Cláudio Azevedo Patrocínio**

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. Dra. Gisela Costa Camarão

---

Prof. Dr. Carlos Alberto Gonçalves Silva Jared

Fortaleza, 08 de Setembro de 1997

“Amarás o Senhor, teu Deus,  
de todo o teu coração,  
de toda a tua alma e  
de todas as tuas forças.”

Deuteronômio 6:5

“Que se amor não se perde em vida ausente,  
Menos se perderá por morte escura:  
Porque, enfim, a alma vive eternamente,  
E amor é efeito da alma, e sempre dura”

Luís Vaz de Camões

Meu bem,  
Cláudio Felipe,  
o que está chegando,  
meus pais  
e irmãos:  
Razão da minha vida.

Veio a chuva, trazendo consigo trovões e relâmpagos no  
meio da escuridão. Perdi-me no tempo.  
Muito depois, descobri-me, mas meu corpo era conduzido.  
Vi quatro braços, dois eram do Senhor e os outros, do meu bem.

Cláudio Patrocínio

## AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de todo o Amor, toda a Bondade, toda a Misericórdia e todo o meu ser;

Ao Prof. Krishnamurti de Moraes Carvalho, pela minha aceitação em seu laboratório, por sua orientação pertinaz, criteriosa e ascética na verdadeira arte de fazer ciência;

À Profa. Gisela Costa Camarão, pela amizade, apoio e solidariedade no laboratório;

Ao Prof. Carlos Alberto Gonçalves Silva Jared, por ter aceito prontamente o convite de participar da banca examinadora, enriquecendo-a;

Aos Drs. José Telles e Gerson Sabóia Amorim, por terem sido imprescindíveis na minha formação como anesthesiologista;

À Maria Silvandira França, pela sua irrepreensível colaboração diária nos experimentos e sua amizade;

À Angelina Medeiros, Marinetes Aquino e ao Nava, por se transformarem em prestimosos e leais amigos;

Ao Prof. Pedro Jorge Caldas Magalhães, pela sua firmeza, presteza e abnegação de ser um amigo;

À Danielli Costa Carvalho, por ter dado a honra de caminhar comigo em meus primeiros passos;

Ao Alfredo Nicodemos, pelo seu despreendimento e valiosa participação nos experimentos;

À Profa. Rita Maria Dantas Nogueira, por seu jeito singular e terno de ser no lidar com os outros;

Aos Profs. Afrânio Craveiro e Iracema, pela grandiosa colaboração na determinação da estrutura;

A todos os amigos do laboratório de Neurofarmacologia, Mirian Parente, Fálba Bernadette, Iberê, Ligia Teles, Denise Carvalho, Andrea Benevides, Marcelo, Ricardo Rocha, Ricardo Melo, Christiane Melo, Socorrinha, Ana Paula, Ana Cristina e Glauria Almeida, pela convivência diária, tornando o laboratório em uma extensão de nossas famílias;

Ao Prof. Viela Satyanarayana Rao, Profa. Helena Serrazul, Prof. Glauce Socorro de Barros Viana, Prof. Roberto Cláudio, Profa. Terezinha Maciel, Prof. Carlos Maurício, Prof. Hélio Rola, por me terem passado seus inestimáveis e valiosos ensinamentos;

Aos amigos Alice, Ferdinando, Pergentino, Rômulo, Juvênia, Paola, Cristiane Reis, Cristiane Callado, Ana Maria, Sandra, Ana Rosa, por partilharem seus espaços nas disciplinas que realizamos;

À Vânia e Eliene, pelas orientações dedicadas e delicadas nas referências;

À Vilanir, Nísia, Marta, Artemisia, Sílvia, Vasco, pelo valioso apoio;

Ao Sobrinho e Haroldo, pelos relevantes cuidados;

Ao Samuel e Paulo, por seus diligentes favores prestados;

Ao amigo João Rodrigues, pela inabalável amizade e honrada estima;

A todos familiares, Manoel Patrocínio, Algezira Azevedo, Kátia Regina, João Carlos, Tetê Mendes, Zenaide Rios, Edvaldo Rios, José Filho, Iago Felipe, Evanete, Evaneide, Patrícia e Luiza, por fazerem tudo valer a pena;

À Silvânia Mendes e Cláudio Felipe, pelo amor concedido gratuitamente e me tornarem homem, marido e pai plenamente feliz!

## ÍNDICE

Lista de Figuras	xiii
Resumo	xvi
Abstract	xviii

### 1 INTRODUÇÃO

1.1 REVISÃO DOS ANFÍBIOS	1
1.1.1 História e Evolução	1
1.1.2 Distribuição	2
1.1.3 Morfologia dos Anfíbios	4
1.1.4 A pele dos Anfíbios: Fonte de substâncias biologicamente ativas	6
1.2 ANESTÉSICOS LOCAIS	
1.2.1 Histórico	13
1.2.2 Estrutura Química	18
1.2.3 Substâncias exóticas com atividade anestésica local	21
1.2.4 Eletrofisiologia do nervo	22
1.2.5 Mecanismo de Ação dos Anestésicos Locais	24
1.2.6 Farmacocinética	31
1.2.7 Toxicidade	34
1.3 OBJETIVOS	35

### 2 MATERIAL

2.1 Animais	37
2.2 Aparelhos	37

2.3 Soluções	39
2.4 Drogas e Reagentes	39

### **3 MÉTODOS**

3.1 Extração	40
3.2 Purificação em HPLC com coluna preparativa	40
3.3 Determinação do grau de pureza em HPLC em coluna analítica	42
3.4 Toxicidade	42
3.5 Determinação da $DL_{50}$	43
3.6 Exame macroscópico de órgãos	43
3.7 Frênico-diafragma isolado de rato	43
3.8 Reto abdominal	44
3.9 Teste da córnea do coelho	45
3.10 Canal deferente de camundongos	46
3.11 Teste da formalina	48
3.12 Determinação da Estrutura Química do Fator	49
3.13 Métodos Estatísticos	50

### **4 RESULTADOS**

4.1 Purificação em HPLC com coluna preparativa	51
4.2 Determinação do grau de pureza em HPLC com coluna analítica	51
4.3 Toxicidade	54
4.4 Determinação da $DL_{50}$	54
4.5 Exame macroscópico de órgãos	54
4.6 Frênico-diafragma isolado de rato	56

4.7 Reto abdominal	56
4.8 Teste da córnea de coelho	60
4.9 Canal deferente de coelho	60
4.10 Teste da formalina	64
4.11 Determinação da Estrutura Química do Fator	64
<b>5 DISCUSSÃO</b>	71
<b>6 CONCLUSÕES</b>	83
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	84

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. *Bufo paracnemis* 5
- FIGURA 2. Corte vertical da pele de um anfíbio mostrando camadas celulares, glândulas, vasos sanguíneos e outros componentes 8
- FIGURA 3. Fórmulas estruturais de anestésicos locais usados na clínica 20
- FIGURA 4. Representação bidimensional das subunidades  $\alpha$  (centro),  $\beta_1$  (esquerda) e  $\beta_2$  (direita) do canal de sódio sensível à voltagem no cérebro de mamíferos 29
- FIGURA 5. HPLC (Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) 41
- FIGURA 6. Preparação *in vitro* de canal deferente de camundongo 47
- FIGURA 7. Perfil de eluição do veneno das glândulas parotóides do *Bufo paracnemis* 52
- FIGURA 8. Perfil de eluição do pico 2, proveniente do veneno do *Bufo paracnemis* 53
- FIGURA 9. Efeito paralisante do pico 2 em camundongos, evidenciado após 10 minutos da administração de 30 mg/kg 55

FIGURA 10. Efeito do fator purificado nas contrações evocadas por estimulador de nervo periférico na preparação frênico-diafragma de rato	57
FIGURA 11. Efeito do etanol como controle nas contrações do reto abdominal	58
FIGURA 12. Efeito do fator purificado nas contrações do reto abdominal de sapo	59
FIGURA 13. Cinco gotas de etanol e água bidestilada foram instiladas no olho direito do coelho (controle)	61
FIGURA 14. Cinco gotas do fator purificado, dissolvido em etanol e água bidestilada, foram instiladas no olho esquerdo do coelho	62
FIGURA 15. Efeito do fator purificado nas contrações evocadas por estimulador de nervo periférico no canal deferente de camundongo	63
FIGURA 16. Efeito do fator purificado na nocicepção induzida por formalina em camundongo	65
FIGURA 17. Cromatografia de camada delgada do pico 2, utilizando um revelador de vanilina e etanol como eluente	66
FIGURA 18. Espectroscopia da substância purificada na região normal do infravermelho	68

FIGURA 19. Espectrometria de massas da substância anestésica isolada 69

FIGURA 20. Proposição estrutural do fator purificado das glândulas parotóides  
do *Bufo paracnemis* 70

## RESUMO

A pele do anfíbios possui uma diversidade de substâncias, tais como aminas biogênicas, alcalóides, esteróides, proteínas e peptídios que suscitam muitos efeitos farmacológicos. Neste estudo, foi purificado e caracterizado um fator com uma atividade anestésica local.

O veneno extraído das glândulas paratóides do *Bufo paracnemis* foi dissolvido em etanol (1:5; p:v). e foi mantido a 4 °C durante toda a noite. A mistura foi centrifugada a 5000 g por 15 minutos e o material precipitado foi descartado. O sobrenadante foi fracionado em HPLC (cromatografia líquida de alta performance), usando uma coluna C-18 (2,5x30 cm), eluído com um fluxo de 7 ml/min com um gradiente isocrático de acetonitrila a 40%. As frações foram liofilizadas para bioensaio. Um pico, que apresentou paralisia motora após injeção intraperitoneal em camundongos, foi coletado para estudos farmacológicos.

A fração purificada bloqueou o reflexo córneo-palpebral em coelhos. Este pico causou redução concentração-dependente na preparação nervo frênico-diafragma de ratos. Esta inibição foi completa em altas concentrações do fator. O pico também aboliu a contração evocada eletricamente no músculo longitudinal do canal deferente de camundongos. O pico purificado diminuiu o tempo de lambida na primeira fase e aboliu este tempo na segunda fase do teste da formalina em camundongos.

O grau de pureza do material foi demonstrado por cromatografia de camada delgada. Foram executadas espectroscopia de infravermelho e espectrometria de massas. O peso molecular do material foi determinado, com valor de 402 Da. Sua estrutura pertence a família do grupo dos esteróides; é uma bufogenina. Foi determinada uma proposição estrutural do fator e não há relatos na literatura de atividade anestésica local deste fator purificado.

Em conclusão, os resultados apresentados neste estudo mostram a total purificação de um potente fator com atividade anestésica local das secreções da pele do *Bufo paracnemis*, que poderá ser usado com fins terapêuticos em seres humanos.

## ABSTRACT

Amphibian skin has a diversity of substances, such as biogenic amines, alkaloids, steroids, proteins and peptides that evoke many pharmacological effects. In this study it was purified and characterized a factor with a local anesthetic activity.

The venom extracted from *Bufo paracnemis* paratoid glands was dissolved in ethanol (1:5; w:v) and it was kept at 4 °C overnight. Then the mixture was centrifugated at 5000 g for 5 minutes and the pellets were discarded. The supernatant was fractionated by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using a C 18 column (2,5x30 cm) eluted with a flow of 7 ml/min with a gradient of 0-40% acetonitrile. The fractions were lyophilized for bioassay. A peak that presented motor paralysis after i.p. injection in mice was collected for further pharmacological studies.

The fraction blocked corneal reflex in rabbit. This peak caused concentration dependent reduction in the rat phrenic nerve-diaphragm preparation. This inhibition was complete in high concentrations of the factor. The peak abolished the electrically evoked contraction on the longitudinal muscle of the mouse vas deferens. It decreased licking in the first phase and it abolished licking in the second phase of the formalin test in mice.

The purity of this factor was also demonstrated by thin layer chromatography.

There were performed infrared spectroscopy and mass spectrometry. The molecular weight was determined and it was 402 Da. Its structure belongs the family of the group of the steroids. It's a bufogenin. It was made a structural proposition and nothing is known of the activity of this purified factor.

In conclusion, the results presented in this study showed the total purification of a potent local anesthetic factor from *Bufo paracnemis* skin secretions that may be used in future human therapeutics.

# 1- INTRODUÇÃO

## 1.1- REVISÃO DOS ANFÍBIOS

### 1.1.1- História e Evolução

Emergindo dos mares Devonianos, na era paleozóica, há 300-350 milhões de anos atrás, os anfíbios conquistaram o ambiente terrestre, sofrendo profundas mudanças evolutivas (Lazarus & Attila, 1993).

Os anfíbios foram o primeiro grupo de vertebrados a viver no ambiente terrestre. São membros da Classe *Amphibia*, Subfilo *Vertebrata*, Filo *Chordata*, Reino *Animalia* e formam as seguintes ordens: Anura ou *Salientia* (sapos e rãs), Urodela ou *Caudata* (salamandras e tritões) e Apoda ou *Gymnophiona* (cobras-cegas ou cecílias) (Storer et al., 1985).

O nome da classe anfíbio deriva do grego *amphibios* ( gr. *amphi*, dual e *bios*, vida) que significa “vivendo uma vida dupla”. A palavra define um animal que vive tanto na água como na terra (Duellman, 1992).

Tanto na estrutura como na função, os anfíbios situam-se entre os peixes e os répteis, sendo o primeiro grupo de cordados a viver fora da água. Alguns caracteres novos os adaptaram para a vida terrestre (Storer et al., 1985).

A transição da água para a terra envolveu modificação do corpo para andar em terra firme, retendo ainda a capacidade de nadar; desenvolvimento de patas em lugar de nadadeiras pares; modificações da pele para facilitar a respiração; maior ênfase na respiração pulmonar; modificações no aparelho circulatório para permitir a respiração pelos pulmões e pele; modificações no metabolismo e na excreção para formar menos produtos nitrogenados tóxicos de excreção e aquisição de órgãos dos sentidos que funcionam tanto no ar como na água (Storer et al., 1985; Duellman, 1992).

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

### **1.1.2- Distribuição**

Os anfíbios vivem espalhados por todo o mundo, exceto Antártida e Groenlândia. Eles vivem principalmente na água ou em lugares úmidos, nunca no mar. São comuns em regiões temperadas úmidas, mais abundantes em florestas tropicais. Diversas rãs atingem o círculo polar ártico; uma rã e uma perereca são encontradas acima de 3.659 metros na Serra Nevada da Califórnia; e um sapo (*Bufo*) vive acima de 4.870 metros nos Andes. Alguns sapos, pererecas e outros anfíbios vivem nos desertos, como no deserto do sudoeste da América do Norte e na Austrália, onde se escondem em buracos

na terra durante os períodos secos e são animais com hábitos noturnos (Storer et al., 1985).

Todos os anfíbios precisam evitar a seca e temperaturas extremas porque não têm regulação da temperatura do corpo e podem perder facilmente água através de sua pele. Durante o inverno os sapos enterram-se ou vão até abaixo da linha de congelação. Na hibernação todos os processos vitais são reduzidos, os batimentos cardíacos são lentos e o animal subsiste de material armazenado no corpo, incluindo o glicogênio no fígado (Storer et al., 1985).

Os anfíbios resistem à dessecação por meios comportamentais, estruturais e fisiológicos. Alguns mecanismos fisiológicos são liberação de secreção da hipófise (arginina-vasopressina) que reduz a quantidade de água que sai pelos rins (efeito antidiurético) e promove absorção de água pela pele e a reabsorção de água armazenada na bexiga; aumento de retenção de uréia, elevando a osmolaridade dos tecidos e promove a absorção de água e reduz a perda para o solo e aumento da tolerância dos tecidos à perda de água (Storer et al., 1985).

Os ajustamentos comportamentais incluem redução da superfície exposta do corpo, dobrando as pernas, fechando os olhos, achatando o corpo, enrolando o corpo e a cauda; retirando-se para lugares úmidos como fendas, madeira em decomposição ou tocas de animais; cavando e permanecendo inativos durante todo o tempo seco. Em ambientes secos, muitas espécies são ativas durante a noite quando a umidade do ar aumenta; outras, durante a

época da seca, escondem-se em cavidades subterrâneas construídas por elas (Storer et al., 1985).

### **1.1.3 Morfologia dos Anfíbios**

Os anfíbios, como dito anteriormente, são divididos em ápodes, urodelos e anuros. Os ápodes são animais de corpo vermiforme, sem apêndices locomotores. São ápodes as cobras-cegas ou cecílias. Os urodelos têm corpo alongado com dois pares de apêndices locomotores e cauda. São exemplos desse grupo as salamandras e tritões. Os anuros são assim chamados por terem a cauda atrofiada. Não têm pescoço, os membros anteriores são curtos e os posteriores mais longos, adaptados para saltar. São anuros o sapo, a rã e a perereca (Marcondes & Lammoglia, 1991).

A morfologia externa dos anfíbios está descrita a partir do sapo (figura 1). O corpo do sapo divide-se em cabeça, tronco e membros não havendo pescoço e cauda. A cabeça é diferenciada e de forma triangular. Nela existe a boca, uma abertura ampla em cujo interior está a língua, fixada anteriormente e por isso pode ser lançada para longe, o que permite ao sapo coletar alimentos (Marcondes & Lammoglia, 1991)

Lateral e superiormente a cabeça, há dois olhos protegidos por três pálpebras, uma superior, outra inferior e uma transversa. A transversa, conhecida como nictitante, funciona à maneira de um pára-brisa de automóvel mantendo o olho limpo e espalhando a secreção lacrimal, o que impede o

ressecamento do olho quando aberto (Storer et al., 1985; Marcondes & Lammoglia, 1991).



Figura 1. *Bufo paracnemis* (Fonte: Lutz)

Atrás de cada olho há uma depressão redonda coberta por uma membrana, o tímpano, destinada a receber as ondas sonoras. À frente dos olhos, há dois orifícios nasais, ligados à boca, providos de válvulas para impedir a entrada de água. Logo atrás dos tímpanos estão duas glândulas parotóides que produzem secreção venenosa (Storer et al., 1985).

O tronco é globoso e levemente afilado junto à parte posterior. Os membros são anteriores e posteriores. Os anteriores, mais curtos, compreendem os braços, os antebraços e as mãos com quatro dedos. Os posteriores, mais longos, apresentam coxas, pernas, tarsos e pés com dedos (Marcondes & Lammoglia, 1991).

#### **1.1.4-A Pele dos Anfíbios: Fonte de substâncias biologicamente ativas**

A pele dos anfíbios é permeável à água, preenchida com glândulas, e frequentemente colorida. A tonalidade escura da pele dos anfíbios, com sombras do castanho ao negro, é produzida pela melanina, um pigmento escuro, usualmente achado nos melanóforos da pele nos quais o pigmento pode-se encontrar disperso ou concentrado sob ação hormonal (Stebbins & Cohen, 1995).

Periodicamente, muitos anfíbios mudam de pele. Uma secreção mucosa pode ser observada entre as camadas córneas que se destacam e as camadas

epidérmicas subjacentes. O muco deve facilitar o desprendimento de camadas celulares da epiderme durante a muda, talvez exercendo pressão sob essas camadas (Toledo, 1984).

A pele dos anfíbios é responsável por várias funções vitais tais como a respiração, que complementa a pulmonar, a reprodução, o transporte de água e eletrólitos, a regulação da temperatura corpórea, a defesa contra predadores, dessecação e proliferação de microorganismos na superfície do corpo (Toledo & Jared, 1989; Carvalho, 1995).

A pele nos três grupos de anfíbios é semelhante estruturalmente (figura 2). É um dos fatores que suporta uma origem comum para todos estes animais, embora uma origem independente para as cecílias tenha sido proposta (Stebbins & Cohen, 1995).

As secreções cutâneas ocorrem na camada dérmica da pele dos anfíbios através de glândulas distintas histologicamente, similares àquelas encontradas nos peixes, indicando que a presença de glândulas na pele precedeu a evolução dos anfíbios (Lazarus & Atila, 1993). As glândulas situam-se na superfície dorsal do animal. As secreções são de dois tipos de glândulas alveolares identificadas na derme desses vertebrados: as glândulas mucosas e as granulosas (Neuwirth et al., 1979; Toledo, 1984; Flucher, 1986).

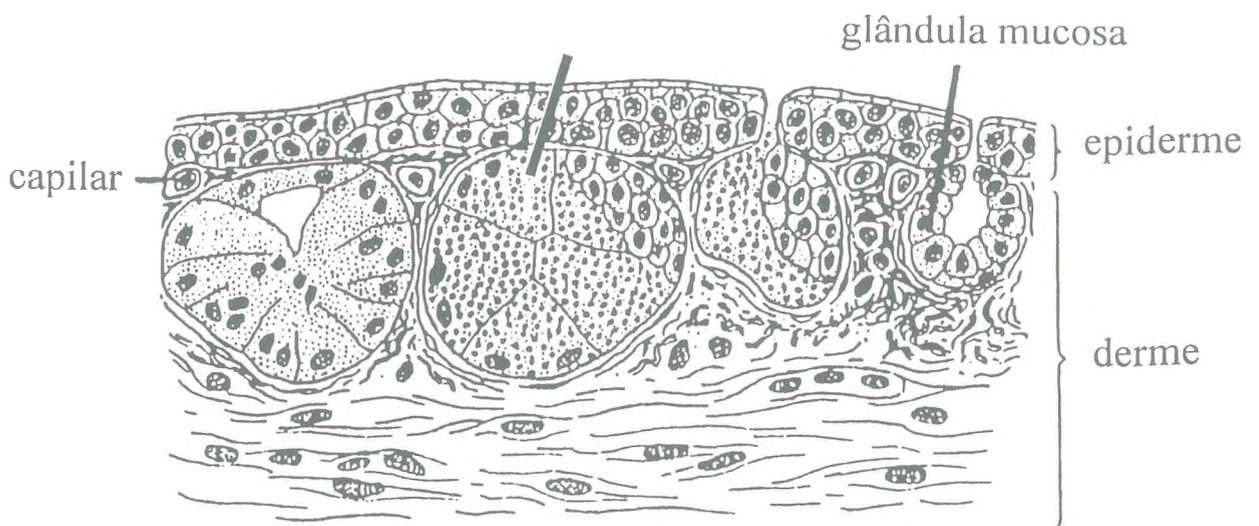


Figura 2. Corte vertical da pele de um anfíbio mostrando camadas celulares, glândulas, vasos sanguíneos e outros componentes.

(Fonte: Stebbins, R.C. & Cohen, N.W., A natural history of amphibians)

As glândulas mucosas cutâneas dos anfíbios eliminam um muco, altamente hidrófilo, que mantém a superfície do corpo umedecida. Em razão disso, a troca de gases entre a pele desses animais e o meio é facilitada. Esse muco exerce, também, um papel defensivo, pois a sua natureza viscosa dificulta a preensão dos anfíbios por eventuais predadores (Toledo & Jared, 1989). Esse muco também controla o pH e o grau de umidade da pele propiciando as condições adequadas para a respiração cutânea (Toledo, 1984).

As glândulas mucosas produzem uma membrana que protege contra a entrada de bactérias e fungos, reduz a fricção na natação, e deixa o corpo escorregadio, ajudando a escapar de predadores (Stebbins & Cohen, 1995).

Muito embora a secreção mucosa possa exercer um papel defensivo, é a secreção granulosa a principal responsável pela defesa passiva dos anfíbios, devido ao fato de ser tóxica para diversas espécies de vertebrados. A morfologia das glândulas granulosas varia entre as diferentes espécies de anfíbios, podendo estarem dispersas ou concentradas em uma determinada região da pele do animal (Whitewar, 1977; Toledo & Villa, 1987; Reilly et al., 1993).

As glândulas granulosas, cuja secreção é frequentemente tóxica ou repelente, são dispersas na pele mas são abundantes na cabeça, dorso, extremidades ou são agrupadas, como as parotóides nos sapos (Stebbins & Cohen, 1995).

As glândulas granulosas têm este nome devido à presença de grânulos secretórios densos e acidófilos que, sendo morfológicamente distintos daqueles encontrados em outros vertebrados, sofrem lise após a descarga em meio hipotônico (Camarão, 1995).

Na pele de alguns anfíbios, como os sapos, existem protuberâncias denominadas glândulas parotóides, dispostas uma de cada lado do corpo em posição pós-orbital. As parotóides apresentam-se com muitos poros visíveis a olho nu e exercem uma importante função de defesa. Essa função se deve a eliminação de um veneno, geralmente de aspecto leitoso que é elaborado por glândulas granulares (Storer et al., 1985; Toledo & Jared, 1989).

O conteúdo glandular é secretado sob regulação neuronal, presumivelmente mediado por neuropeptídeos e ocorre em resposta a uma posição de defesa comportamental contra predadores. As glândulas depletam rapidamente 80-90% de seus conteúdos (Iwamuro, 1981; Giovaninni, 1991) um material viscoso, de aspecto leitoso, através de secreção do tipo holócrina ao invés de um mecanismo de exocitose clássica. A secreção também pode ser induzida por estimulação física do animal (manuseio), moderado choque elétrico ou injeção de adrenalina, noradrenalina, arginina vasotocina, arginina vasotocinilglicina, todos mediados pelo sistema nervoso (Flucher, 1986).

Após a depleção, são necessárias cerca de duas semanas em média para o conteúdo das glândulas serem sintetizadas, período em que permanecem refratárias à estimulação adrenérgica (Hauser et al., 1990; Flucher et al., 1986).

A regeneração da glândula granulosa consiste em um rearranjo em monocamadas de células secretórias intactas sobre a superfície luminal, dentro das quais são formadas de modo contínuo os grânulos de estocagem. Três a quatro semanas são necessárias para a regeneração completa da glândula (Camarão, 1995).

As glândulas granulosas sintetizam e estocam produtos para secreção, que incluem cinco grandes grupos: (i) peptídeos, sendo um grupo com atividade antimicrobiana e outro com princípio bioativo; (ii) proteínas, substâncias proteináceas e enzimas; (iii) esteróides, cardiotônicos e não cardiotônicos; (iv) alcalóides e (v) aminas biogênicas (Erspamer, 1984; Roseghini et al., 1986; Lazarus & Attila, 1993; Carvalho, 1995).

A classe das aminas biogênicas consiste de três grupos distintos, as indoalquilaminas, imidazolalquilaminas e fenilalquilaminas, o último dos quais incluem neuromoduladores, como adrenalina, noradrenalina e dopamina (Lazarus et al., 1994).

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

Quanto aos esteróides, há os cardiotônicos: as bufogeninas, também denominadas bufaginas ou bufadienólides e as bufotoxinas que são formadas da união da suberilarginina com bufogeninas e os não cardiotônicos: esgosterol, colesterol e o  $\gamma$ -sitosterol (Toledo & Jared, 1989). As bufogeninas constituem em uma família de substâncias heterocíclicas que inibem a bomba de Na/K-ATPase (Lazarus, 1994).

Há uma grande variedade de peptídeos na secreção cutânea dos anfíbios: a maioria exibe uma potente atividade biológica em mamíferos, incluindo taquicininas, bradigininas, ceruleínas, bombesinas, opióides, xenopsinas, hormônio liberador de Tireotropina, angiotensina; um outro grupo apresenta atividade antimicrobiana, tais como a mangaininas, PGLa, XPF, LPF e CPF.

O grupo de proteínas e substâncias proteináceas envolve toxinas, tais como a toxina do *Triturus cristatus*, a pseudo-tritontoxina e a do *Pelobates fuscus*; enzimas envolvidas na biossíntese, nas modificações pós-translacionais (amidação, sulfatação, isomerização, etc.) e inativação de substâncias; e proteínas presentes em grânulos secretórios, FIM-A1, B1 e C1, APEG-proteína e  $\beta$ -galactosídeo-lectina (Carvalho, 1995).

Várias enzimas foram identificadas em anfíbios. Algumas enzimas são as convertases, amidases (peptidil-glicina- $\alpha$ -hidroxi-peptidase e peptidil-hidoxi-glicina N-C ligase), exopeptidases (dipeptidil-aminopeptidase e carboxipeptidase), endopeptidases (metaloprotease), e outras (Camarão, 1995; Carvalho, 1995).

## 1.2- ANESTÉSICOS LOCAIS

### 1.2.1 Histórico

Embora as folhas da planta nativa *Erythroxylon coca* tenham sido consumidas por índios da América do Sul durante milhares de anos e o efeito de dormência produzido na boca e língua ao mascar tais folhas seja conhecido há muito tempo, seu uso na prática clínica somente foi tentado a partir do século XIX (Rang et al., 1995).

As folhas da *Erythroxylon coca* contêm a cocaína, alcalóide encontrado em grandes quantidades (0,6 a 1,8%) nas folhas dos arbustos que crescem nos Andes de 1.000 a 3.000 m acima do nível do mar. Aproximadamente 9 milhões de quilogramas dessas folhas são consumidas anualmente por cerca de 2 milhões de habitantes dos altiplanos do Peru, que mascam ou sugam as folhas, devido à sensação de bem-estar que produzem (Ritchie & Greene, 1987).

As tentativas de isolar o princípio ativo das folhas da coca resultaram na extração dos alcalóides: eritroxila, por Gaedcke, em 1855 e cocaína, por Albert Niemann, em 1860. Nieman, como muitos químicos da época, provou seu novo composto isolado e notou um entorpecimento da língua (Covino & Vassalo, 1985; Covino, 1986; Catterall & Mackie, 1996).

Em 1851, Charles Gabriel Pavraz, cientista francês, inventou a seringa hipodérmica, instrumento destinado a ter um papel importantíssimo em anestesia regional, aperfeiçoada por Alexander Wood em 1854 (Collins, 1978; Fink, 1985).

O uso potencial da cocaína, como anestésico local, foi primeiro descrito por Moreno y Maiz, um cirurgião das Forças Armadas Peruanas, em 1868 em uma monografia (Covino & Vassalo, 1985; Carvalho, 1994).

Anrep, em 1880, descreveu que a cocaína injetada sob a pele causa perda reversível da sensibilidade e sugeriu que isto poderia ser clinicamente útil, mas a idéia não foi levada adiante (Lee, 1985).

O uso clínico da cocaína foi iniciado realmente por dois jovens cientistas vienenses, Sigmund Freud e Carl Koller. Em 1884, Freud realizou um estudo geral sobre os efeitos fisiológicos da cocaína. Ele estava particularmente interessado nas ações centrais da droga, e utilizou-a para libertar um de seus colegas do vício da morfina (Hondegheem & Miller, 1994; Catterall & Mackie, 1996).

Koller, em 1884, instilou algumas gotas de solução de cocaína nos olhos de alguns pacientes e produziu anestesia completa da córnea e da conjuntiva. Constituiu-se no primeiro a descrever a ação fisiológica da cocaína e, além de utilizar este fármaco como anestésico local em sua prática oftalmológica, realizou várias conferências relativas ao valor da cocaína como anestésico

local (Collins, 1978). Em poucos anos a anestesia por cocaína foi introduzida na odontologia e cirurgia geral (Rang & Dale, 1993).

Halsted, em 1885, relatou as suas interessantes experiências realizadas. Grande parte do trabalho foi executado em uma barraca erguida próxima ao Bellevue Hospital, em Nova York, pois era impossível realizar e executar uma cirurgia geral, com precauções anti-sépticas, no anfiteatro geral, onde dominavam e predominavam numerosos cirurgiões anti-Lister (Collins, 1978). Halsted demonstrou a capacidade da cocaína de produzir bloqueio periférico. Ele a utilizou para impedir a transmissão nos troncos nervosos, criando os alicerces da anestesia por bloqueio nervoso na cirurgia (Covino & Vassalo, 1985). No transcurso de seu trabalho, Halsted e seus colegas tornaram-se toxicômanos. Somente Halsted pôde vencer tal hábito. Dois anos depois, ele já era capaz de mostrar sua energia que o levou a postos de liderança nas disciplinas de cirurgia e educação médica (Collins, 1978).

Leonard Corning, neurologista de Nova York, em 1885 experimentou cães, tentando produzir anestesia dos nervos raquídeos. Repetiu o método em um homem que sofria síndrome dolorosa espinhal e obteve anestesia, com alívio da dor. Faltam detalhes, mas provavelmente ele conseguiu a anestesia epidural (Collins, 1978).

Utilizando os conhecimentos da ação anestésica e a técnica de punção espinhal de Quincke, August Bier produziu anestesia subaracnóidea em animais e depois no homem, em 1898. Além de anestésiar seu assistente, ele próprio se anestésiou (Collins, 1978).

Os experimentos precursores representaram um imenso avanço para a cirurgia, mas alguns efeitos colaterais, sejam agudos ou crônicos, vieram junto com o uso clínico da cocaína. Os efeitos agudos provinham da toxicidade sistêmica, e os efeitos crônicos, das propriedades de produzir dependência. A gravidade destas reações adversas resultou em um grande esforço para sintetizar substâncias que possuíssem propriedades anestésicas benéficas da cocaína, mas sem se acompanhar de efeitos colaterais tão sérios. (Covino & Vassalo, 1985).

A identificação química da cocaína como éster do ácido benzóico conduziu à síntese de numerosos compostos, que são basicamente ésteres derivados de ácido benzóico (Covino & Vassalo, 1985).

A benzocaína, um anestésico local com baixa solubilidade em água, foi identificada por Ritsert em 1890. Devido à sua pouca solubilidade em água, que limita sua utilização para injeção, este composto permaneceu esquecido por muitos anos. Finalmente, a benzocaína foi reconhecida como anestésico tópico eficaz, permanecendo atualmente como uma droga valiosa para a obtenção de anestesia de superfície das membranas mucosas (Covino & Vassalo, 1985).

Em 1905, Eihorn e Braun relataram a síntese da procaína, um éster do ácido para-aminobenzóico. A procaína era suficientemente hidrossolúvel em solução, possuindo uma margem de segurança local e sistêmica aceitável para

uso clínico, como agente injetável e anestesia regional (Covino & Vassalo, 1985; Hondeghem & Miller, 1994).

Após o lançamento da procaína, vários compostos similares foram sintetizados. A tetracaína, o mais potente da série dos ésteres do ácido para-aminobenzóico, surgiu em 1930. A cloroprocaína, o menos tóxico deste grupo químico, foi descrita pela primeira vez em 1952. Estes dois derivados do ácido para-aminobenzóico ainda são largamente usados clinicamente como anestésicos locais (Covino & Vassalo, 1985).

Até meados do século XX, a maioria dos compostos anestésicos locais sintetizados era de derivados do ácido benzóico. Infelizmente, a maior desvantagem das substâncias deste grupo químico tem sido sua tendência a produzir reações alérgicas, tipo sensibilização (Covino & Vassalo, 1985).

Uma grande descoberta na química dos anestésicos locais aconteceu em 1943, com a síntese da lidocaína por Lofgren. A lidocaína representou a maior descoberta química, em relação às drogas anestésicas locais anteriores, pois não era um éster, mas uma amida derivada do ácido dietilaminoacético. Os compostos do tipo amida são relativamente livres de reações de sensibilização. Todos os novos anestésicos locais introduzidos na prática clínica têm sido de estrutura básica do tipo amida. A mepivacaína, prilocaína, etidocaína e ropivacaína são aquisições posteriores dos anestésicos locais do tipo amida (Hondeghem & Miller, 1994).

Até hoje, não há substâncias oriundas de animais que são utilizadas como anestésicos locais.

### 1.2.2 - Estrutura Química

A maioria dos agentes anestésicos locais empregados clinicamente é constituída por um radical lipofílico e outro hidrofílico, unidos por uma cadeia intermediária (Borba, 1992).

A parte lipofílica é o radical aromático da molécula, responsável por sua penetração no nervo. Entre os exemplos de radicais aromáticos estão o ácido benzóico (cocaína, benzocaína), o ácido para-aminobenzóico (procaína, cloroprocaína) ou a xilidina (lidocaína, bupivacaína). O ácido para-aminobenzóico, sendo uma molécula pequena, pode funcionar como hapteno e determinar reações alérgicas. A xilidina praticamente não determina tais reações (Carvalho, 1994).

A cadeia intermediária é o esqueleto da molécula do anestésico. Variações da cadeia intermediária levam a variações tanto da potência como da toxicidade dos anestésicos locais (Hondegghem & Miller, 1994).

O grupo hidrofílico da molécula é uma amina secundária ou terciária. É a porção ionizável da molécula que sofre influência do pH do meio (Pereira, 1996).

De acordo com a natureza da ligação entre o anel aromático e o grupamento amina (figura 3), os anestésicos locais são divididos em dois grandes grupos: éster e amida (Borba, 1992). As principais diferenças entre o

grupo éster e o grupo amida relacionam-se ao local e ao tipo de metabolização, bem como ao potencial para produzir reações alérgicas (Pereira, 1996).

Os anestésicos locais são bases fracas, portanto insolúveis em água. Para que se tornem hidrossolúveis são feitos reagir com o ácido clorídrico. Desta forma, em um frasco de anestésico local, tem-se a droga sob a forma de cloridrato, em solução aquosa (Catchlove, 1972; Bokesh, 1987).

O peso molecular dos diferentes agentes anestésicos locais varia de 220 a 228 Da. Este fato é responsável pelas pequenas diferenças em seu coeficiente de difusão aquosa, uma vez que este valor é inversamente relacionado à raiz quadrada do peso molecular (Pereira, 1996).

A lipossolubilidade parece ser o principal determinante da potência anestésica. O axolema é composto de 90% de lípidos e 10% de proteínas. Como resultado, compostos químicos altamente lipofílicos tendem a penetrar na membrana nervosa mais facilmente, atingindo o número de moléculas necessárias para obtenção do bloqueio de condução nervosa (Pereira, 1996).

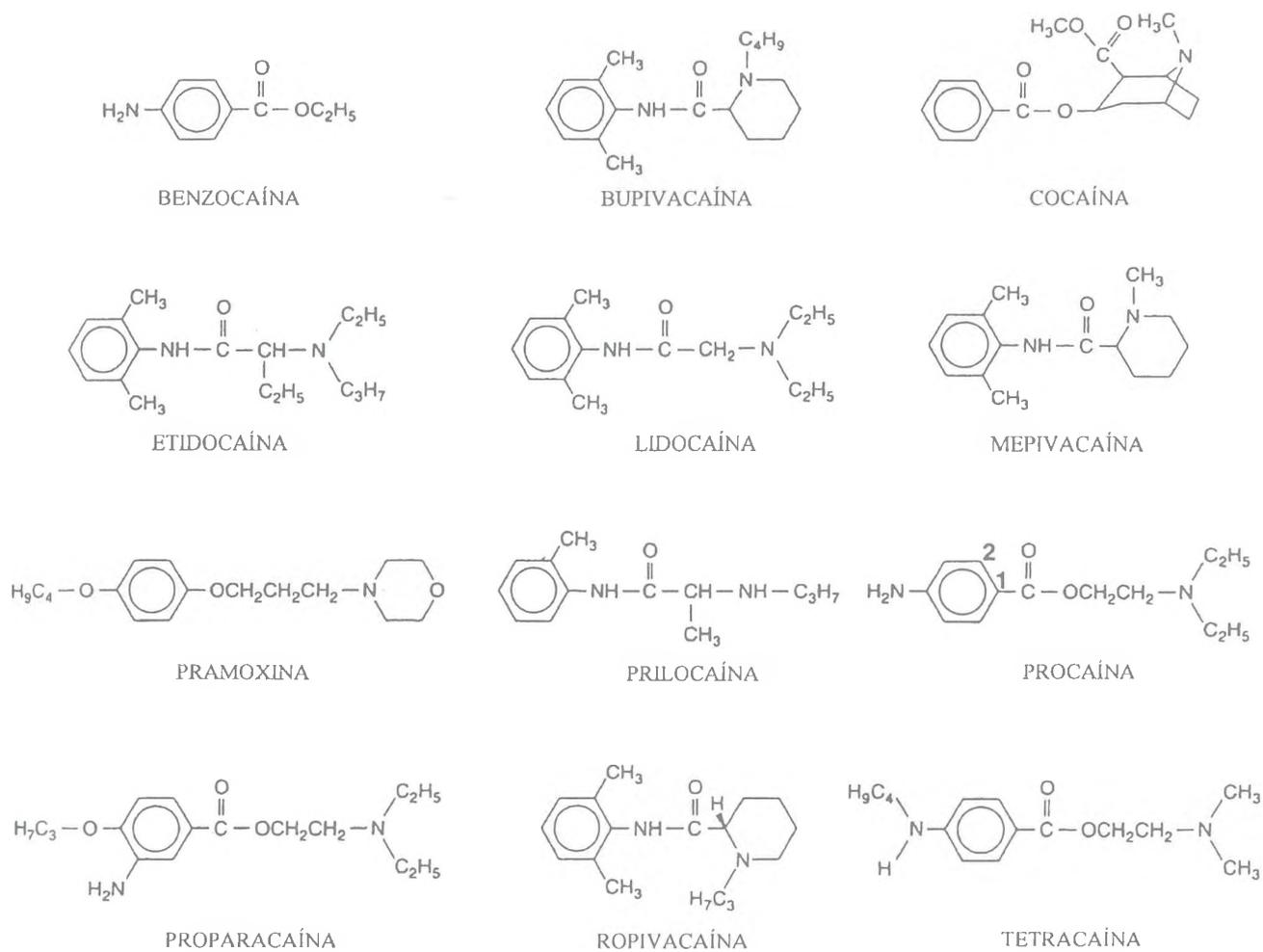


Figura 3. Fórmulas estruturais de anestésicos locais usados na clínica

(Fonte: Barash, P.G., Cullen, B.F., Stoelting, R.K., Clinical Anesthesia)

O início do bloqueio de condução em nervos isolados é determinado, primariamente, pelo pKa de cada anestésico individualmente. O pKa de um composto químico é o valor do pH no qual as formas ionizadas e não-ionizadas estão presentes em quantidades iguais. A forma eletricamente não carregada de um agente é responsável pela difusão através das bainhas nervosas e membrana neuronal e o início da ação está diretamente ligado à proporção do composto que existe nesta forma (Eckenstam, 1966; Wildsmith et al., 1987; Pereira, 1996).

### **1.2.3 Substâncias exóticas com atividade anestésica local**

Existem compostos que apresentam atividade como anestésicos locais e que fogem à estrutura comum a esta classe de drogas. Tal grupo inclui benzocaína e butamben (ésteres do ácido p-aminobenzoico, como a procaína), mas aos quais falta o grupo amino terminal (Borba, 1992)

Há algumas biotoxinas que possuem atividade anestésica local potente. A tetrodotoxina e saxitoxina incluem moléculas do tipo guanidina (Rang et al., 1995).

A tetrodotoxina (TTX) é extraída dos ovários e outros órgãos de peixes da família dos tetraodontídeos, teleósteos, da ordem dos plectognatos, cujos maxilares são guarnecidos por placas e divididos ao meio. No Brasil é conhecido por uma série de nomes derivados da denominação principal baiacu, assim denominado porque quando em perigo insufla-se, tornando-se quase uma

esfera espinhosa. O “puffer fish” é mais encontrado ao longo das costas do Japão (Fuhrman, 1967; Covino & Vassalo, 1985; Borba, 1992). A TTX também é encontrada em urodelos (Toledo & Jared, 1995).

A saxitoxina (STX) é produzida por algas dinoflageladas marinhas da espécie *Gonyaulax*, quando presentes em grandes quantidades na água dos oceanos causam o fenômeno da maré vermelha. Os mariscos contaminados pelas algas causam paralisia no homem por envenenamento (Borba, 1992).

#### **1.2.4- Eletrofisiologia do nervo**

Os sinais que passam de neurônio a neurônio são de natureza elétrica. Estes sinais elétricos ocorrem como mudanças transitórias nas diferenças de potencial elétrico através da membrana dos neurônios. Tais potenciais são gerados por gradientes iônicos. O citoplasma de um neurônio em repouso tem baixas concentrações de sódio e cloro e alta concentração de potássio, em relação ao fluido extracelular (Carvalho, 1994).

Um microeletrodo inserido no axoplasma de uma célula nervosa, em repouso, registra uma diferença de potencial de aproximadamente -60 mV. No estado de repouso, a membrana é totalmente permeável ao potássio e praticamente impermeável ao sódio. A alta concentração de potássio intracelular é mantida por forças de atração de cargas negativas, principalmente protéicas. O potencial de repouso de uma célula é fundamentalmente dado pela relação intracelular/extracelular de potássio (Carvalho, 1994; Garrett & Grisham, 1995).

Com a ativação da membrana por qualquer estímulo físico, químico ou elétrico, aumenta progressivamente a permeabilidade ao sódio e o potencial transmembrana se torna menos negativo, até atingir o potencial de deflagração, quando a permeabilidade ao sódio aumenta muito. Desencadeia-se neste momento o potencial de ação. Como consequência dessa grande entrada de carga positiva para o meio intracelular, inverte-se a polaridade da célula, que agora contém mais cargas positivas dentro que fora da célula. Um eletrodo colocado no meio intracelular registra uma diferença de potencial positiva (Carvalho, 1994).

Ao término da fase de despolarização, a permeabilidade da membrana celular aos íons sódio diminui e a permeabilidade ao potássio é elevada grandemente. O potássio se move para fora da célula, o que produz repolarização da membrana, até que o equilíbrio eletroquímico e o potencial de repouso sejam atingidos. O fluxo de sódio para o interior da célula durante a despolarização, e de íons de potássio para fora durante a repolarização são fenômenos passivos, pois cada íon está se movendo no sentido do gradiente de concentração (Covino & Vassalo, 1985).

Após retorno do potencial de membrana ao nível de repouso, um pequeno excesso de íons sódio encontra-se no interior da célula, enquanto que um pequeno excesso de potássio permanece no exterior da célula nervosa. Apesar do processo de excitação haver terminado e a célula se encontrar em repouso elétrico, inicia-se um período metabolicamente ativo. A restauração de um gradiente iônico normal, através da membrana, requer um gasto energético

para o transporte ativo dos íons, contra um gradiente de concentração (Covino & Vassalo, 1985). Esse transporte ativo dos íons é possível através do funcionamento do que se denomina bomba de sódio-potássio. A bomba funciona levando os íons sódio para o exterior e os íons potássio para o interior da célula, isto restabelece as diferenças de concentração entre o interior e o exterior da membrana (Garrett & Grisham, 1995).

### **1.2.5- Mecanismo de ação dos Anestésicos locais**

Embora os anestésicos locais alterem a condutância aos íons potássio e cálcio através das membranas excitáveis, a inibição de influxo dos íons sódio através da membrana celular neuronal é o mecanismo de ação pelo qual todos os anestésicos locais produzem bloqueio do impulso nervoso (Courtney, 1987; Carpenter & Mackey, 1997).

Os anestésicos locais bloqueiam a geração e condução dos impulsos nervosos na membrana celular diminuindo, ou até mesmo impedindo, o grande influxo de íons sódio que ocorre com a despolarização da membrana (Borba, 1992). O potencial de membrana de repouso permanece inalterado, mas o aumento da permeabilidade de sódio associado ao impulso nervoso é inibido.

Desde que muitos compostos químicos exibem atividade anestésica local, é improvável que todos bloqueiem a condutância ao sódio da mesma maneira (Gissen et al., 1980; Carpenter & Mackey, 1997).

Diversas teorias tentam explicar o mecanismo de ação dos anestésicos locais. Elas incluem: inibição de influxo de sódio mediado pelo cálcio; interferência com a permeabilidade da membrana por expansão do volume da membrana; mudanças de carga na superfície do axolema e interação com receptor específico na membrana neuronal (Carpenter & Mackey, 1997).

O deslocamento do cálcio do sítio da membrana que controla a permeabilidade ao sódio tem sido advogado como mecanismo da atividade anestésica local. Aumentando-se a concentração do íon cálcio ao redor do nervo, pode-se antagonizar o bloqueio anestésico local, enquanto que diminuindo-se a concentração do íon pode-se potencializar o bloqueio. Isso sugere uma competição entre o anestésico local e o cálcio ligado à membrana (Pereira, 1996).

A teoria da expansão da membrana propõe que a interação de moléculas anestésicas locais relativamente hidrofóbicas com lipídios de membrana causa uma alteração conformacional na organização dos lipídios da membrana, resultando em expansão da membrana. A permeabilidade diminuída ao sódio poderia ocorrer por um aumento na pressão lateral na membrana, que comprimiria diretamente os canais de sódio, ou por mudança conformacional nas proteínas dos canais de sódio causado por um aumento no grau de desordem das moléculas lipídicas da membrana. Esta é essencialmente uma extensão da teoria de Meyer-Overton para anestésicos gerais e supõe um sítio de ação intramembrana para os anestésicos locais (Savarese & Covino, 1984).

O conceito de expansão da membrana é prontamente aplicável à ação de substâncias neutras como a benzocaína, mas não explica a atividade anestésica local de moléculas carregadas (Savarese & Covino, 1984).

O terceiro mecanismo de ação proposto envolve a indução de alterações na carga de superfície de membrana. As moléculas da membrana neuronal contêm extremidades hidrofílicas, aniônicas que estão dispostas nas superfícies externa (extracelular) e interna (axoplasmática) da membrana, ambas as superfícies do axolema são negativamente carregadas em relação ao interior da membrana. Essas cargas negativas atraem cátions, tais como sódio e cálcio. Tais cargas podem atrair as moléculas anestésicas locais, alinhando a molécula anestésica local carregada, hidrofílica na interface água-membrana e a porção aromática, não polar na membrana lipídica (Carpenter & Mackey, 1997).

A quarta teoria do mecanismo da ação dos agentes anestésicos locais propõe que eles interagem diretamente com sítios de ligação específicos dentro de canais de sódio (Butterworth & Strichartz, 1990).

Há um número considerável de dados de *clampeamento* de voltagem em nervos de vertebrados e lulas, tudo em favor do mecanismo do bloqueio dos canais de sódio. Durante vários anos, foi observado que a atividade anestésica local é fortemente pH-dependente, isto é, ocorre quando a proporção de moléculas ionizadas é pequena. Isto foi considerado como indicação de que a molécula não carregada era a espécie biologicamente ativa (Ritchie &

Greengar, 1966), mas posteriormente foi demonstrado que esta pH-dependência era revertida se a bainha de tecido conjuntivo que circunda os axônios fosse removida. Assim, as espécies não carregadas eram necessárias para a penetração na bainha, mas as espécies catiônicas poderiam ser biologicamente ativas (Narahashi & Yamada, 1969; Frazier et al., 1969; Narahashi et al., 1969; Narahashi & Frazier, 1971).

Estudos em axônios de lula, que podem ser perfundidos internamente com soluções farmacológicas e também expostos externamente, resolveram o problema mostrando que é a espécie catiônica a porção ativa, mas que funciona a partir da superfície interna, e não externa, da membrana.(Rang et al.,1995).

Os anestésicos locais convencionais, que são aminas terciárias ou secundárias, atravessam a bainha e a membrana axonal na forma não carregada, mas atuam a partir da superfície interna da membrana axonal na forma catiônica (Rang et al., 1995).

A pH-dependência pode ser clinicamente importante, desde que tecidos inflamados são frequentemente ácidos, e de algum modo resistentes aos anestésicos locais (Rang et al., 1995).

A análise posterior da ação do anestésico local mostrou a propriedade de bloqueio uso-dependente dos canais de sódio e também afetam, em parte, o controle dos canais. A uso-dependência significa que quanto mais abertos os canais, maior se torna o bloqueio. Com os anestésicos locais quaternários

funcionando a partir do interior da membrana, Strichartz em 1973 mostrou claramente que os canais precisam passar repetidamente por seu estado aberto. Por outro lado, com os anestésicos locais terciários pode haver desenvolvimento de bloqueio, mesmo que os canais não estejam abertos (Rang et al., 1995).

Os canais de sódio do cérebro de mamíferos são complexos heterotriméricos de proteínas glicosiladas. A subunidade  $\alpha$  apresenta 260 kDa, a  $\beta_1$  36 kDa e a  $\beta_2$  33 kDa. As subunidades  $\alpha$  e  $\beta_2$  são covalentemente ligadas por pontes de dissulfetos, enquanto a  $\beta_1$  está associada não covalentemente. A grande subunidade alfa do canal de sódio contém quatro domínios (I a IV) e cada domínio apresenta seis segmentos transmembrana (S1 a S6) em configuração alfa-helicoidal. Cada domínio apresenta 300 a 400 aminoácidos, com 50% de conservação na sequência de aminoácidos (Catterall, 1992; Garrett & Grisham, 1995; Catterall & Mackie, 1996).

Há uma hipótese de que a abertura de um canal voltagem-dependente reflita as alterações conformacionais que resultam do movimento das cargas do portão (sensores de voltagem) em resposta às mudanças no potencial transmembrana. As cargas do portão estão localizadas nas hélices dos segmentos S4, que são hidrofóbicas e têm cargas positivas, e contêm resíduos de lisina ou arginina em cada terceira posição. Esses poderiam mover-se, causando uma série de alterações na configuração dos quatro domínios, levando ao estado aberto do canal (Garrett & Grisham, 1995; Hille & Catterall, 1995; Catterall & Mackie, 1996).

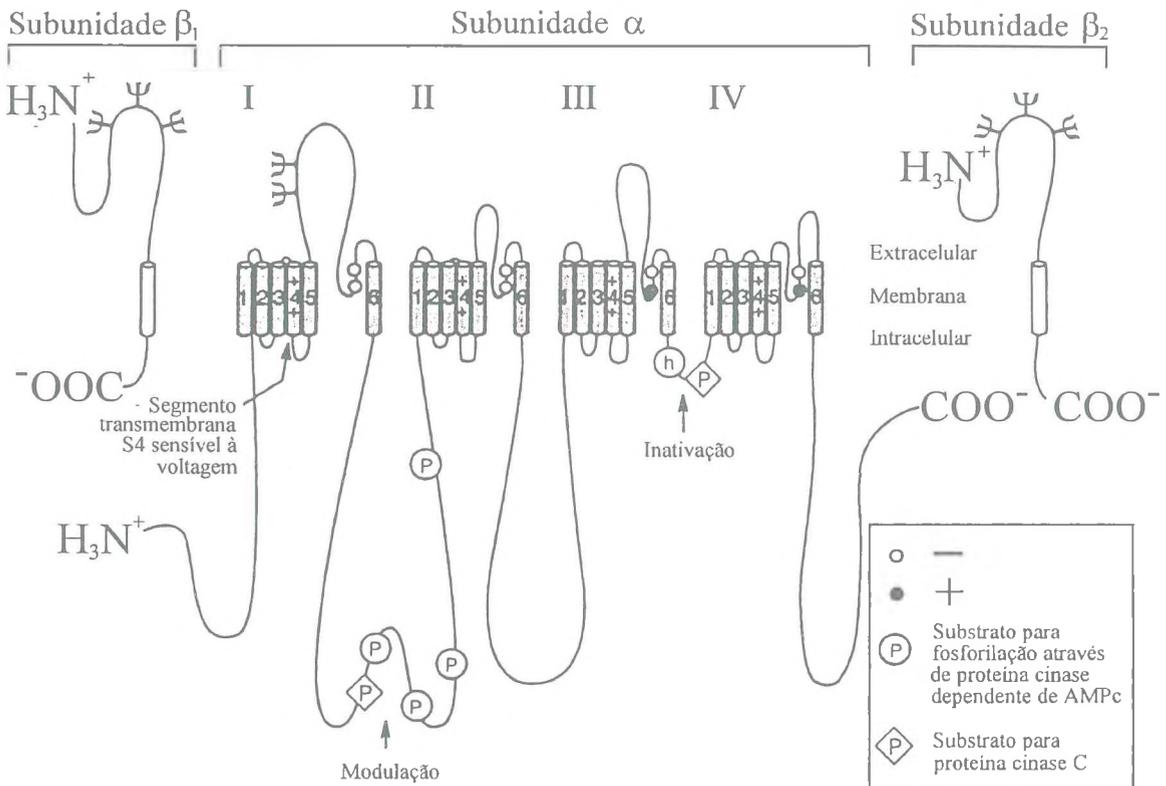


Figura 4. Representação bidimensional das subunidades  $\alpha$  (centro),  $\beta_1$  (esquerda) e  $\beta_2$  (direita) do canal de sódio sensível à voltagem no cérebro de mamíferos.

(Fonte: Hardman, J.G., Gilman, <sup>a</sup>G., Limbird, L.E., Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics)

Acredita-se que os segmentos transmembrana S5 e S6 e as alças curtas associadas à membrana SS1 e SS2 sejam as paredes do poro no centro de uma formação quadrada aproximadamente simétrica dos quatro domínios homólogos. Os resíduos de aminoácidos nesses segmentos curtos são os determinantes mais críticos da condutância do íon e da seletividade do canal (Catterall, 1992; Hille & Catterall, 1995; Catterall & Mackie, 1996).

Após aberto, o canal de sódio se inativa dentro de poucos milissegundos. A alça curta intracelular que conecta os domínios homólogos III e IV serve como um portão de inativação do canal de sódio. A alça pode dobrar-se sobre a borda intracelular do poro transmembrana durante o processo de inativação. Pode ligar-se a um receptor do portão de inativação formado pela borda intracelular do poro (Catterall & Mackie, 1996).

Os resíduos de aminoácidos importantes para a ligação dos anestésicos locais são encontrados no segmento S6 no domínio IV. Os resíduos dos aminoácidos próximos ao centro e à terminação intracelular do segmento S6 interagem diretamente com os anestésicos locais ligados (Catterall & Mackie, 1996).

Tetrodotoxina e saxitoxina são exemplos de outras moléculas que especificamente se ligam aos canais de sódio e interagem diretamente com o lado exterior dos canais de sódio para bloquear a condutância aos íons sódio. O íon guanidínio é capaz de penetrar nas células através dos canais de sódio, e esta parte da molécula da TTX ou STX se aloja no canal, deixando o restante

da molécula bloqueando o orifício externo. Ao contrário dos anestésicos locais, não há interação entre as reações de portão e bloqueio com TTX ou STX, sua associação e dissociação são independentes do fato do canal estar aberto ou fechado (Rang et al., 1995).

Existe um grande número de toxinas bloqueadoras dos canais de sódio, com diferentes modalidades de interação com o canal. Veratridine, um alcalóide esteroidal, tem se mostrado inibir preferencialmente as fibras C de maneira frequência-dependente. Embora toxinas, tais como veratridine, não sejam importantes clinicamente no presente como anestésicos locais, investigações posteriores dessas substâncias podem produzir novas classes de anestésicos locais que preferencialmente bloqueiem as vias nociceptivas (Carpenter & Mackey, 1997).

### **1.2.6 - Farmacocinética**

Como os anestésicos locais são aplicados diretamente onde exercem sua ação, não necessitam ser transportados pela circulação sistêmica para atingirem seu órgão-alvo. Somente o término de seu efeito está relacionado a fenômenos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (Tucker et al., 1972; Pereira, 1996).

Para garantir boa qualidade de bloqueio nervoso, duração adequada e menor toxicidade, é fundamental que se controle a absorção a partir de seu local de aplicação (Carvalho, 1994).

Os fatores mais importantes relacionados à absorção dos anestésicos locais são: local de injeção, dose, associação com vasoconstritor e propriedades farmacológicas da droga (Carvalho, 1994; Pereira, 1996).

Injeções múltiplas, vascularização intensa, presença ou não de tecido adiposo na região do bloqueio podem explicar as diferentes concentrações sanguíneas de uma mesma droga segundo a técnica regional empregada (Pereira, 1996).

Existe uma correlação direta entre a dose total empregada e o consequente nível sanguíneo de anestésico local. A associação de vasoconstritor pode reduzir a velocidade de absorção e aumentar a duração de ação. A incidência de fenômenos de intoxicação é menor quando se utiliza a adrenalina na concentração de 5 µg/ml (Carvalho, 1994; Pereira, 1996).

A velocidade de absorção é também determinada pelas propriedades farmacológicas de cada droga. Uma comparação entre agentes equipotentes revela que a lidocaína e a mepivacaína apresentam níveis sanguíneos muito próximos, porém a prilocaína apresenta níveis significativamente menores devido à sua ação vasodilatadora menos potente (Pereira, 1996).

Uma vez que os anestésicos locais sejam absorvidos, dois fenômenos acontecem: ligação com proteínas plasmáticas e distribuição para os tecidos (Carvalho, 1994).

Quantidades significativas dessas drogas ligam-se às proteínas plasmáticas, entre elas a específica  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida, ligante de amidas, e a menos específica e mais importante quantitativamente a albumina (Denson et al., 1984). A afinidade às proteínas plasmáticas pode limitar a quantidade de anestésico local livre, diminuindo sua toxicidade (Pereira, 1996).

A fração livre determina a fração tecidual da droga, que é a que vai exercer os efeitos tóxicos. O volume de distribuição do anestésico é também importante. Por exemplo, a fração livre da lidocaína é muito maior do que a da bupivacaína, porém sua fração tecidual é menor, e isso acontece porque o volume de distribuição da lidocaína é maior, assim como sua depuração (Carvalho, 1994).

A maioria dos anestésicos locais do tipo éster é rapidamente hidrolisada pela colinesterase plasmática, parcialmente por esterases das paredes das hemácias e, em menor grau, sofrem ataque das esterases hepáticas (Borba, 1992; Rang et al., 1995).

Como a ligação do tipo amida é muito estável no sangue, a metabolização desses agentes só ocorre no fígado. Através de alguns produtos de sua biotransformação pode-se inferir três mecanismos envolvidos: hidroxilação aromática, N-dealquilação e hidrólise de amida (Pereira, 1995).

### 1.2.7- Toxicidade

Os anestésicos locais são relativamente desprovidos de efeitos colaterais, se administrados em região anatômica apropriada e em dosagens adequadas (Pereira, 1996).

As reações alérgicas são raras, especialmente com os amídicos, mas quando ocorrem colocam a vida em risco. Os aminoésteres são mais alergênicos do que as aminoamidas, porque suas moléculas têm relação com o ácido para-aminobenzóico (Nagel et al., 1977; Hutter, 1990; Carpenter & Mackey, 1997).

O anestésico local é sempre um depressor da membrana celular, e embora fenômenos excitatórios estejam presentes no quadro de intoxicação, eles traduzem sempre uma depressão do SNC. Uma função harmoniosa do SNC pressupõe um equilíbrio entre os circuitos neuronais inibitórios e excitatórios. Com a elevação da concentração do anestésico no SNC, há uma depressão dos circuitos, mas a depressão dos inibitórios predomina, assim manifestam-se os fenômenos de excitação, inclusive a convulsão (Wagman et al., 1967; Liu et al., 1983; Carvalho, 1994).

Concentrações extremamente elevadas de anestésicos locais deprimem a atividade de marcapasso do nó sinoatrial, resultando em bradicardia e até parada cardíaca. Eles também exercem um profundo efeito depressor sobre a mecânica do miocárdio e vasodilatação. Colapso cardiovascular súbito pode

ocorrer quase que imediatamente após a injeção rápida de um anestésico local. A ressuscitação é geralmente difícil e demorada (Clarkson & Hondeghem, 1985; Kasten & Martin, 1985; Thomas et al., 1986).

### 1.3- OBJETIVOS

Doces são os frutos da adversidade, semelhantes ao sapo, que feio e venenoso, usa uma jóia preciosa na cabeça (Shakespeare, 1599). Assim, vários são os relatos na literatura, nas artes, na religião, aplicações linguísticas e medicina popular (Lazarus & Attila, 1993).

Há muitas descrições sobre o uso terapêutico da secreção cutânea do sapo. Nos séculos dezessete e dezoito, venenos de sapo foram usados como diurético contra edema. Na Ásia, as secreções do sapo ainda são utilizadas com este propósito. O veneno foi usado para estimular a cicatrização de tecidos, no tratamento de doenças cardíacas, menorragia, metrorragia e tumores malignos (Toledo & Jared, 1995).

O *Ch'an Su* é uma mistura de componentes da secreção das glândulas da pele do *Bufo gargarizans*, que foi transformada em pílula de ingredientes de efeitos mágicos. O *Ch'an Su* é utilizado em medicina popular no tratamento de tonsilite, sinusite, dor de dente, etc. Ele possui atividade antimicrobiana. Em altas doses, é extremamente tóxico, resultando em envenenamento com

arritmias cardíacas, insuficiência respiratória, convulsões, coma e outros efeitos severos (Hong et al., 1992; Toledo & Jared, 1995).

Uma atividade anestésica local tem sido descrita em muitas frações de venenos de anfíbios (Toledo & Jared, 1995). Entretanto, a substância responsável por essa atividade não foi identificada até o presente momento.

Os objetivos do presente trabalho foram:

1. Isolar a substância responsável pela atividade anestésica local do veneno das glândulas paratóides do *Bufo paracnemis*;
2. Realizar os estudos farmacológicos dessa substância purificada;
3. Determinar a sua estrutura química.

## 2. MATERIAL

### 2.1- Animais

Foram utilizados camundongos albinos variedade Swiss, adultos, sexo masculino, pesando em torno de 25-30 g, oriundos do Biotério Central e do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Todos foram mantidos à temperatura ambiente, recebendo ração padrão e água “ad libitum”.

Sapos, *Bufo* grupo *paracnemis*, Lutz, provenientes das cidades circunvizinhas da área metropolitana de Fortaleza, Ceará.

Coelhos, adultos, machos, oriundos do Biotério Central e do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, mantidos à temperatura ambiente, recebendo ração e água “ad libitum”.

### 2.2- Aparelhos

HPLC (Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) - modelo SCL-10A, SPD-10AV, LC-10AS, Shimadzu - Japão

HPLC - modelo SPD-10A, LC-10AS, Shimadzu - Japão

Chromatopac C-R6A, Shimadzu, Japão

Registrador EGB - SP, Brasil

Centrífuga refrigerada - Beckman, modelo J-212C, Beckman Instruments,  
USA

Centrífuga excelsa Baby, modelo 206-FANEM

Coluna shim pack Prep. ODS(H)

Coluna C-18 LC shim-pack CLC-ODS

Liofilizador Metal lux

Estimulador de Nervo periférico

Quimógrafo Zimmermann

Banho-Maria Soc. Fabbe Ltda.

Tábua de fixação

Estilete para deslocamento cervical

Caixa básica cirúrgica (tesouras e pinças)

Luvas cirúrgicas

Linha de algodão

Seringas de 1 ml e 10 ml

Microseringas de 50 ul e 500 ul

Papel de registro

Papel Imperfax

Tubos Eppendorf - Gilson, França

Pipetas - Gilson, França

Ponteiras - Gilson, França

Pena para quimógrafo

Tubos de ensaio

Erlenmayer

Placa de Petri

Tubos de centrífuga

Carbogênio

Aerador

### 2.3- Soluções

- Solução salina

NaCl 154

- Solução de Ringer

NaCl 111,2; KCl 1,8; CaCl<sub>2</sub> 1,0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,07; NaHCO<sub>3</sub> 2,38; Glicose

11,1

- Solução de Tyrode

NaCl 136; KCl 5; MgCl<sub>2</sub> 0,98; CaCl<sub>2</sub> 2, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,36; NaHCO<sub>3</sub> 11,9;

Glicose 5,5

### 2.4- Drogas e Reagentes

Acetonitrila - Carlo Erba

Ácido clorídrico P.A., Merck, Brasil

Ácido trifluoroacético P.A., Merck, Brasil

Álcool etílico P.A., Merck, Brasil

Cloreto de sódio P.A., Reagen, Brasil

Cloridrato de acetilcolina, Reagen, Brasil

Formaldeído, Merck, Brasil

Glicose, Reagen, Brasil

## 3. MÉTODOS

### 3.1 Extração

Os animais utilizados foram sapos, *Bufo paracnemis*, coletados nas diferentes épocas do ano, inverno e verão. Foi extraído veneno, por compressão das glândulas parotóides dos sapos, e colocado em placas de Petri. O veneno foi dissolvido em etanol (1:5; p:v) e foi mantido a 4 °C durante 24 horas. A mistura foi centrifugada a 5000 g por 30 minutos e o material precipitado foi descartado.

### 3.2- Purificação em HPLC com Coluna Preparativa

O sobrenadante foi fracionado em HPLC ( sistema de cromatografia líquida de alta eficiência) acoplado a uma coluna preparativa C-18 (shim pack prep. ODS 2,5x30 cm), eluído com um fluxo de 7 ml/min com um gradiente isocrático de acetonitrila a 40%. O material passou por um detector que usou uma absorção de luz ultravioleta com um comprimento de onda de 214 nm (Figura 5). O sistema foi acoplado a um registrador e os picos, à medida que eluíam, eram coletados e liofilizados. Para a realização dos testes farmacológicos, o pó era ressuspenso em etanol e água bidestilada na proporção 1:1 (v:v) na concentração de 0,5 mg/ml.



Figura 5. HPLC (Sistema de cromatografia Líquida de Alta Eficiência) .

### **3.3 Determinação do grau de pureza em HPLC com coluna analítica**

Antes de se realizarem estudos farmacológicos, uma fração do pico 2 (20 µl de solução a 0,5 mg/ml com etanol e água bidestilada (1:1; v:v) foi injetada no HPLC em uma coluna fina, analítica específica, eluída em um fluxo de 1 ml/min com um gradiente de 20 a 40% de acetonitrila durante 35 minutos. O material passou por um detector que usou uma absorção de luz ultravioleta com um comprimento de onda de 214 nm.

### **3.4- Toxicidade**

A toxicidade e os efeitos comportamentais foram determinados por injeção intraperitoneal do fator, pico 2, em camundongos Swiss (25-30 g), escolhidos aleatoriamente e mantidos em jejum por 12 horas. As doses foram administradas 1, 5, 10, 50 e 100 mg/kg. O grupo controle recebeu igual volume de veículo (etanol a 50% em água bidestilada). Os animais foram observados nos primeiros 15 minutos e então em 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min após a administração do fator, e após dois dias.

Os parâmetros observados foram atividade motora geral espontânea, respiração, ataxia, estereotipia, catalepsia, tremores, convulsões tônicas ou clônicas, sedação, ptose, exoftalmia, contorção, defecação, urina, salivação, lacrimejamento, piloereção, cianose, anestesia, analgesia, coma e morte.

### **3.5 Determinação da DL<sub>50</sub>**

Foram selecionados camundongos, pesando 25-30 g, divididos em cinco grupos de dez animais ( 5 machos e 5 fêmeas). Foram administradas doses de 20, 40, 50, 60 e 70 mg/kg do peso de cada camundongo. O volume de todas as doses injetadas intraperitonealmente foi de 0,1 ml/10 g do peso do animal. O número total de camundongos mortos foi anotado. A DL<sub>50</sub> foi aquela dose administrada que causou metade (50%) das mortes dos camundongos de um determinado grupo.

### **3.6- Exame macroscópico de órgãos**

Alguns órgãos foram isolados nos animais que apresentaram óbito. Os órgãos escolhidos foram os pulmões, coração, rins e pele, além de uma revisão da cavidade abdominal.

### **3.7- Frênico-diafragma isolado de rato**

A preparação do frênico-diafragma isolado de rato é um valioso método de estudo da junção neuromuscular. Depois de morto por estrangulamento, o animal foi fixado a uma tábua de madeira. Abriu-se a cavidade abdominal. Após a identificação do diafragma, o esterno foi cortado pelos seus bordos laterais até a fúrcula esternal. O nervo foi identificado, sendo mais utilizado o do lado direito. Um fio de algodão foi passado por baixo do nervo, que foi amarrado e seccionado. Depois o diafragma foi dissecado totalmente, deixando o arco costal

do lado direito. Assim, obteve-se um hemidiafragma com seu respectivo nervo frênico. A preparação foi gaseificada com CO<sub>2</sub> 5% e O<sub>2</sub> 95%. A porção do músculo presa à costela foi fixada com um suporte de vidro. No centro frênico foi passado um fio, com auxílio de uma agulha de sutura, que foi amarrado a uma alavanca inscritora, acoplada a um quimógrafo. O nervo frênico foi colocado sobre um eletrodo apropriado de um estimulador de nervo para estimular a contração do músculo. O volume do banho total foi de 10 ml. Os estímulos foram de 0,1 ms, 8 a 10 por minutos e de 6 mV (Câmara, 1967; Rocha e Silva, 1968).

Foram realizados seis experimentos. O etanol, solvente do fator, foi o controle em uma mistura com água bidestilada. O fator foi utilizado nas doses de 10 µg/ml, 40 µg/ml e 80 µg/ml. O estimulador no frênico teve uma duração de 0,1 ms, 6 mV e 10 estímulos por minuto.

### **3.8- Reto Abdominal**

A preparação do músculo reto abdominal de sapo, ou de rã, é muito importante na determinação de drogas curarizantes, ou bloqueadoras neuromusculares. Para avaliar se o fator apresenta tal mecanismo, utilizou-se esta técnica. Houve uma suspeita pela presença de dificuldade de deambular e de apnéia quando utilizadas elevadas doses.

Depois de se destruir o Sistema Nervoso Central, o animal foi fixado sobre uma tábua de madeira em decúbito dorsal. A pele, que recobre a parede anterior do abdomen, foi aberta e dissecada por divulsão, a fim de separá-la dos músculos.

Identificou-se a inserção dos músculos retos abdominais. Em seguida, as porções proximais dos músculos foram amarradas com fio de algodão ao nível do púbis. Foi cortada a inserção do tendão, e com tesoura, os músculos foram dissecados até a inserção costal. As porções próximas ao esterno foram amarradas. Cada músculo foi utilizado para uma avaliação.

O músculo retirado foi colocado em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Ringer para batráquio. O músculo foi isolado de sua aponeurose. Depois foi transferido para uma câmara muscular contendo 10 ml de solução nutritiva, aerada e mantida à temperatura ambiente. A porção muscular proximal ao púbis foi amarrada na haste de um borbulhador e a porção distal, na alavanca de uma pena inscritora. O registro das contrações musculares foi realizado em um quimógrafo, sendo o órgão submetido a uma tensão de 2 g e deixado em repouso durante 30 minutos.

As doses do fator foram 1 µg, 10 µg e 20 µg. O controle consistiu na administração de etanol e água bidestilada na proporção de 1:1 (v:v). Foram realizados um total de seis experimentos.

### **3.9 Teste da Córnea do Coelho**

Foram escolhidos coelhos, machos, aleatoriamente, com um número total de seis. A seguir passou-se a instilar no olho direito cinco gotas do veículo ( etanol a 50% em água bidestilada); no olho esquerdo, foram instiladas cinco gotas do fator a 1% (etanol 50% em água destilada como solvente). Os resultados foram

considerados válidos quando se tinha certeza de que a instilação foi realizada com cuidado no saco conjuntival.

Após o primeiro minuto, foi testado o reflexo córneo-palpebral com auxílio de um penço de algodão. Esta pesquisa foi feita em ambos os olhos, no intuito de comparar com o controle. Continuou-se pesquisando o reflexo a cada cinco minutos, até que voltasse a responder normalmente (Câmara, 1967).

### **3.10- Canal Deferente de camundongo**

Contrações por estimulação de nervos intramurais têm sido evidenciados em canal deferente de camundongos (Henderson, Hughes & Kosterlitz, 1972).

Camundongos Swiss(25-30 g), machos, foram mortos por estrangulamento. Ambos os vasos deferentes foram dissecados, conectados por tecido na junção com a vesícula seminal. Foram retirados cuidadosamente gordura, tecido conectivo e vasos sanguíneos, e então gentilmente pressionado para expelir seu conteúdo seminal (Hughes et al., 1975).

Os nervos intramurais foram estimulados por estimulação elétrica de 0,1-0,15 Hz, 1 ms. Contrações foram gravadas durante estimulação por ligação do terminal superior da preparação, conectado a um transdutor isométrico. Os tecidos foram colocados em banho com solução de MacEwen, gaseificados com 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> (Figura 6).

No experimento, colocou-se etanol a 25% como controle das doses do fator de 10 µg e 100 µg no banho.

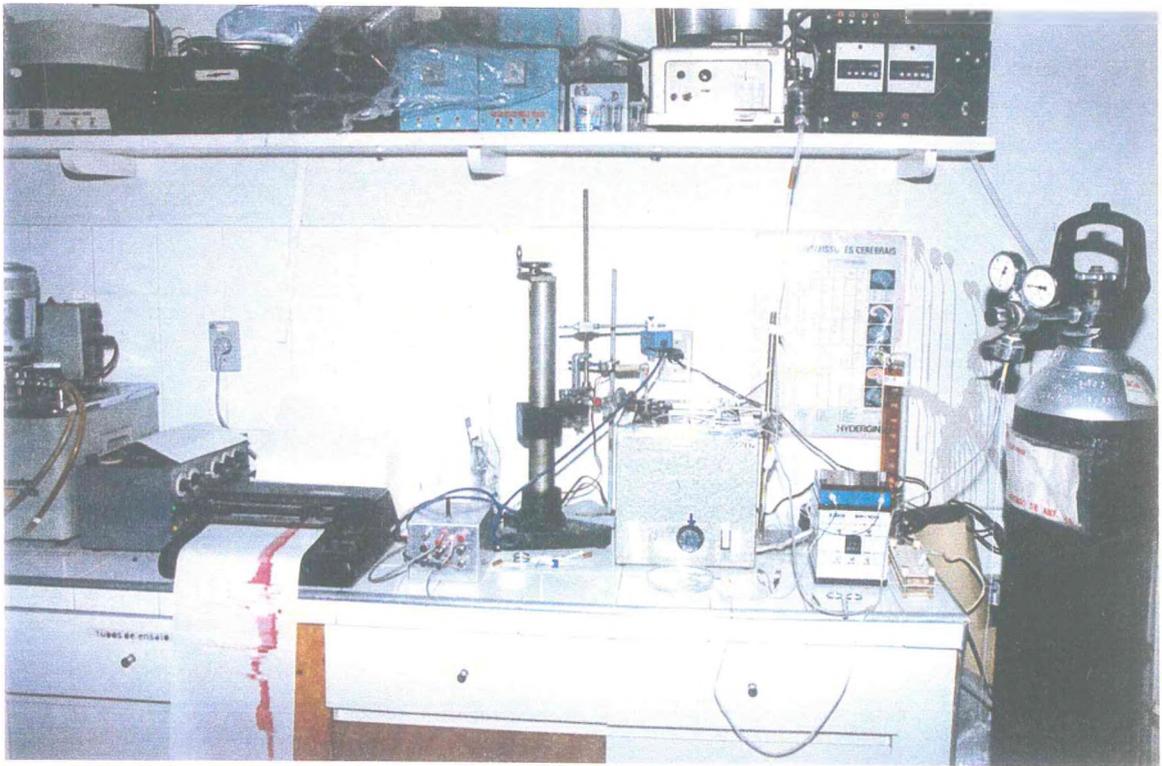


Figura 6. Preparação *in vitro* de canal deferente de camundongos.

### **3.11- Teste da Formalina**

Um modelo de dor aguda induzida quimicamente foi utilizado. A nocicepção química foi realizada com formalina.

Foram utilizados camundongos (20-25 g) Swiss, machos, divididos em grupos de 8 animais. Os animais dos diferentes grupos receberam as substâncias subcutaneamente na superfície plantar da pata traseira direita, em um volume total de 20 µl, enquanto os camundongos foram contidos manualmente. Após a injeção, os animais foram observados individualmente. O tempo gasto, em segundos, pelo animal para lambe a pata foi contado durante duas fases: a primeira fase de 0-5 minutos e a segunda fase de 20-25 minutos.

A formalina foi preparada a partir de uma solução de formaldeído (37,5%) adicionada à água bidestilada não pirogênica. O fator, em estudo, foi dissolvido com etanol a 12,5 % nas concentrações a partir do pó liofilizado a 0,5%.

Dois grupos grupos de oito animais foram trabalhados. O grupo I controle recebeu o veículo solvente (etanol a 12,5%) e formalina na concentração final de 1%. O grupo II recebeu o fator a 0,5% com etanol a 12,5% como solvente misturado com formalina a 1%.

### 3.12- Determinação da Estrutura Química do Fator

O fator isolado e purificado, a partir das glândulas parotóides do *Bufo paracnemis*, foi utilizado para determinação da estrutura.

Foi realizada cromatografia de camada delgada para certificar-se do grau de pureza do material, utilizando um revelador de anilina e etanol como eluente. Foram feitos testes para determinação do ponto de fusão do material em cinco amostras, coletadas em datas diferentes.

Realizaram-se testes para identificação da natureza do material. Foi utilizado o método de detecção de alcalóide, usando o reagente de Dragendorff. Foi verificado pelo teste de Lieberman-Burchard a pesquisa de esteróide na estrutura. Este teste consiste na mistura de anidrido acético, ácido sulfúrico, etanol e o material testado, levando todos a uma temperatura de 100 °C durante 5 a 10 minutos. O material é passado em detector ultravioleta 365 nm.

Foi realizada espectroscopia de infravermelho na região normal que se estende de 2,5 a 15  $\mu$  (4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ ). O material também foi submetido a espectroscopia de massa do fator. O espectro de massas consiste no registro da reação que ocorre quando moléculas são bombardeadas em fase gasosa por um feixe de elétrons, no aparelho espectrômetro de massas.

Finalmente, foram evidenciados o peso molecular e a estrutura proposta para o fator, a partir de todos os experimentos químicos do pico 2 da cromatografia líquida de alta eficiência, obtido das glândulas parotóides do sapo, *Bufo paracnemis*.

Esta metodologia foi realizada no Parque de Desenvolvimento Tecnológico do Estado do Ceará e Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal do Ceará, sob os cuidados dos Professores Afrânio Craveiro e Iracema.

### **3.13- Métodos Estatísticos**

Os dados obtidos experimentalmente foram expressos como média  $\pm$  erro padrão, onde n representa o número de experimentos. São considerados estatisticamente diferentes os resultados que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% ( $p < 0,05$ ). Para comparação das médias foi utilizado o teste “t” de Student.

## 4- RESULTADOS

### 4.1- Purificação em HPLC com coluna preparativa

A obtenção do veneno por compressão das glândulas parotóides do sapo, *Bufo paracnemis*, foi injetada no HPLC com coluna preparativa. O material foi coletado com quatro picos (Figura 7). Estas frações, correspondentes aos picos, foram liofilizadas e o material foi obtido em pó seco.

As frações foram ressuspendidas com etanol e água bidestilada 1:1 (v:v), e injetadas intraperitonealmente em camundongos. O pico 2 apresentou atividade paralisante.

### 4.2- Determinação do grau de pureza em HPLC

O pico 2, o escolhido, foi injetado em HPLC com coluna analítica. Evidenciou-se a inexistência dos outros picos, demonstrando o alto grau de purificação do material (Figura 8). A partir de então, passou-se a utilizar o material nos testes biológicos com certeza de um elevado grau de pureza, mais de 97%.

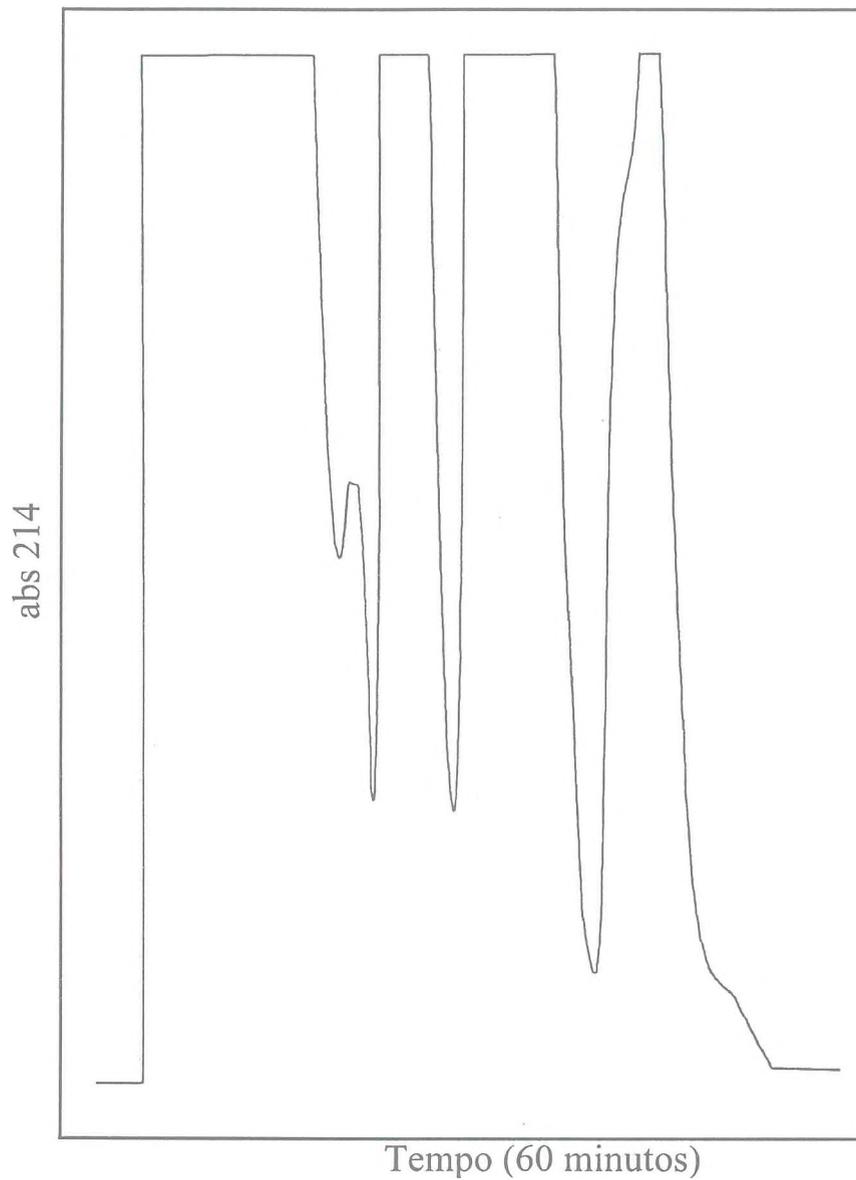


Figura 7. Perfil de eluição do veneno das glândulas parotóides do *Bufo paracnemis*.

O veneno foi solubilizado com etanol. Dois ml de veneno foram aplicados em coluna de HPLC (Nucleosil 25  $\mu$ m C-18, 30x2,5 cm) e eluído com gradiente isocrático de 40% de acetonitrila contendo 0,05% de ácido trifluoracético em 60 minutos com fluxo de 7 ml/min, monitorizada a 214 nm.

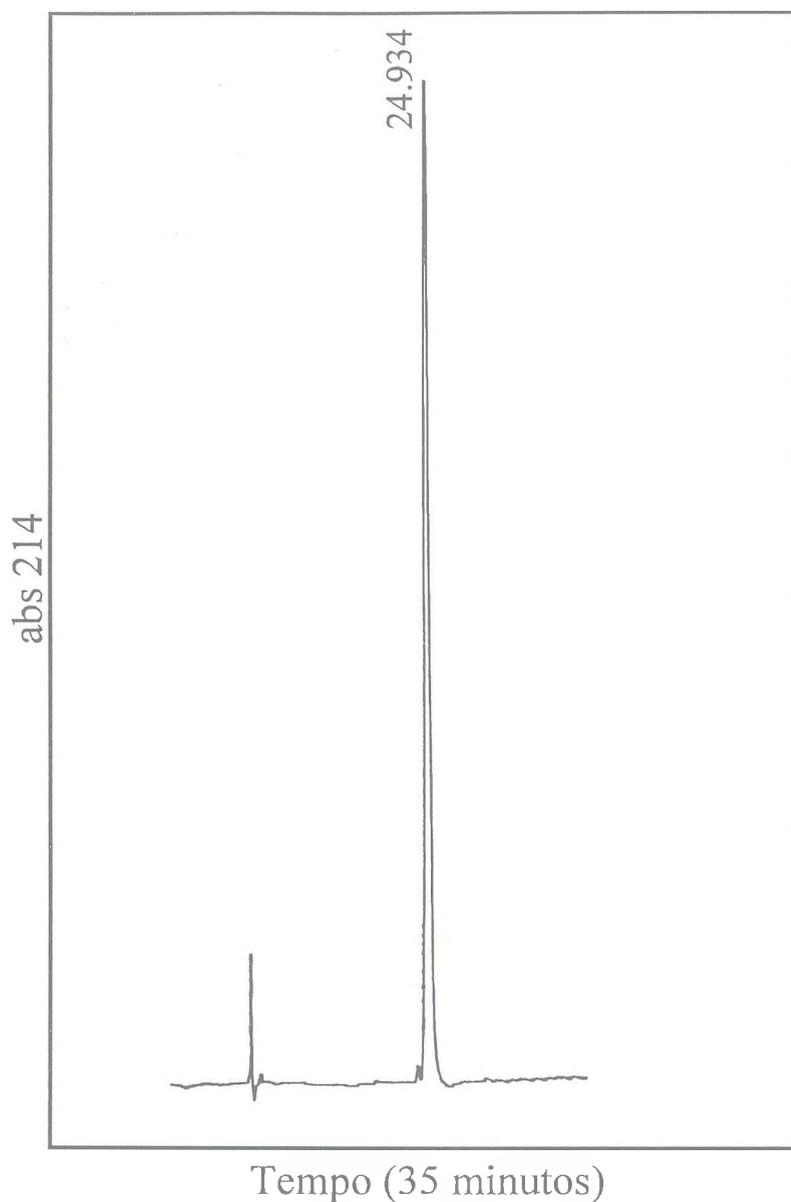


Figura 8. Perfil de eluição do pico 2, proveniente do veneno do *Bufo paracnemis*. O pico 2 foi liofilizado. Cinquenta ml do material foram injetados em coluna de HPLC (Nucleosil 5  $\mu$ m C-18, 145x4,5 mm) e eluído com gradiente de 20 a 40% de acetonitrila contendo 0,05% de ácido trifluoracético em 35 minutos com fluxo de 1 ml/min. O pico de retenção se deu em torno de 24,9 min detectado em 214 nm.

### **4.3-Toxicidade**

A administração de doses crescentes do fator resultou em diversas alterações. As doses baixas, de 1, 5 e 10 mg/kg, determinaram uma diminuição da atividade locomotora espontânea dos camundongos. Em doses intermediárias, além do efeito anterior, os animais apresentaram um aumento da frequência respiratória, taquipnéia, uma diminuição das incursões respiratórias, fraqueza muscular, grande dificuldade de deambular e paralisia total (Figura 9). Altas doses foram acompanhadas de cianose, que às vezes evoluíram para apnéia e morte.

### **4.4-Determinação da DL<sub>50</sub>**

A dose letal que mata 50% dos animais testados foi calculada em torno de 50mg/kg.

### **4.5-Exame macroscópico de órgãos**

Ao exame macroscópico não foram encontradas lesões tais como edema, exsudatos, nem sufusões hemorrágicas nos órgãos isolados, bem como não foi achado sangramento na cavidade abdominal.

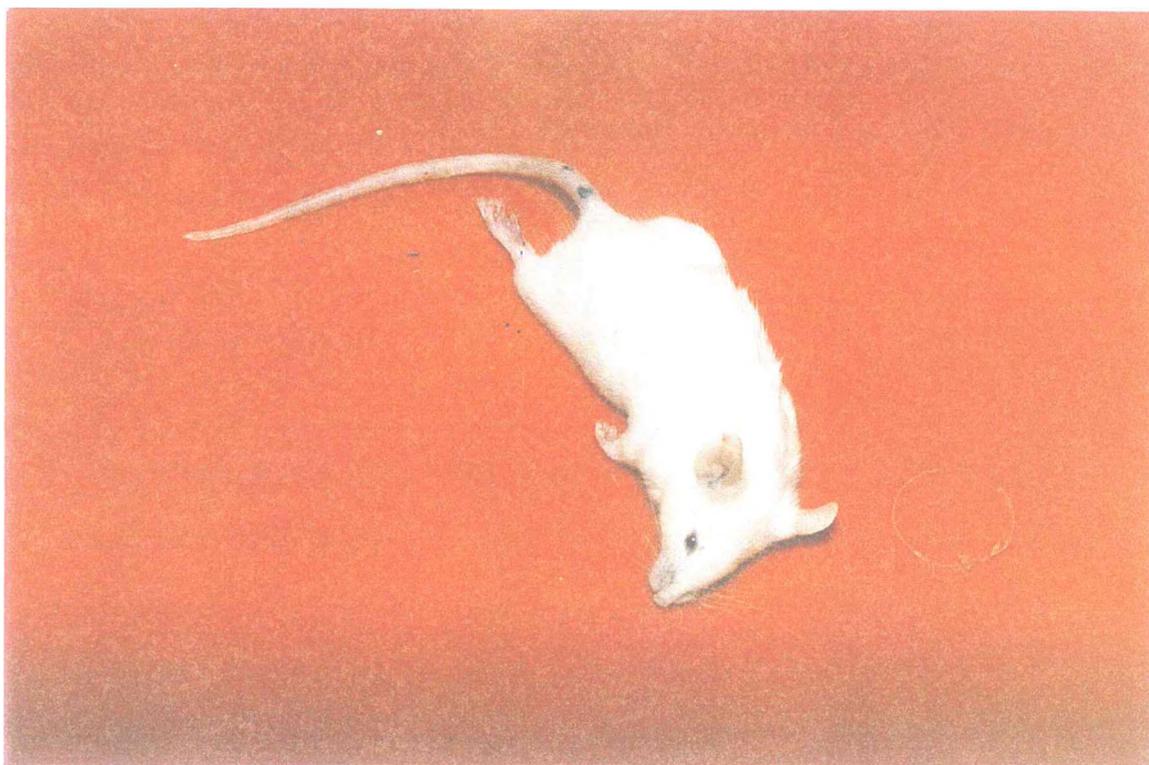


Figura 9. Efeito paralisante do pico 2 em camundongos, evidenciado após 10 minutos de administração de 30mg/kg.

#### **4.6- Frênico-diafragma isolado de rato**

Foram realizados seis experimentos com a preparação frênico-diafragma de rato. O etanol, utilizado como solvente, causou uma leve queda na contração do diafragma, utilizando um estimulador no frênico com 0,1 ms de duração, 6 mV e 8-10 estimulações por minuto. O fator não causou bloqueio de contração na dose de 10 µg/ml, reduziu na dose de 40 µg/ml e aboliu a contração na dose de 80 µg/ml (Figura 10).

#### **4.7- Reto Abdominal**

A colocação de etanol em doses de 1:5.000 e 1:500 ao banho, contendo o músculo reto abdominal de sapo, não reduziu as contrações provocadas pela acetilcolina  $1,5 \times 10^{-6}$  M. Entretanto a adição de etanol na concentração de 1:100 resultou em potencialização da resposta contrátil pela acetilcolina  $1,5 \times 10^{-6}$  M. O etanol funcionou como veículo nesta preparação.

A adição do fator, dissolvido em etanol, nas doses de 1 µg, 10 µg e 20 µg, evidenciou os mesmos resultados encontrados com o controle (Figuras 11 e 12).

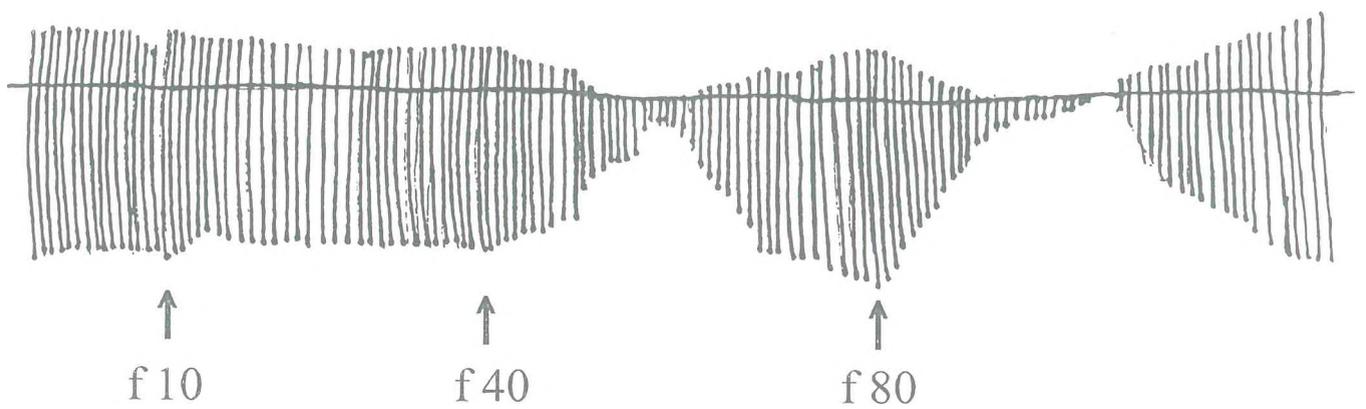


Figura 10. Efeito do fator purificado nas contrações evocadas por estimulador de nervo periférico na preparação frênico-diafragma de rato.

f10- fator purificado  $10\mu\text{g/ml}$ ; f40- fator purificado  $40\mu\text{g/ml}$ ; f80- fator purificado  $80\mu\text{g/ml}$ .

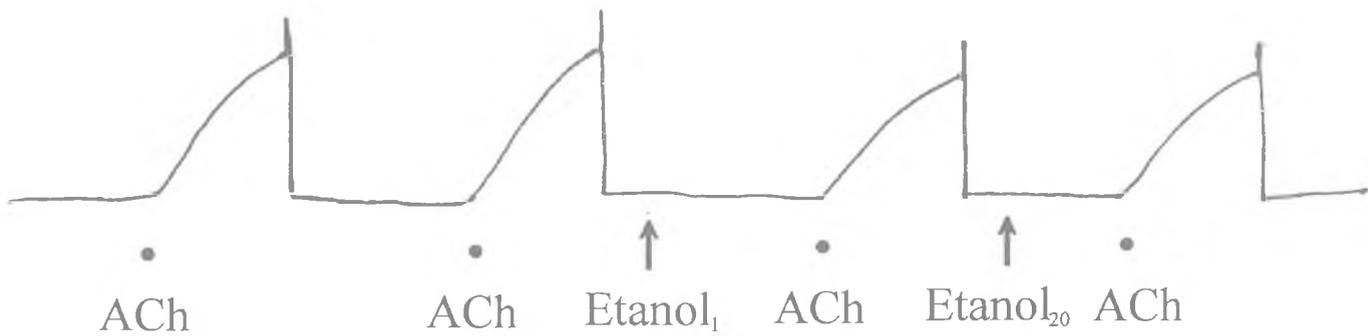


Figura 11. Efeito do etanol como controle nas contrações do reto abdominal de sapo

ACh - acetilcolina ( $1,5 \times 10^{-6}$  M); etanol<sub>1</sub>- etanol  $1\mu\text{l}$  para cada ml de banho;  
 etanol<sub>20</sub>- etanol  $20\mu\text{l}$  para cada ml de banho

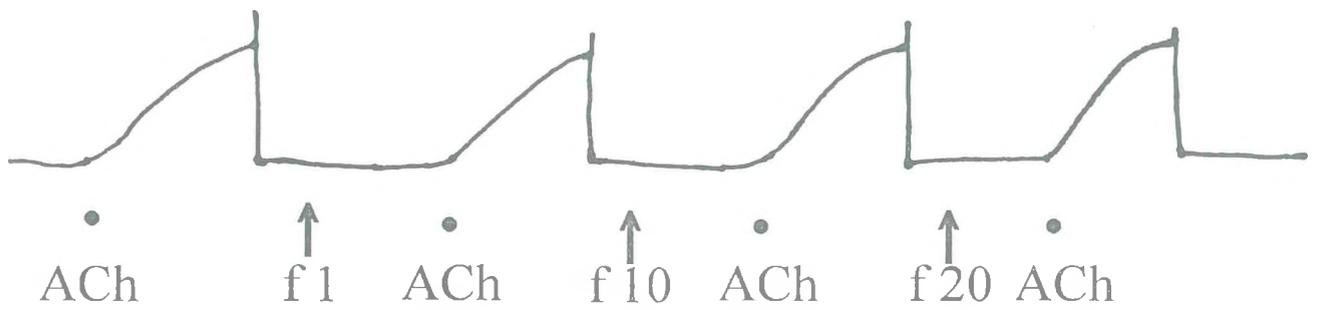


Figura 12. Efeitos do fator purificado nas contrações do reto abdominal de sapo

ACh- acetilcolina ( $1,5 \times 10^{-6}$  M); f1- fator purificado  $1\mu\text{g/ml}$ ; f10- fator purificado  $10\mu\text{g/ml}$ ; f20- fator purificado  $20\mu\text{g/ml}$ .

#### **4.8 -Teste da Córnea do Coelho**

O olho direito do coelho, que recebeu etanol e água bidestilada, apresentou uma leve irritação. A estimulação do olho com um cotonete resultou em um piscar do olho, e posterior fechamento, demonstrando atividade reflexa presente.

O olho esquerdo do coelho, que recebeu o fator dissolvido em etanol e água, apresentou uma anestesia gradual. A anestesia ficou completa após cinco minutos de instilação do material, observada com a estimulação da córnea do animal com cotonete, demonstrando o desaparecimento da atividade reflexa ao estímulo. O olho também exibiu uma quadro de miose (Figura 13 e 14). Foram realizados seis experimentos.

#### **4.9-Canal deferente de camundongo**

A administração do veículo no banho, em volume total de 100  $\mu$ l na proporção de 1:3 (v:v) etanol e água bidestilada, contendo o canal deferente, causou uma queda em torno de 12% nas contrações induzidas por estimulação de 0.1 Hz por estimulador de nervo. Posteriormente, foi injetado no banho uma dose de 10  $\mu$ g em um volume total de 10  $\mu$ l, etanol e água 1:1 (v:v), resultando em uma leve queda da contração pela estimulação de 0.1 Hz. Finalmente, o banho recebeu uma dose de 100  $\mu$ g em um volume total de 100  $\mu$ l, etanol e água 1:3 (v:v), demonstrando um bloqueio quase total da contração após utilização do estimulador de nervo na mesma intensidade anterior (Figura 15).



Figura 13. Cinco gotas de etanol e água bidestilada foram instiladas no olho direito do coelho (controle) em um total de seis experimentos.

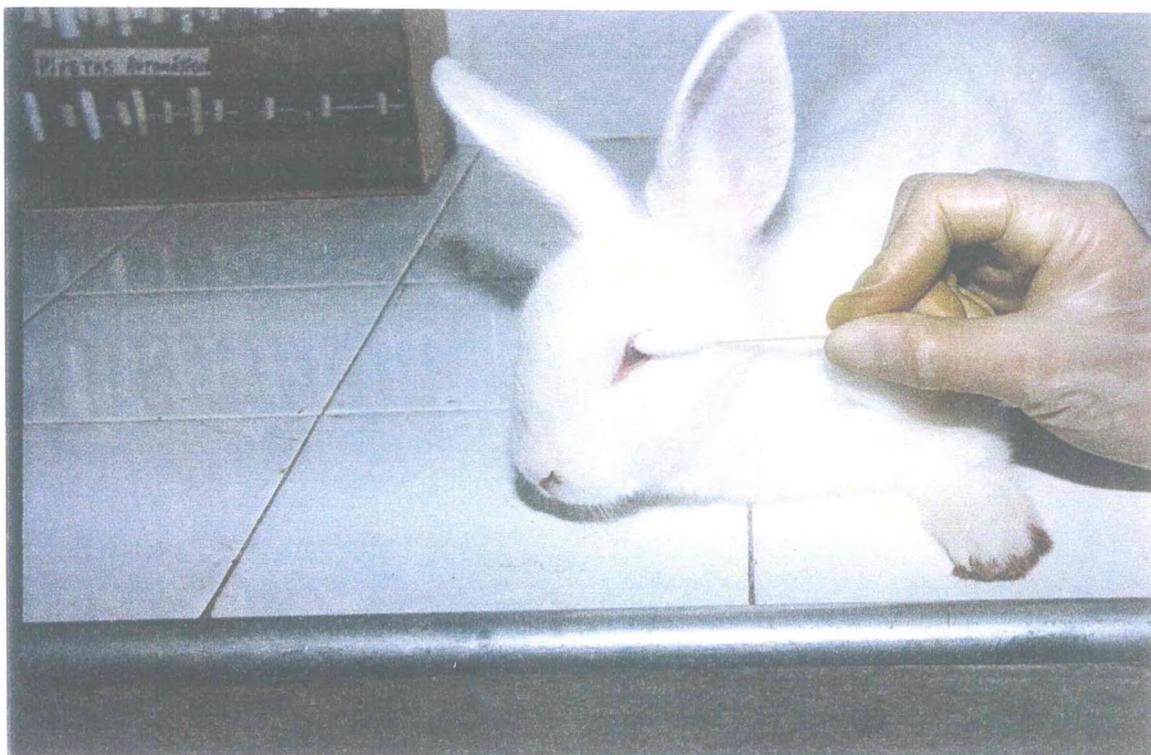


Figura 14. Cinco gotas do fator purificado, dissolvido em etanol e água bidestilada, foram instiladas no olho esquerdo do coelho em um total de seis experimentos.

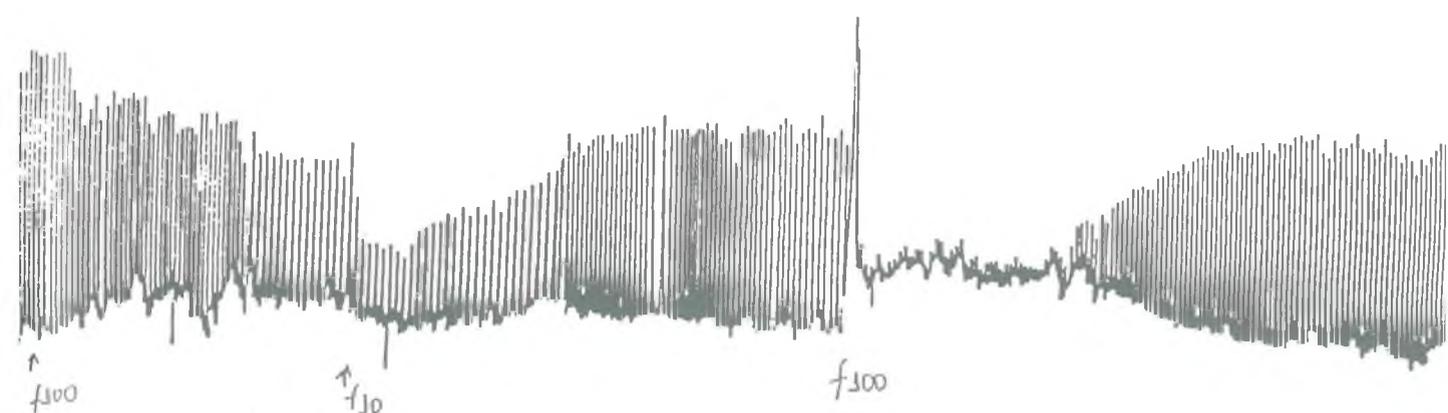


Figura 15. Efeito do fator purificado nas contrações evocadas por estimulador de nervo periférico no canal deferente de camundongos

etanol 100- etanol 100 $\mu$ l; f10- fator purificado 10 $\mu$ g; f100- fator purificado 100 $\mu$ g.

#### **4.10- Teste da formalina**

O grupo controle recebeu formalina 1% com etanol a 12,5 % em um volume total de 20 ul. O tempo total foi o gasto pelo animal para lambar a pata traseira direita, onde foi injetado o material, em duas fases distintas: a primeira fase (0-5 minutos) e segunda fase (20-25 minutos). O tempo gasto na primeira fase (0-5 minutos) foi de  $51,2 \pm 2,3$  seg, e na segunda fase foi de  $23,2 \pm 1,5$  seg.

Administrou-se o fator a 0,5% (etanol a 12,5% e água como solvente) com formalina 1% no segundo grupo em um volume total de 20 ul. Houve uma redução no tempo gasto de lambar a pata em ambas as fases. Na primeira fase, o tempo foi reduzido para  $27,5 \pm 1,61$  seg, e na segunda fase o tempo foi de  $2 \pm 1,14$  seg (Figura 16).

#### **4.11- Determinação da Estrutura Química do Fator**

Pela cromatografia de camada delgada, o material apresentou-se com elevado grau de pureza, o que já se pode inferir em HPLC com coluna analítica. Cinco amostras do fator colhidas em tempos diferentes, mas localizadas no mesmo ponto da cromatografia (Figura 17).

O ponto de fusão determinado foi em torno de  $229,8^0 - 234,1^0$  C.

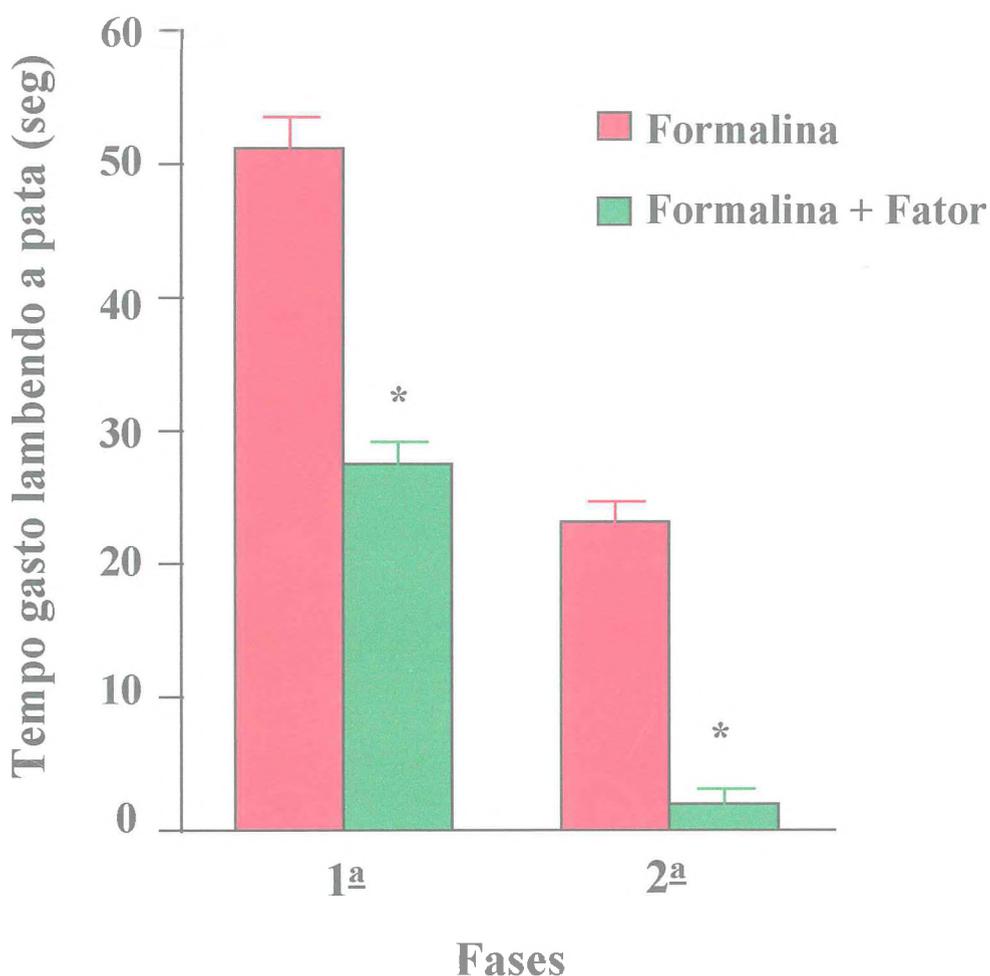


Figura 16. Efeito do fator purificado na nocicepção induzida por formalina em camundongos. O grupo controle recebeu formalina a 1% com etanol a 12,5%. O outro grupo recebeu fator purificado a 0,5% (dissolvido em etanol a 12,5% e água bidestilada) com formalina a 1%. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM do tempo gasto pelos animais lambendo a pata na 1ª fase (0-5 min) e 2ª fase (20-25 min) do teste. Foram utilizados 8 animais em cada grupo. \*  $p < 0,05$  comparado ao controle no teste “t” de Student.

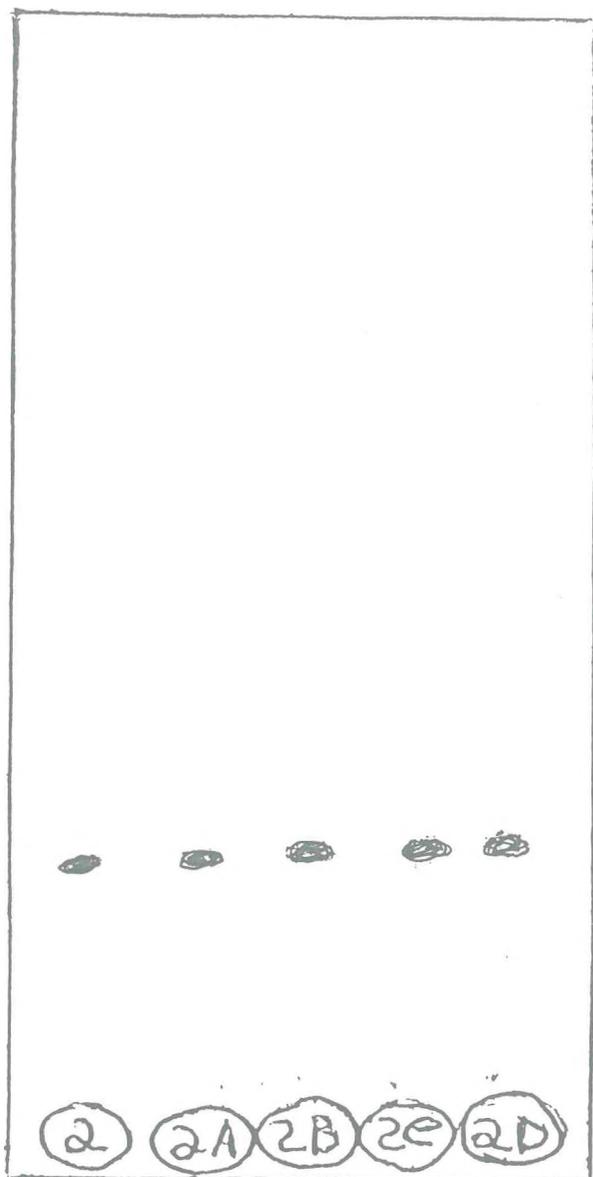


Figura 17. Cromatografia de camada delgada do pico 2, utilizando um revelador de vanilina e etanol como eluente.

As cinco amostras do fator foram também utilizados no teste de Lieberman-Burchard, resultando positividade em todas as amostras, sendo portanto um esteróide. O revelador de Dragendorff apresentou negatividade para alcalóide.

Foram realizados estudos com espectroscopia. A espectroscopia no infravermelho foi realizada na faixa de região normal de grupos funcionais para compostos orgânicos, mostrando uma carbonila no comprimento de onda de 1700 (Figura 18). A espectrometria de massas do fator foi também executada (Figura 19).

A partir de todos os dados e outros realizados por química laboratorial, o peso molecular da substância foi calculado e seu valor é de 402. Foi feita uma proposição estrutural do fator purificado com atividade anestésica local (Figura 20).

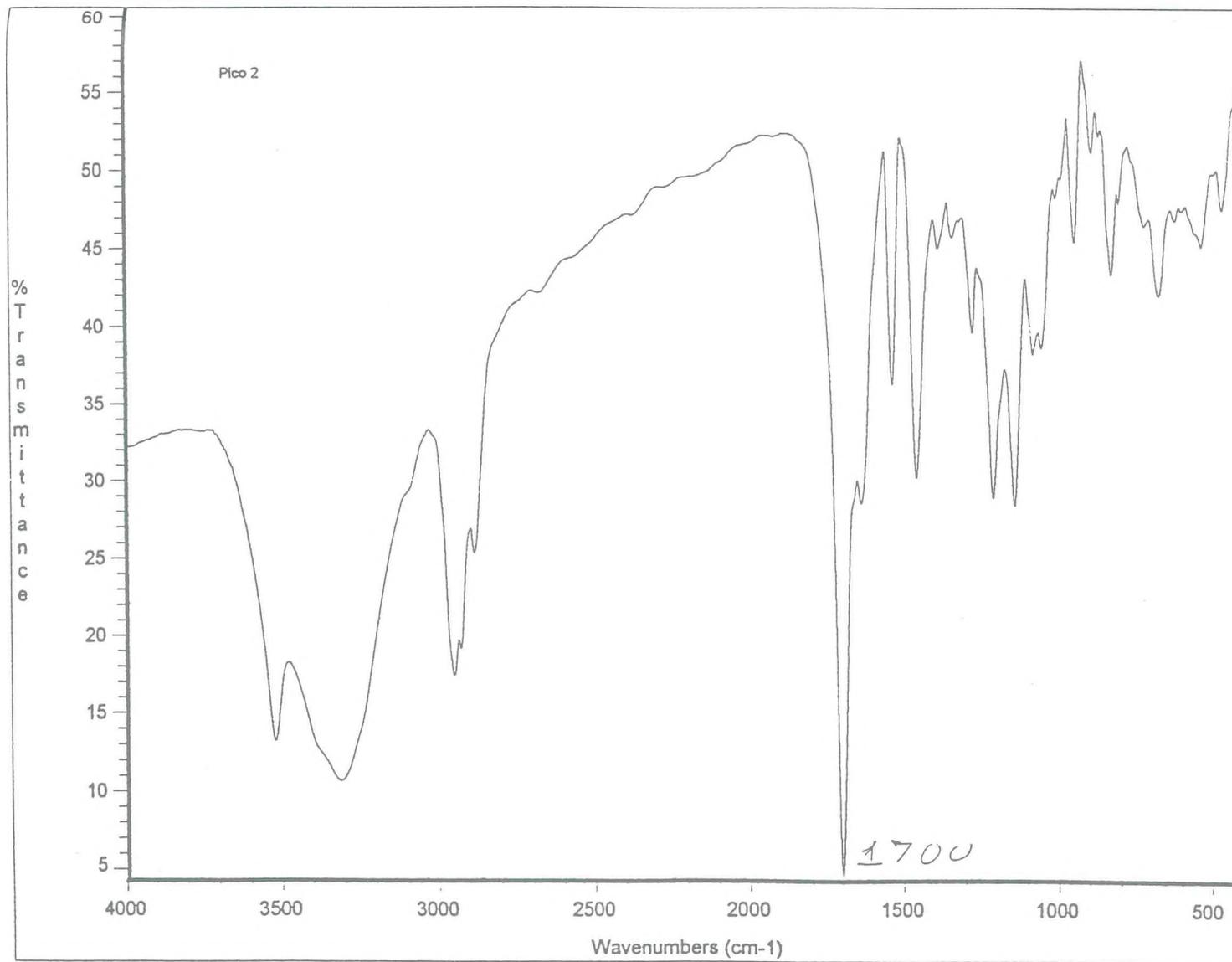


Figura 18. Espectroscopia da substância purificada na região normal do infravermelho

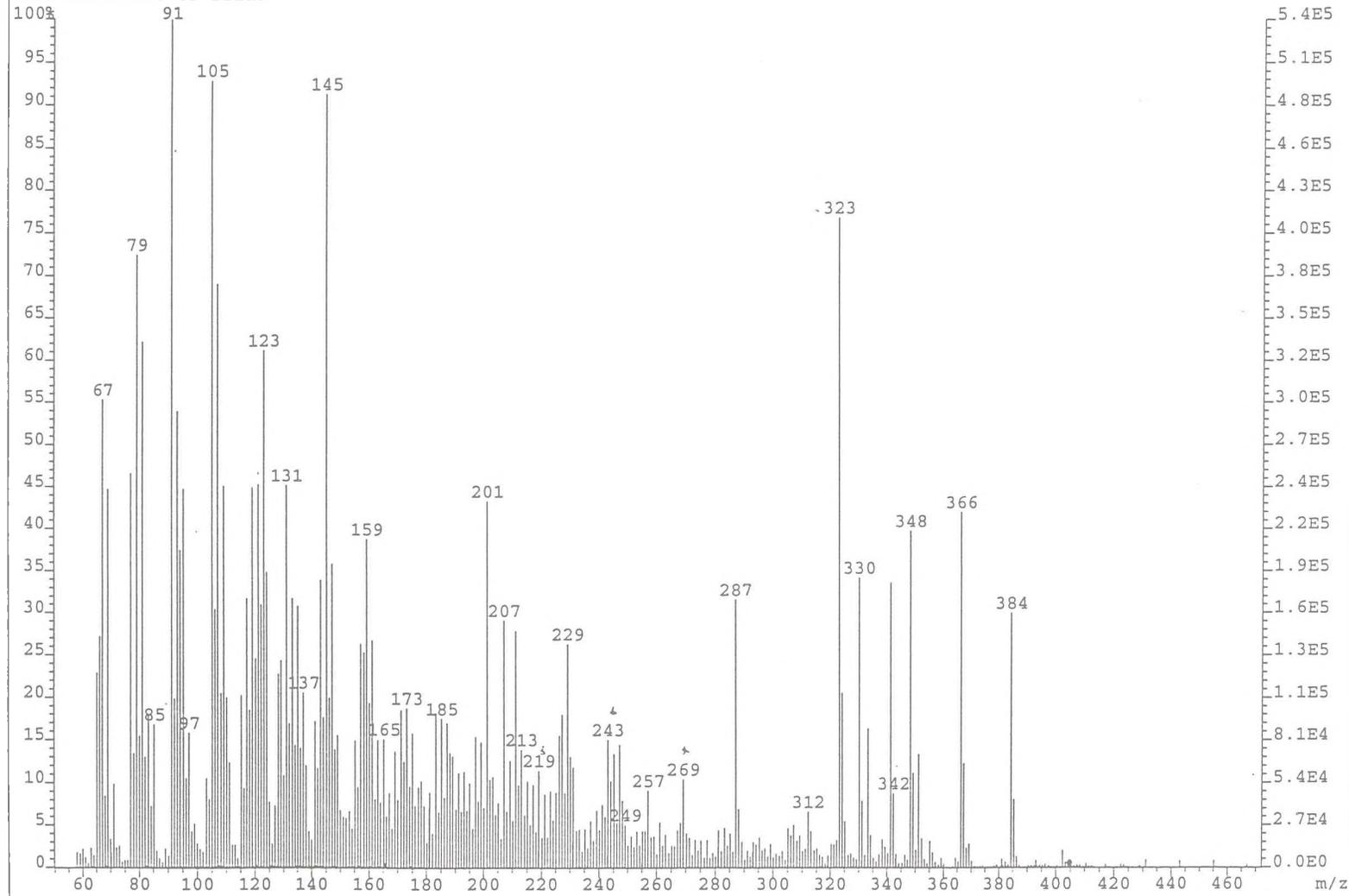


Figura 19. Espectrometria de massas da substância anestésica isolada.

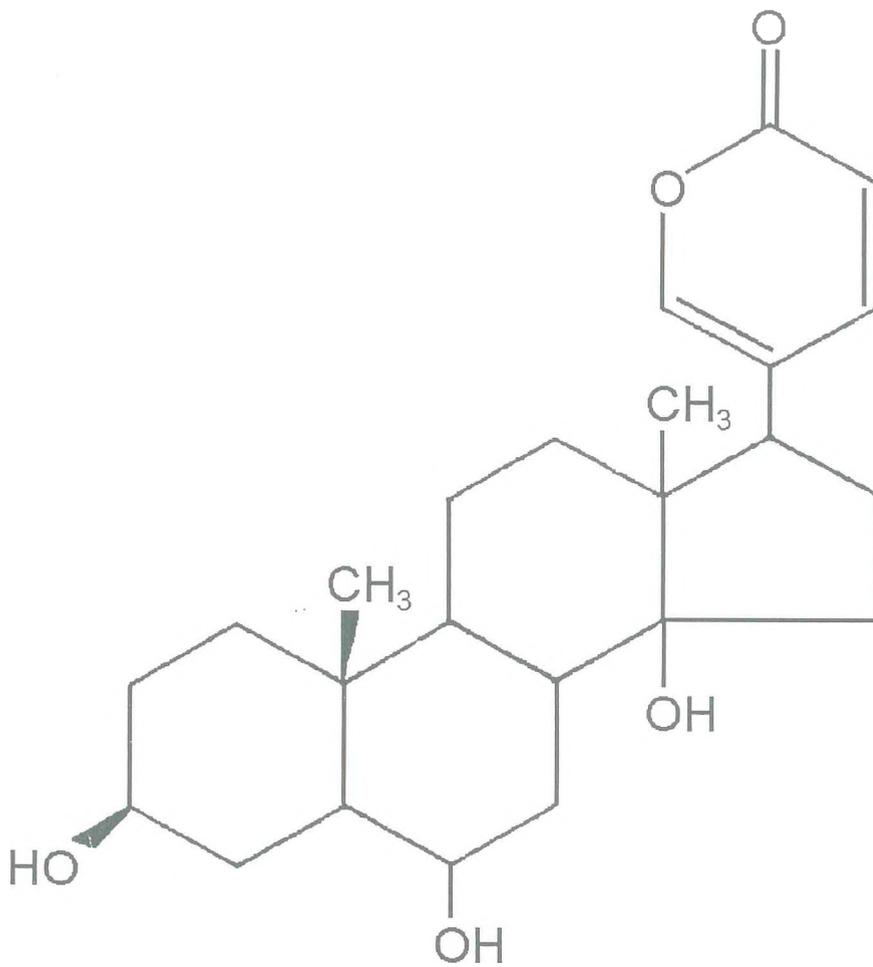


Figura 20. Proposição estrutural do fator purificado das glândulas parotóides do *Bufo paracnemis*.

## 5- DISCUSSÃO

A busca do conhecimento não se limita a estudar somente o homem. Estende-se a outras espécies. Há muitas similaridades entre a fisiologia humana e a de outros animais. As pesquisas, de um modo geral, são então realizadas e seus resultados extrapolados para o homem. Alguns experimentos também não são feitos por razões éticas, o homem não deve ser cobaio. De outro modo, muitas substâncias encontradas em espécies variadas, tais como classe dos répteis, anfíbios, aves, bem como insetos possuem produtos oriundos do seu metabolismo, que agem na máquina humana. Destarte, muito tem sido descoberto para o entendimento do universo microcópico humano a partir de pesquisas utilizando animais inferiores e produtos deles.

Por toda a História, as toxinas têm fascinado os homens. Toxinas animais têm feito uma significativa contribuição na melhoria do conhecimento da fisiologia e farmacologia nos seres humanos (Karalliedde, 1995).

Em Macbeth, Shakespeare descreve bruxas que usam coquetéis de composições químicas diferentes, misturando toxinas de sapos e outros animais. Estas composições desconhecidas poderiam mimetizar e interferir com respostas farmacológicas em seres humanos (agonistas ou antagonistas que ativam ou bloqueiam receptores farmacológicos) (Lazarus et al., 1994).

Venenos são comuns na natureza, onde eles frequentemente funcionam como defesa. Tais venenos são produzidos *de novo* ou são sequestrados de fontes da dieta ou organismos simbióticos. Dentre os vertebrados, os anfíbios são notáveis por uma larga variedade de agentes que estão contidos nas glândulas granulosas da pele (Toledo & Jared, 1992). Estes compostos incluem amins, peptídios, esteróides, e alcalóides solúveis em água e em lipídios. Com exceção dos alcalóides, a maioria parece ser produzida *de novo* (Daly, 1995).

Substâncias venenosas ocorrem na natureza e são particularmente bem conhecidas das plantas, onde elas presumivelmente servem na defesa química contra herbívoros. Venenos podem ocorrer em invertebrados e vertebrados. Eles funcionam como defesa química contra predadores ou microorganismos. Muitas das substâncias dos anfíbios poderiam ser classificadas como nocivas, melhor do que chamá-las venenosas, embora em doses bastantes elevadas todos estes compostos seriam venenos (Daly, 1995).

Houve um grande interesse em se investigar o material do sapo, *Bufo paracnemis*, após testes iniciais, quando uma porção do material bruto foi injetada intraperitonealmente. Foi, então, desenvolvido um protocolo para estudo.

A extração do veneno foi tentada com vários solventes, porém depois de muitos ensaios decidiu-se utilizar o etanol. A extração foi executada por compressão das glândulas parotóides do sapo. O veneno foi dissolvido com etanol, que se mostrou excelente para obter frações lipossolúveis do material. O tempo de 24 horas foi utilizado para solubilizar o máximo de material do veneno.

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

O HPLC fracionou o sobrenadante do veneno extraído com etanol em quatro picos. A coleta dos picos foi efetuada em única vez. O pico 2 escolhido após passagem em HPLC com coluna analítica revelou um elevadíssimo grau de pureza do material. A coluna preparativa proporcionou a utilização de um grande volume de material. Isso foi decisivo, pois para um rendimento de 0,5% foram necessárias várias passagens no HPLC.

Estudos da toxicidade do fator propiciaram um certo direcionamento da sua atividade biológica. As doses utilizadas deram importantes informações, pois o material apresentou uma diminuição da atividade motora geral, seguida de taquipnéia, dificuldade de deambular e paralisia, que foi revertida, conforme a dose utilizada. Apnéia e morte estiveram presentes quando as doses foram elevadas.

A dose letal mediana é um parâmetro de medida na seleção de drogas para uso clínico. A  $DL_{50}$ , em camundongos, para a cocaína é de 19 mg/kg e a da procaína é de 52 mg/kg por via endovenosa (Rocha e Silva, 1969). A  $DL_{50}$  do fator determinada no trabalho foi de 50 mg/kg intraperitonealmente. A via intraperitoneal é uma via de absorção muito grande. Assim, pode-se inferir que o

fator apresenta uma  $DL_{50}$  em torno de duas vezes e meia maior que a cocaína, significando um grau de toxicidade menor para o fator purificado.

Ao exame macroscópico de órgãos, não foram evidenciados a existência de sangramentos, sufusões hemorrágicas, edema pulmonar ou cardiogênico. Isso afastou a possibilidade de ser uma substância hemolítica, bem como cardiodepressora. Apesar do aparecimento de apnéia em altas doses, não foi vista nenhuma alteração macroscópica a nível de pulmões.

Os estudos de toxicidade e exame macroscópico de órgãos levantaram a hipótese de se tratar de uma substância com atuação na transmissão neuromuscular.

A simplificação do método biológico leva quase sempre a uma precisão maior na análise quantitativa da droga a ser ensaiada. A simplificação introduzida pela perfusão de um único órgão permite um estudo aprofundado do mecanismo de ação da substância (Rocha e Silva, 1968).

Uma preparação de grande utilidade no estudo da farmacologia neuromuscular foi descrita por Bülbring (1946) e Chou (1947). Consiste em suspender, em banho de Tyrode, o diafragma isolado de rato, respeitada a sua inervação pelo frênico. A passagem da excitação do nervo para o músculo pode ser bem avaliada.

O etanol causa uma ação bifásica na contração de músculo esquelético, levando um leve aumento da força de contração em baixas doses e uma redução da contração em doses altas (Cooper & Dretchen, 1975; Pagala et al., 1995). Os valores para o controle foram executados, não interferindo nos resultados do trabalho.

O experimento frênico-diafragma isolado de rato foi realizado. O fator foi adicionado ao banho contendo a preparação, levando a um bloqueio total em doses altas nas contrações induzidas pelo estimulador de nervo periférico. Com este resultado, a idéia do fator agir na junção neuromuscular ficou comprovada. Mas era preciso outro experimento para demonstrar se o efeito produzido seria uma atividade curarizante ou se seria uma atividade bloqueadora da condução nervosa. Passou-se a utilizar a preparação do reto abdominal.

A preparação do músculo reto abdominal da rã ou do sapo se baseia na propriedade que tem o curare de antagonizar a contração do músculo, produzida pela acetilcolina (Câmara, 1967). É uma preparação específica para a atividade anticolinérgica, não demonstrando bloqueio se a substância age somente em nervo, pois apenas a ação no músculo é testada.

Os experimentos com reto abdominal de sapo *in vitro* demonstraram que o fator não apresentou bloqueio de contração do músculo em nenhuma das doses usadas, evidenciado após colocação de acetilcolina no banho. Pode-se deduzir que o fator não apresenta atividade anticolinérgica nicotínica, não sendo portanto semelhante aos bloqueadores neuromusculares ou substâncias curarizantes.

Descartada a atividade no músculo, foi testada uma atividade no nervo. Vários modelos, em animais, têm sido utilizados para avaliar o perfil farmacológico de agentes com atividade anestésica local. Pápulas intradérmicas são usadas, principalmente em cobaias, como padrão anestésico. O bloqueio de plexo braquial em cobaias vem sendo usado como padrão de bloqueio de nervo periférico. Soluções anestésicas locais têm sido aplicadas na córnea e instiladas na traquéia do coelho para avaliar a atividade anestésica tópica de muitos compostos. Com estas técnicas é possível determinar a frequência, tempo de latência e duração de ação da anestesia (Covino & Vassalo, 1985).

Drogas anestésicas locais causam inibição da transmissão neuromuscular de preparações *in vitro*. Lidocaína, prilocaína, tetracaína e dibucaína causaram inibição da transmissão neuromuscular em preparações isoladas de frênico-diafragma (Prostran & Varagi, 1981; Brodin & Red, 1984; Mitolo-Chieppa et al., 1985). Cocaína de 5 a 40 uM causou redução concentração dependente em preparação frênico-diafragma de camundongos (Pagala et al., 1991).

A atividade anestésica local pode ser bem avaliada pelo teste da córnea, descrito desde 1955 por Luduena e Hoppe. Este teste é prático e de alto grau de especificidade para substâncias bloqueadoras da propagação e condução do potencial de ação.

O pico 2, instilado no olho direito, causou uma abolição do reflexo corneo-palpebral em média de 3 a 5 minutos após a sua administração. O controle, que recebeu etanol e água bidestilada, não apresentou alteração de reflexo corneo-

palpebral. Este resultado demonstra uma atividade anestésica local, pois a ação anestésica local caracteriza-se por interromper ou bloquear a condução nervosa, seja ela sensitiva ou motora, onde quer que sejam aplicadas (Rocha e Silva, 1968; Almeida, 1994). O pico também causou miose na pupila do olho direito do coelho, diferentemente do anestésico local clássico a cocaína. Observa-se midríase após administração local de cocaína na córnea. A cocaína inibe a recaptação de noradrenalina, causando aumento da atividade simpática, responsável pela midríase (Rang et al, 1995; Carpenter & Mackey, 1997).

Em 1972, foi demonstrado que baixas concentrações de morfina causam inibição das contrações do canal deferente de camundongos, por estimulação elétrica dos nervos intramurais ( Henderson & al, 1972; Hughes, 1972).

A tetrodotoxina e os anestésicos locais, milicaína e lidocaína, preveniram a despolarização do canal deferente de ratos *in vitro* (Ross & Kelder, 1976). Em canal deferente de camundongos, a cocaína (10  $\mu\text{M}$ ) não alterou a contração do canal deferente por estimulação elétrica, enquanto que 100  $\mu\text{M}$  de cocaína produziu uma redução da contração (Bedwell et al., 1992).

Estudos recentes com imunofluorescência revelaram três grandes populações de terminações nervosas, inervando os canais deferentes de porco: 1- fibras noradrenérgicas; 2- fibras não noradrenérgicas contendo peptídeo intestinal vasoativo (VIP), neuropeptídeo Y e somatostatina e 3- fibras sensoriais (Kaleczyc et al., 1997).

A preparação do canal deferente de camundongos foi utilizada, tentando verificar o efeito do fator nos nervos intramurais. As contrações do canal deferente foram reduzidas com o controle, etanol e água bidestilada, mas com uma porcentagem de inibição em torno de 12%. O fator reduziu as contrações do canal deferente em dose baixa, 10 µg, e aboliu totalmente as contrações na dose de 100 µg.

Uma análise da resposta de canais deferentes de rato a xilocaína e procaína demonstrou uma resposta contrátil, possivelmente por liberação de catecolaminas (Vohra, 1970).

É provável que o efeito do fator no canal deferente pode ter sido em decorrência da atividade em nervos intramurais. Outro aspecto relevante é que o fator pode apresentar uma atividade parassimpaticomimética como a miose encontrada no teste da córnea de coelho, diferente da cocaína que causa midríase.

O teste da formalina é grandemente utilizado como um modelo de dor aguda induzida (Dubuisson & Dennis, 1977; Tjoelson, 1992; Abbott, 1995). Ele emprega um estímulo nociceptivo químico que desenvolve uma resposta espontânea indicativa de dor. A dor causada pela formalina é um estímulo contínuo, aproximando-se da dor clínica (Dubuisson & Dennis, 1977).

O teste tem duas fases diferentes, provavelmente refletindo diferentes tipos de dor. A primeira fase decorre de um efeito direto da formalina em nociceptores e é de curta duração. A segunda fase decorre de uma atividade inflamatória, tem

início mais tardio e é de longa duração (Dubuisson & Dennis, 1977; Huskaar et al., 1985; Huskaar & Hole, 1987).

As drogas de ação central, como os narcóticos, podem inibir ambas as fases e as drogas antiinflamatórias não esteroidais e corticosteróides somente inibem a segunda fase (Dickenson & Sullivan, 1987; Huskaar & Hole, 1987; Rosland, 1990).

A lidocaína (2%, 50 microlitros), um anestésico local, foi injetada no local de injeção da formalina, subcutaneamente na região plantar da pata traseira de ratos e aboliu o segundo período de excitação neuronal. A mesma dose de lidocaína foi injetada endovenosamente não produziu efeito na atividade neuronal induzida pela formalina (Dickenson & Sullivan, 1987).

O fator, com atividade anestésica local, foi administrado subcutaneamente na região plantar da pata traseira de camundongos em concentração de 0,5 % com formalina 1%. Ele causou uma redução no tempo de lambida na primeira fase em torno de 50% e praticamente aboliu esse tempo na segunda fase.

O fator com ação anestésica local do veneno do *Bufo paracnemis* foi totalmente purificado. A ausência de contaminação do material faz com que a atividade anestésica local encontrada seja decorrente do fator.

A cromatografia de camada delgada é uma prática indispensável em análise de substâncias orgânicas. É de fácil compreensão e execução, separações em

breve espaço de tempo e baixo custo. Pode ser de aplicação analítica ou preparativa. O processo de separação está fundamentado, principalmente, no fenômeno de adsorção (Lopes, 1993).

Utilizando um revelador de vanilina e etanol como eluente, a cromatografia de camada delgada confirmou o elevado grau de pureza do material já demonstrado pelo HPLC.

Os alcalóides formam uma classe bastante variada de bases heterocíclicas complexas, sendo largamente distribuídos em plantas e venenos de anfíbios. Um método de detecção de alcalóide baseado no uso do reagente de Dragendorff torna possível medir quantitativamente os alcalóides de quaisquer estruturas, usando um espectrofotômetro com raios ultravioletas (Allinger, 1978).

O resultado do teste foi negativo, indicando que o fator não apresenta estrutura de alcalóide.

Em contraste com os poucos picos observados na região ultravioleta para muitos compostos orgânicos, o espectro no infravermelho fornece um rico agregado de bandas de absorção. Estas fornecem um conjunto de informações estruturais sobre a molécula (Dyer, 1969).

Tanto o comprimento de onda ( $\mu$ ) quanto o número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) são usados para medir a posição de uma determinada absorção no infravermelho. A região do espectro eletromagnético correspondente ao infravermelho divide-se em

três regiões. A região normal se estende de 2,5 a 15  $\mu$  ( em termos de número de ondas, 4000 a 625  $\text{cm}^{-1}$ ). Esta região foi a estudada, pois é a região usada para grupos funcionais para compostos orgânicos (Dyer, 1969; Allinger, 1978).

O estudo espectroscópico no infravermelho do fator detectou a presença de um grupamento funcional no número de onda de 1700, correspondendo a carbonila. A carbonila é um grupo funcional que contém oxigênio ligado duplamente a um átomo de carbono.

O espectro de massas é o registro do que acontece com as moléculas quando estas são bombardeadas em fase gasosa por um feixe de elétrons, em um instrumento chamado espectrômetro de massas. As moléculas são destruídas em pedaços. Usualmente é possível deduzir do estudo de fragmentos a estrutura da molécula original (Allinger, 1978). O estudo espectrométrico de massas do fator foi realizado.

Depois de todos os experimentos realizados, chegou-se a proposição estrutural do fator com fórmula  $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_5$  e peso molecular de 402.

O veneno dos bufonídeos apresenta substâncias biologicamente ativas, entre elas as bufogeninas (bufaginas ou bufadienolídeos) e as bufotoxinas, que possuem como componente estrutural fundamental um grupamento esteroideal (Câmara, 1967; Daly, 1987). O fator pertence ao grupo das bufogeninas, cuja proposição estrutural não se identifica exatamente com as substâncias conhecidas desse grupo.

O bufalin é um componente do material bruto do sapo *Bufo paracnemis* que provoca anestesia local e com potência superior à cocaína (Toledo & Jared, 1995). A estrutura do bufalin difere da estrutura do fator, em uma hidroxila e com fórmula  $C_{24}H_{34}O_4$ . O fator purificado possui atividade anestésica local, entretanto não há relatos de atividade anestésica para esta proposição estrutural após vasta revisão bibliográfica.

Estudos refinados em eletrofisiologia precisam ser realizados, buscando elucidar o mecanismo de ação do fator isolado. Os anestésicos locais agem como bloqueadores dos canais de sódio. Não se pode afirmar, mas uma especulação do mecanismo de ação é que o fator poderia apresentar também bloqueio dos canais de sódio.

Algumas toxinas, como TTX e STX, serviram de ligantes no isolamento bioquímico dos canais de sódio (Agnew et al., 1978). Assim, o fator abre perspectivas de ser utilizado em pesquisas de novas estruturas com atividade anestésica local ou como potencial terapêutico nas vias nociceptivas.

## 6- CONCLUSÕES

1. Uma substância com atividade anestésica local foi purificada das glândulas parotóides do *Bufo paracnemis*.
2. Os estudos farmacológicos, nos testes da córnea e formalina e nas preparações *in vitro* do canal deferente e frênico-diafragma, confirmaram a atividade anestésica local da substância.
3. Uma proposição estrutural do fator purificado foi determinada com fórmula de  $C_{24}H_{34}O_5$  e com peso molecular de 402 Da, pertencendo ao grupo das bufogeninas.
4. Estudos eletrofisiológicos serão necessários para definir o seu mecanismo de ação como anestésico local.
5. Esta substância pode servir como instrumento de pesquisa de nova classe de drogas anestésicas locais, visando diminuir a toxicidade dos anestésicos clássicos ou ter o controle do seu tempo de ação. Assim, ela pode ser promissora para o uso clínico no homem.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, F.V., FRANKLIN, K.B.K., WESTBROOK, R.F. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. **Pain**, v.60, p. 91-102, 1995.
- AGNEW, W.S., LEVINSON, S.R., BRABSON, J.S. et al. Purification of the tetrodotoxin-binding component associated with the voltage-sensitive channel from *Electrophorus electricus* electroplax membranes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.75, p. 2606-11, 1978.
- ALLINGER, N.L., CAVA, M.P., DE JONGH, D.C. **Química Orgânica**. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara, 1978.
- BEDWELL, A.M., EL\_MAS, M., HUGHES, I.E. Effect of cocaine on tritium overflow evoked from vasa deferentia previously loaded with [3H]noradrenaline by stimulation using different types of electrode. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.44, n.3, p. 235-8, 1992.
- BOKESCH, P.M., RAYMOND, S.A., STRICHARTZ, G.R. Dependence of lidocaine potency on pH and Pco<sub>2</sub>. **Anesth. Analg.**, v.66, p. 9-17, 1987.
- BORBA, S.R.C. Anestésicos locais. In MANICA, J. (ed.). **Anestesiologia**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1992, cap. 9, 188-98.

- BRODIN, P., RED, A. Inhibition by local anaesthetics drugs at low and high stimulation frequencies. A comparison between the isolated phrenic nerve of the rat and the phrenic nerve-diaphragm preparation. **Neuropharmacology**, v.23, n.1, p. 83-8, 1984.
- BÜLBRING, E. Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v.1, p. 38-61, 1946.
- BUTTERWORTH, J.F., STRICHARTZ, G.R. Molecular mechanisms of local anesthesia: a review. **Anesthesiology**, v.72, p. 711-34, 1990.
- CÂMARA, S.A. **Manual de Farmacologia prática**. São Paulo: Atheneu, 1967.
- CAMARÃO, G.C. **Purificação e caracterização de um complexo protéico multicatalítico do exsudato da pele do *Xenopus laevis***. São Paulo, 1995. Tese (Doutorado) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, 1995.
- CARPENTER, R.L., MACKAY, D.C. Local anesthetics. In: BARASH, P.G, CULLEN, B.F., STOELTING, R.K.(eds.). **Clinical Anesthesia**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott, 1997. cap. 20, p.509-44.
- CARVALHO, J.C.A. Farmacologia dos anestésicos locais. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v.4, p. 75-82, 1994.

- CARVALHO, K.M. **Metabolismo de hormônios-peptídios: descoberta de uma nova família de metaloenzimas.** Fortaleza, 1995. Tese (Professor Titular) - Universidade Federal do Ceará, 1995.
- CARVALHO, K.M., JOUDIQU, C., BOUSSETTA, H., et al. A peptide-hormone-inactivating endopeptidase in xenopus laevis skin secretion. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.89, n.1, p. 84-8, 1992.
- CATCHLOVE, R.F.H. The influence of CO<sub>2</sub> and pH on local anesthetic action. **J Pharmacol. Exp. Ther.**, v.181, p. 298-311, 1972.
- CATTERALL, W. Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. **Physiol. rev.**, v.72, n.4, p. 15-48, 1992.
- CATTERALL, W., MACKIE, K. Local anesthetics. In: HARDMAN, J.G., GILMAN, A.G., LIMBIRD, L.E. (eds.). **Goodman & Gilman's The pharmacological Basis of Therapeutics.** 9. ed. New York: The McGraw-Hill Companies, 1996. cap. 15, p. 331-348.
- CHOU, T.C. The method of estimating curare-like activity on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v.2, p. 1-10, 1947.
- CLARKSON, C.W., HONDEGHEM, L.M. Mechanism for bupivacaine depression of cardiac conduction: fast block of sodium channels during the

action potential with slow recovery from block during diastole. **Anesthesiology**, v.62, p. 396-405, 1985.

COLLINS, V.J. **Princípios da anesthesiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978.

COOPER, S.A., DRETCHEN, K.L. Biphasic action of ethanol on contraction of skeletal muscle. **Eur. J. Pharmacol.**, v.31, n.2, p. 232-6, 1975

COURTNEY, K.R. Mechanism of frequency-dependent inhibition of sodium currents in frog myelinated nerve by the lidocaine derivative GEA 968. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.195, p.225-9, 1987.

COVINO, B G. One hundred years plus two of regional anesthesia. **Reg. Anesth.**, v.11, p. 105-115, 1986

COVINO, B.G., VASSALO, H.G. **Anestésicos Locais: Mecanismo de ação e uso clínico**. Rio de Janeiro: Colina, 1985.

DALY, J.W. Alkaloids from frog skins: selective probes for ion channels and nicotinic receptors. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.28, p. 1033-42, 1995.

DALY, J.W. The chemistry of poisons in amphibian skin. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.92, p. 9-13, 1995.

- DALY, J.W., MYERS, C.W., WHITTAKER, N. Further classification of skin alkaloids from neotropical poison frogs (Dendrobatidae), with a general survey of toxic/noxious substances in the Amphibia. **Toxicon.**, v.25, n.10, p. 1023-95, 1987.
- DENSON, D., COYLE, D., THOMPSON, G., et al. Alpha<sub>1</sub>-acid glycoprotein and albumin in human serum bupivacaine binding. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v.35, p. 409-415, 1984.
- DICKENSON, A.H., SULLIVAN, A.F. Peripheral origins and central modulation of subcutaneous formalin-induced activity of rat dorsal horn neurones. **Neurosci. Lett.**, v.83, n.1, p. 207-11, 1987.
- DICKENSON, A.H., SULLIVAN, A.F. Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurones in the rat: different responses to an intrathecal opiate administered pre- or post-formalin. **Pain**, v.30, p. 339-348, 1987.
- DUBUISSON, D., DENNIS, S.G. The formalin test: A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v.4, p. 161-174, 1977.
- DUELLMAN, W.E. Reproductive strategies of frogs. **Sci. Am.**, v.267, p. 80-87, 1992.

DYER, J.R. **Aplicações da espectroscopia de absorção aos compostos orgânicos.** São Paulo: Edgar Blücher, 1969.

ECKENSTAM, B.A. The effect of the structural variation on the local analgetic properties of the most commonly used groups of substances. **Acta Anaesthesiol. Scand.**, v.25, p. 10-19, 1996.

ERSPAMER, V. Half a century of comparative research on biogenic amines and active peptides in amphibian skin and molluscan tissues. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.79, p. 1-7, 1984.

FINK, B.R., Leaves and needles: The introduction of surgical local anesthesia. **Anesthesiology**, v.63, p. 77-89, 1985.

FLUCHER, B.E., LENGELACHNER-BACHINGER, C., POHLHAMMER, K. et al. Skin peptides in *Xenopus laevis*: Morphological requirements or precursor processing in developing and regenerating granular skin glands. **J. Cell. Biol.**, v.103, n.6, p. 2299-2309, 1986.

FRAZIER, D.T., NARAHASHI, T., YAMADA, M. The site of action and active form of local anesthetics. Experiments with quaternary compounds. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v.171, n.1, p. 45-51, 1969.

FUHRMAN, F. Tetrodotoxin. It is a powerful poison that is found in two almost totally unrelated kinds of animal: puffer fish and newts. It has been serving

as a tool in nerve physiology and may provide a model for new local anesthetics. **Sci. Am.**, v.7, p. 59-74, 1967.

GARETT, R.H., GRISHAM, C.M. **Molecular aspects of Cell Biology**. Florida: Saunders College, 1995.

GIOVANNINI, M.G., POULTER, GIBSON, B.W. et al. Biosynthesis and degradation of peptides derived from *Xenopus laevis* prohormones. **Biochem. J.**, v.243, p. 113-20, 1987.

GISSSEN, A.J., COVINO, B.G., GREGUS, J. Differential sensitivity of mammalian fibers to local anesthetic drugs. **Anesthesiology**, v.53, p. 467-74, 1980.

HABERMEHL, G.G. Exocytosis of toxins in Amphibians and Fishes. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.9, p. 149-152, 1994.

HAUSER, F., GERTZEN, E-M., HOFFMANN, W. Expression of spasmodysin (FIM-A.1): an integumentary mucin from *Xenopus laevis*. **Expl. Cell. Res.**, v.189, p. 157-162, 1990.

HENDERSON, G., HUGHES, J., KOSTERLITZ, H.W. A new example of a morphine-sensitive neuro-effector junction: adrenergic transmission in the mouse vas deferens. **Br. J. Pharmac.**, v.46, p. 764-766, 1972.

- HILLE, B., CATTERALL, W.A. Electrical excitability and ion channels. In: HARVEY, A (ed.). **Natural and synthetic neurotoxins**. New York: Academic Press, 1995. cap. 4, p. 75-95.
- HONDEGHEM, L.M., MILLER, R.D. Anestésicos locais. In: KATZUNG, B. (ed.). **Farmacologia Básica e Clínica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1994, cap. 25, p. 271-6.
- HONG, Z., CHAN, K., YEUNG, H.W. Simultaneous determination of bufadienolides in the traditional chinese medicine preparation, liu-shen-wan, by liquid chromatography. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.44, p. 1023-26, 1992.
- HUGHES, J. Evaluation of mechanisms controlling the release and inactivation of the adrenergic transmitter in the rabbit portal vein and vas deferens. **Br. J. Pharmac.**, v.46, p. 764-766, 1972.
- HUGHES, J., KOSTERLITZ, H.W., LESLIE, F.M. Effect of morphine on adrenergic transmission in the mouse vas deferens. Assessment of agonist and antagonist potencies of narcotic analgesics. **Br. J. Pharmac.**, v.53, p. 371-381, 1975.
- HUSKAAR, S., HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v.30, p. 103-114, 1987.

- HUSKAAR, S., FASMER, O.B., HOLE, K. Acetylsalicylic acid, paracetamol and morphine inhibit behavioural responses to intrathecally administered substance P or capsaicin. **Life Sci.**, v.37, p.1835-1841, 1985.
- HUTTER, C.D. The Woolley and Roe case: A reassessment. **Anaesthesia**, v.45, p. 859-865, 1990.
- IWAMURO, S., KUWAGAKI, D., KIKUYAMA, S. Effect of arginine vasocitin (AVT) and AVT-related peptide on skin gland secretion in *Xenopus laevis*. **Zool. Sci.**, v.8, p. 743-746, 1991.
- KALECZYC, J., TIMMERMANS, J.P., MAJEWSKI, M. et al. Immunohistochemical characteristics of nerve fibres supplying the porcine vas deferens. A colocalisation study. **Histochem. Cell Biol.**, v.107, n.3, p. 229-241, 1997.
- KARALLIEDDE, L. Animal toxins. **Bri. J. Anaest.**, v. 74, p. 319-27, 1995
- KASTEN, G.W., MARTIN, S.T. Bupivacaine cardiovascular toxicity; comparison of the treatment with bretylium and lidocaine. **Anesth. Analg.**, v.64, p. 911-6, 1985.
- LAZARUS, L.H., ATTILA, M. The toad, ugly and venomous, wears yet a precious jewel in his skin. **Progress in Neurobiology**, v.41, p. 473-507, 1993.

LAZARUS, L.H., BRYANT, S.D., ATTLA, M. et al. Frog skin opioid peptides: A case for environmental mimicry. **Environ. Health Perspect.**, v.102, n. 8, p. 648-654, 1994.

LEE, J.A. Some foundations on which we have built. **Reg. Anesth.**, v.10, p.99-172, 1985.

LINDSAY, S. **High Performance Liquid Chromatography**. London: Thames Polytechnic, 1992.

LIU, P.L. FELDMAN, H.S., GIASI, R., et al. Comparative CNS toxicity of lidocaine, etidocaine, bupivacaine, and tetracaine in awake dogs following rapid IV administration. **Anesth. Analg.**, v.62, p. 375-401, 1983.

MARCONDES, A.C., LAMMOGLIA, D.A. **Zoologia e Botânica**. São Paulo; Atual, 1981.

MITOLO-CHIEPPA, D., CARRATU, M.R., DUBOIS, J.M. et al. Comparative evaluation of the of lidocaine (lignocaine) hydrochloride and salicylate on nervous and purkinje fibres. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.7, n. 1, p. 68-70, 1985.

NAGEL, J.E., FUSCALDO, J.T., FIREMAN, P. Paraben allergy. **JAMA**, v.237, p.1594-1601, 1977.

NARAHASHI, T., YAMADA, M. Cationic forms of local anaesthetics block action potentials from inside the nerve membrane. **Nature**, v.223, p. 748-9, 1969.

NARAHASHI, T., FRAZIER, D.T., YAMADA, M. The site of action and active form of local anesthetics. Theory and pH experiments with tertiary compounds. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v.171, n. 1, p. 32-44, 1969.

NEUWIRTH, M., DALY, J.W., MYERS, C.W., et al. Morphology of the granular secretory glands in skin of poison-dart frogs (Dendrobatidae). **Tissue Cell**, v.11, p. 755-771, 1979.

PAGALA, M., RAVINDRAN, K., AMALADEVI, B. Effect of ethanol on function of the rat heart and skeletal muscles. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v.19, n.3, p. 676-84, 1995.

PAGALA, M.K., VENKATACHARI, S.A., HERZLICH, B. et al. Effect of cocaine on responses of the mouse phrenic nerve-diaphragm preparation. **Life Sci.**, v.48, n. 8, p. 795-802, 1991.

PEREIRA, R.I.C. Anestésicos locais. In: Ortenzi, A.V., Tadelli, M.A. (eds.). **Anestesiologia**. São Paulo: Atheneu, 1996, cap. 23, 341-57.

PROSTRAN, M., VARAGI. The effects of local anaesthetics on the isometric contraction of the isolated hemidiaphragm of the rat. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v.250, n. 1, p. 30-9, 1981.

- RANG, H.P., DALE, M.M. Anestésicos locais e outras drogas que afetam membranas excitáveis. In: **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1993. cap. 31, p. 454-66.
- RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M. et al. Local anesthetics and other drugs that affect excitable membranes. In: **Pharmacology**. New York: Churchill Livingstone, 1995. cap. 34, p. 665-80.
- REILLY, D.S., TOMASSINI, N., ZASLOFF, M. Expression of magainin antimicrobial peptide genes in the developing granular glands of *Xenopus* skin and induction by thyroid hormone. **Dev. Biol.**, v.162, p. 123-133, 1994.
- RITCHIE, J.M., GREENE, N.M. Anestésicos locais. IN GILMAN, A.G., GOODMAN, L.S., RALL, T.W., MURAD, F.(eds.). **Goodman & Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 7. ed. Guanabara, 1987. cap. 15, p. 198-210.
- RITCHIE, J.M., GREENGARD, P. On the mode of action of local anesthetics. **Annu. Rev. Pharmacol.**, v.6, p. 405-30, 1966.
- ROCHA E SILVA, M. **Fundamentos da Farmacologia**. São Paulo: Edart, 1968.
- ROSEGHINI, M., ERSPAMER, V., FALCONIERI ERSPAMER, G., et al. Indole-, imidazole- and phenyl-alkylamines in the skin of one hundred and

forty American amphibian species other than bufonids. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.85, p. 139-147, 1986.

ROSLAND, J.H., TJOLSEN, A., MAEHLE, B. et al. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. **Pain**, v.42, p. 235-242, 1990.

ROSS, S.B., KELDER, D. Effect of veratridine on the fluxes of 3H-noradrenaline and 3h-bretylium in the rat vas deferens in vitro. **Naun. Schie. Arch. Pharmacol.**, v.295, n. 3, p. 183-9, 1976.

SAVARESE, J., COVINO, B.G. Anestésicos locais. In Miller, R.D. (ed.). **Tratado de Anestesia**. São Paulo: Manole, 1984. cap. 29, p. 1007-183.

SHAKESPEARE, W. **As You like it**, 1599.

STEBBINS, R.C., COHEN, N.W. **A natural history of amphibians**. Princeton: Princeton University Press, 1995.

STORER, T.I., USINGER, R.L., STEBBINS, R.C. et al. **Zoologia Geral**. São Paulo: Companhia nacional, 1985.

THOMAS, R.D., BEHBEHANI, M.M., COYLE, D.E. et al. Cardiovascular toxicity of local anesthetics: an alternative hypothesis. **Anesth. Analg.**, v.65, p. 444-60, 1986.

- TJOELSON, A. BERGE, O.G., HUNSKAAR, S. et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v.51, p. 5-12, 1992.
- TOLEDO, R.C. Breve apreciação sobre a secreção cutânea dos anfíbios. **Ciência e cultura**, v.38, n. 2, p. 279-284, 1986.
- TOLEDO, R.C., JARED, C. Considerações sobre o veneno dos anfíbios. **Ciência e Cultura**, v.41, n. 3, p. 250-258, 1989.
- TOLEDO, R.C., JARED, C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.111, n.1, p. 1-29, 1995.
- TOLEDO, R.C., VILLA, N. Estudo histopatológico das glândulas tibiais (ou paracnêmicas) de *Bufo paracnemis* (Amphibia, Anura, Bufonidae). **Rev. Bras. Biol.**, v.47, n. 3, p. 257-264, 1987.
- TOLEDO, R.C., JARED, C., BRUNNER JUNIOR, A. Morphology of the large granule alveoli of the paratoid glands in toad (*Bufo ictericus*) before and after compression. **Toxicon.**, v.30, n.7, p. 745-53, 1992.
- TUCKER, G.T., MOORE, D.C., BRIDENBAUGH, P.O., et al. Systemic absorption of mepivacaine in commonly used regional block procedures. **Anesthesiology**, v.37, p. 277-285, 1972
- VOHRA, M.M. An analysis of the contractile responses of the rat vas deferens to xylocaine (lidocaine) and procaine. **Eur. J. Pharmacol.**, v.9, p. 14-20, 1970.

WAGMAN, I. H., DE JONG, R.H., PRICE, D.A. Effects of lidocaine on the central nervous system. **Anesthesiology**, v.28, p.155-162, 1967.

WHITEAR, M. A functional comparison between the epidermis of fish and of amphibians. **Symp. zool. Soc. Lond.**, v.39, p. 291-313, 1977.

WILDSMITH, J.A.W., GISSEN, A.J., TAKMAN, B. et al. Differential nerve blockade: esters v. amines and the influence of pKa. **Br. J. Anaesth.**, v.59, p. 379-84, 1987.