

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**EFEITOS FARMACOLÓGICOS DO TELOCINOBUFAGIN,  
UM BUFADIENOLÍDEO ORIUNDO DAS GLÂNDULAS  
PAROTÓIDES DO *Bufo paracnemis*: ESTUDO  
COMPARATIVO COM O ANESTÉSICO LOCAL  
BUPIVACAÍNA**

**MANOEL CLÁUDIO AZEVEDO PATROCÍNIO**

**Fortaleza-CE  
2004**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**EFEITOS FARMACOLÓGICOS DO TELOCINOBUFAGIN,  
UM BUFADIENOLÍDEO ORIUNDO DAS GLÂNDULAS  
PAROTÓIDES DO *Bufo paracnemis*: ESTUDO  
COMPARATIVO COM O ANESTÉSICO LOCAL  
BUPIVACAÍNA**

**MANOEL CLÁUDIO AZEVEDO PATROCÍNIO**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães

Fortaleza-CE

Esta tese encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca da Faculdade de Medicina da referida Universidade.

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

---

Manoel Cláudio Azevedo Patrocínio

### **Banca Examinadora**

---

Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho  
(Orientador)

---

Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães  
(Co-orientador)

---

Profa. Dra. Helena Serrazul Monteiro

---

Profa. Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy

---

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha

Fortaleza, 26 de maio de 2004.

**DEUS: O Incrriado,  
Fonte de todo Amor,  
De Tudo que existe...**

Ave, Maria, cheia de graça,  
O senhor é convosco,  
Bendita sois vós entre as mulheres,  
E bendito é o fruto do vosso ventre, Jesus.

Santa Maria, Mãe de Deus,  
Rogai por nós, pecadores,  
Agora e na hora de nossa morte  
Amém.

**Meu Bem,  
Cláudio Felipe e Marianna  
Letícia,  
Meus pais e irmãos:  
Razão da minha vida.**

**“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**

## AGRADECIMENTOS

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

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

Ao Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães, pela sua firmeza, presteza e obstinação na orientação e lealdade como amigo;

Aos Professores Drs. Helena Serrazul Monteiro, Ana Maria Sampaio Assreuy e Marcos Fábio Gadelha Rocha, por terem aceitado prontamente o convite de participar da banca examinadora, enriquecendo-a;

A Rosa e Silvandira, pela sua irrepreensível colaboração diária nos experimentos e sua amizade;

Aos amigos Inês e Eduardo, pelo desprendimento e valiosa participação nos experimentos;

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia Molecular e Toxinologia da Universidade Estadual do Ceará, pela convivência diária, tornando o laboratório um ambiente agradável;

A todos do Laboratório de Eletrofisiologia da Universidade Federal do Ceará, pela convivência diária, tornando o laboratório um ambiente agradável;

A todos os Professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, por me terem passado seus inestimáveis e valiosos ensinamentos;

Aos funcionários do Biotério da UFC;

Aos amigos Drs. Ércio, João Rodrigues, Alan Prado, Júlio Augusto, Robinson, pela inabalável amizade;

Aos meus familiares, Manoel Patrocínio, Maria Algezira, Kátia Regina, João Carlos, Tetê Mendes, Guilhermina Rios, Edvaldo Rios, Iago Philippi, Lara Vitória, por fazerem tudo valer a pena;

A minha esposa Silvânia e aos meus filhos Cláudio Felipe e Marianna Letícia, pelo amor concedido gratuitamente e me tornarem homem, marido e pai plenamente felizes!

## SUMÁRIO

|                                      |          |
|--------------------------------------|----------|
| ABREVIATURAS                         | xix      |
| RESUMO                               | xxii     |
| ABSTRACT                             | xxiv     |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                 | <b>1</b> |
| 1.1. Anestésicos Locais              | 1        |
| 1.1.1. Definição                     | 1        |
| 1.1.2. Histórico                     | 1        |
| 1.1.3. Farmacologia Básica           | 7        |
| 1.1.3.1. Estrutura                   | 7        |
| 1.1.3.2. Relação Estrutura Atividade | 11       |
| 1.1.3.3. Preparações                 | 12       |
| 1.1.4. Anatomia dos Nervos           | 13       |
| 1.1.5. Eletrofisiologia do Nervo     | 15       |
| 1.1.6. Farmacodinâmica               | 17       |
| 1.1.7. Farmacocinética               | 21       |
| 1.1.8. Toxicidade                    | 24       |

|   |    |
|---|----|
| 1.2. Anfíbios                                     | 27 |
| 1.2.1. Evolução                                   | 27 |
| 1.2.2. Morfologia dos Anfíbios                    | 28 |
| 1.2.3. A Pele dos Anfíbios: Funções               | 32 |
| 1.3. Importância do Estudo                        | 36 |
| <b>2. OBJETIVOS</b>                               | 39 |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>                     | 40 |
| 3.1. Animais de Experimentação                    | 40 |
| 3.2. Soluções Fisiológicas                        | 40 |
| 3.3. Telocinobufagin                              | 41 |
| 3.3.1. Extração                                   | 41 |
| 3.3.2. Purificação em HPLC com Coluna Preparativa | 42 |
| 3.3.3. Determinação do Grau de Pureza             | 42 |
| 3.4. Drogas                                       | 43 |
| 3.5- Avaliação em Preparações                     | 43 |
| 3.5.1. Óleo de Cobaio                             | 43 |
| 3.5.1.1. Medida de Contratilidade                 | 43 |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.5.1.2 . Protocolo Experimental   | 44        |
| 3.5.2. Determinação do Potencial de Ação Composto (PAC)  | 47        |
| 3.5.2.1. Registro Extracelular   | 47        |
| 3.5.2.2. Protocolo Experimental  | 48        |
| 3.5.2.3. Análise dos Dados   | 49        |
| 3.5.3. Experimentos para Avaliação do Cronotropismo e Inotropismo Cardíacos  | 51        |
| 3.5.3.1. Descrição da Técnica  | 51        |
| 3.5.3.2. Protocolo Experimental  | 52        |
| 3.6. Análise Estatística   | 52        |
| <b>4. RESULTADOS</b>   | <b>54</b> |
| 4.1. Resultados da Purificação   | 54        |
| 4.1.1. Purificação em Coluna Preparativa   | 54        |
| 4.1.2. Determinação do Grau de Pureza em HPLC  | 54        |
| 4.2 - Efeitos do Telocinobufagin sobre as Contrações Induzidas pela Estimulação por Campo Elétrico em Íleo de Cobaio | 57        |
| 4.3. Efeitos da Bupivacaína sobre as Contrações Induzidas pela Estimulação por Campo Elétrico em Íleo de Cobaio.     | 63        |

4.4. Efeitos do Telocinobufagin sobre as Contrações Induzidas 66  
pela Acetilcolina (ACh) em Íleo de Cobaio

4.5. Efeitos da Bupivacaína sobre as Contrações Induzidas pela 70  
Acetilcolina (ACh) em Íleo de Cobaio

4.6. Efeitos do Telocinobufagin sobre o Potencial de Ação 72  
Composto (PAC) em Nervo Ciático Isolado de Rato

4.7. Efeitos da Bupivacaína sobre o Potencial de Ação Composto 77  
(PAC) em Nervo Ciático Isolado de Rato.

4.8. Efeitos do Telocinobufagin sobre o Inotropismo de Átrio 81  
Isolado de Rato.

4.9. Efeitos da Bupivacaína sobre o Inotropismo de Átrio Isolado 82  
de Rato.

4.10. Efeitos do Telocinobufagin sobre o Cronotropismo de Átrio 86  
Isolado de Rato.

4.11. Efeitos da Bupivacaína sobre o Cronotropismo de Átrio 87  
Isolado de Rato.

**5. DISCUSSÃO** 90

**6. CONCLUSÕES** 111

**7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** 113

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estruturas químicas dos anestésicos locais. 10
- Figura 2.** Apresentação bidimensional das subunidades  $\alpha$  (centro),  $\beta 1$  (esquerda) e  $\beta 2$  (direita) do canal de sódio sensível à voltagem no cérebro de mamíferos. 19
- Figura 3.** *Bufo paracnemis* 31
- Figura 4.** Parâmetros do potencial de ação composto (PAC). 50
- Figura 5.** Perfil de eluição do veneno das glândulas parotóides do *Bufo paracnemis*. 55
- Figura 6.** Perfil de eluição do pico 2, proveniente do veneno do *Bufo paracnemis*. 56
- Figura 7.** Resposta contrátil induzida pela estimulação por campo elétrico de segmentos isolados de íleo de cobaio. 59

- Figura 8.** Efeito do telocinobufagin sobre a resposta contrátil 60 induzida pela estimulação por campo elétrico de segmentos isolados de íleo de cobaio.
- Figura 9.** Resposta contrátil induzida pela estimulação por 61 campo elétrico de segmentos isolados de íleo de cobaio após a retirada do telocinobufagin.
- Figura 10.** Efeito do etanol sobre a resposta contrátil induzida 62 pela estimulação por campo elétrico de segmentos isolados de íleo de cobaio.
- Figura 11.** Efeito da bupivacaína sobre a resposta contrátil 64 induzida pela estimulação por campo elétrico de segmentos isolados de íleo de cobaio.
- Figura 12.** Resposta contrátil induzida pela estimulação por 65 campo elétrico de segmentos isolados de íleo de cobaio após a retirada da bupivacaína.
- Figura 13.** Efeito do telocinobufagin sobre as contrações 67 induzidas pela acetilcolina (ACh) em íleo isolado de cobaio.
- Figura 14.** Efeito do etanol sobre as contrações induzidas pela 69 acetilcolina (ACh) em íleo isolado de cobaio.
- Figura 15.** Efeito da bupivacaína sobre as contrações 71 induzidas pela acetilcolina (ACh) em íleo isolado

de cobaio.

- Figura 16.** Efeito do telocinobufagin sobre a amplitude pico-a- 74  
pico do potencial de ação composto do nervo  
ciático de rato.
- Figura 17.** Efeito do telocinobufagin sobre o potencial de ação 75  
composto (PAC) em nervo ciático isolado de rato.
- Figura 18.** Efeito do telocinobufagin sobre a velocidade de 76  
condução do potencial de ação composto do nervo  
ciático de rato.
- Figura 19.** Efeito da bupivacaína sobre a amplitude pico-a- 78  
pico do potencial de ação composto do nervo  
ciático de rato.
- Figura 20.** Efeito da bupivacaína sobre o potencial de ação 79  
composto (PAC) em nervo ciático isolado de rato.
- Figura 21.** Efeito da bupivacaína sobre a velocidade de 80  
condução do potencial de ação composto do nervo  
ciático de rato.
- Figura 22.** Efeitos do etanol, bupivacaína e telocinobufagin na 83  
força de contração (inotropismo) cardíaca de ratos.
- Figura 23.** Efeitos do telocinobufagin na força de contração 84  
(inotropismo) cardíaca de ratos durante 12 minutos  
de observação.

- Figura 24.** Efeitos do etanol (controle) na força de contração 85 cardíaca do átrio esquerdo de ratos.
- Figura 25.** Efeitos do etanol, bupicavaína e telocinobufagin na 88 frequência de contração espontânea do átrio direito de ratos.
- Figura 26.** Efeitos do etanol na frequência de contração 89 espontânea do átrio direito de ratos.

#### *LISTA DE TABELAS*

- Tabela 1-** Valores da concentração do telocinobufagin 68 responsáveis por 50 % de inibição da resposta máxima ( $CI_{50}$ ) para o bloqueio das contrações induzidas por acetilcolina (ACh;  $1\mu\text{M}$ ) e estimulação por campo elétrico (ECE) pelo telocinobufagin e bupivacaína em íleo isolado de cobaio.

## LISTA DE QUADROS

- 
- Quadro 1.* Protocolo do Telocinobufagin em experimentos de 45  
contração por estimulação por campo elétrico (ECE)  
no íleo isolado de cobaio.
- Quadro 2.* Protocolo da Bupivacaína em experimentos de 45  
contração por estimulação por campo elétrico (ECE)  
no íleo isolado de cobaio.
- Quadro 3.* Protocolo do Etanol em experimentos de contração 45  
por estimulação por campo elétrico (ECE) no íleo  
isolado de cobaio.
- Quadro 4.* Protocolo do Telocinobufagin em experimentos de 46  
contração basais por acetilcolina (ACh) no íleo  
isolado de cobaio.
- Quadro 5.* Protocolo do Bupivacaína em experimentos de 46  
contração basais por acetilcolina (ACh) no íleo  
isolado de cobaio.
- Quadro 6.* Protocolo do Etanol em experimentos de contração 46  
basais por acetilcolina (ACh) no íleo isolado de  
cobaio.

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                   |   |
|-------------------|---|
| abs               | Absorbância   |
| ACh               | Acetilcolina  |
| AL                | Anestésicos Locais  |
| bpm               | Batimentos por minuto   |
| Ca <sup>++</sup>  | Cálcio  |
| CaCl <sub>2</sub> | Cloreto de cálcio   |
| CI <sub>50</sub>  | Concentração na qual se obtém 50 % da resposta<br>inibitória máxima Na <sup>+</sup> Sódio |
| cm                | Centímetro  |
| CO <sub>2</sub>   | Dióxido de carbono  |
| Da                | Daltons   |
| DMSO              | Dimetilsulfóxido  |
| ECE               | Estimulação por campo elétrico  |
| EPM               | Erro padrão da média  |
| F                 | Fenilalanina  |
| g                 | Grama   |

|                    |  |
|--------------------|--|
| h                  | Hora                                     |
| HPLC               | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| Hz                 | Hertz                                    |
| I                  | Isoleucina                               |
| IFM                | Isoleucina-fenilalanina-metionina        |
| K <sup>+</sup>     | Potássio                                 |
| KCl                | Cloreto de potássio                      |
| KH                 | Solução de Krebs–Henseleit               |
| M                  | Molar                                    |
| MgCl <sub>2</sub>  | Cloreto de magnésio                      |
| min                | Minutos                                  |
| ml                 | Mililitro                                |
| mM                 | Milimolar                                |
| ms                 | Milissegundos                            |
| mV                 | Milivolts                                |
| NaCl               | Cloreto de sódio                         |
| NaHCO <sub>3</sub> | Bicarbonato de sódio                     |
| nm                 | Nanômetro                                |

|                   |  |
|-------------------|--|
| °C                | Graus centígrados                      |
| PA                | Potencial de ação                      |
| PAC               | Potencial de ação composto             |
| PaCO <sub>2</sub> | Pressão arterial de dióxido de carbono |
| S                 | segmentos                              |
| S                 | segundo                                |
| SCV               | Sistema Cardiovascular                 |
| SNC               | Sistema Nervoso Central                |
| TN                | Tyrode normal                          |
| Tris              | Trihidroximetil-aminometano            |
| V                 | Volts                                  |
| VD <sub>ss</sub>  | Volume de distribuição no equilíbrio   |
| Y                 | tirosina                               |
| $\alpha$          | Alfa                                   |
| $\beta_1$         | beta-1                                 |
| $\beta_2$         | beta-2                                 |
| $\mu\text{m}$     | Micrômetro                             |

## RESUMO

EFEITOS FARMACOLÓGICOS DO TELOCINOBUFAGIN, UM BUFADIENOLÍDEO ORIUNDO DAS GLÂNDULAS PAROTÓIDES DO *Bufo paracnemis*: ESTUDO COMPARATIVO COM O ANESTÉSICO LOCAL BUPIVACAÍNA. Aluno: Manoel Cláudio Azevedo Patrocínio. Orientador: Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, 2004.

Foram avaliados os efeitos do bufadienolídeo telocinobufagin (TCB), obtido das glândulas parotóides do *Bufo paracnemis* por cromatografia líquida de alta eficiência, comparando-os com os do anestésico local bupivacaína (BUPI). TCB ( $10^{-8}$  a  $6 \times 10^{-4}$  M) inibiu, de modo concentração-dependente, as contrações induzidas por estimulação por campo elétrico (ECE) em íleo isolado de cobaio, cujo valor foi  $0,9 \pm 0,9$  % da resposta controle, na concentração de  $6 \times 10^{-4}$  M. Da mesma forma, TCB ( $10^{-6}$  a  $10^{-4}$  M) inibiu, as contrações induzidas pela ACh. BUPI ( $10^{-7}$  -  $10^{-3}$  M) inibiu, de modo concentração-dependente, tanto as contrações induzidas por ECE quanto as induzidas por ACh. Em nervo ciático isolado de rato, a amplitude pico-a-pico (APP) do potencial de ação composto (PAC) caiu para  $64,9 \pm 7,2$  e  $12,9 \pm 4,4$  % do controle, após 15 e 30 min com 1 mM TCB, respectivamente, retornando para  $83,2 \pm 17,5$  % lavando-se o nervo com Locke por 45 min. Nas mesmas condições, a velocidade de condução (VC) do PAC caiu para  $15,0 \pm 15,0$  % da controle, após 30 min; sendo recuperada para  $78,7 \pm 7,2$  % após 45 min da retirada do TCB. BUPI (1mM) diminuiu tanto a APP do PAC para  $46,7 \pm 14,4$  % e  $11,8 \pm 6,5$  % da controle, após 15 e 30 min, respectivamente, quanto a VC

para  $17,4 \pm 11,2$  % da controle, após 30 min; após 45 min da lavagem reverteu parcialmente a APP e a VC para  $29,7 \pm 8,3$  e  $44,8 \pm 14,5$  % da obtida no controle, respectivamente. Em átrio isolado de rato, TCB ( $10^{-6}$  a  $10^{-4}$ M) não alterou o inotropismo espontâneo, o que foi reduzido pela BUPI ( $10^{-4}$  M). Portanto, TCB possui propriedades anestésicas locais reversíveis semelhantes à BUPI, sem apresentar, no entanto, sinais de toxicidade cardíaca in vitro, abrindo perspectivas para busca de novas moléculas com ação anestésica local com potencial interesse terapêutico.

Palavras-chave: *Bufo paracnemis*, Bufadienolídeo, Telocinobufagin, Glândulas Parotóides, Anestésico Local e Bupivacaína.

## ABSTRACT

PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF TELOCINOBUFAGIN, A BUFODIENOLIDE ORIGINATED FROM THE PAROTOID GLANDS OF *Bufo paracnemis*: COMPARATIVE STUDY WITH LOCAL ANESTHETIC BUPIVACAINE. Author: Manoel Cláudio Azevedo Patrocínio. Advisor: Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho. Doctoral Thesis. Program of Post-Graduate in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology. Federal University of Ceará, 2004.

The pharmacological effects of telocinobufagin (TCB), a bufadienolide extracted from *Bufo paracnemis* parotoid glands by HPLC, were compared to that induced by bupivacaine (BUPI). On guinea-pig isolated ileum, TCB ( $10^{-8}$  to  $10^{-4}$  M) inhibited both, the electrical field stimulation (EFS)-induced contraction (with a value of  $0.9 \pm 0.9$  % of the control response at  $6 \times 10^{-4}$  M), and the contractions elicited by ACh, in a concentration-dependent manner. BUPI ( $10^{-7}$  to  $10^{-3}$  M) also inhibited both, the EFS- and the ACh-induced contractions on guinea-pig isolated ileum, in a concentration-dependent manner. On rat isolated sciatic nerve, TCB (1 mM) reduced the compound action potential (CAP) peak-to-peak amplitude (PPA) to  $64.9 \pm 7.2$  % and  $12.9 \pm 4.4$  % of the control amplitude after 15 min and 30 min, respectively; withdrawal of telocinobufagin reversed to  $83.2 \pm 17.5$  % after 45 min. TCB reduced the CAP conduction velocity (CV) to  $15.0 \pm 15.0$  % of the control after 30 min; wash reversed to  $78.7 \pm 7.2$  % of the control. BUPI (1 mM) inhibited the CAP PPA to  $46.7 \pm 14.4$  % and  $11.8 \pm 6.5$  % of the control after 15 min and 30 min, respectively; it recovered partially to  $29.7 \pm 8.3$  % after 45 min of wash. BUPI inhibited the CAP CV to  $17.4 \pm 11.2$  % of the control after 30 min;

it recovered partially to  $44.8 \pm 14.5$  % after 45 min of wash. On rat isolated atrium, TCB ( $10^{-6}$  to  $10^{-4}$  M) did not alter the spontaneous inotropism, which was abolished by BUPI. Thus, TCB showed a reversible local anesthetic action, similar to BUPI, however, without cardiac toxicity in vitro. This study shows perspectives to research of new molecules for local anesthetic activity with therapeutic interest.

Keywords: *Bufo paracnemis*, Bufodienolide, Telocinobufagin, Parotoid Glands, Local Anesthetic and Bupivacaine.

# **1 – INTRODUÇÃO**

## **1.1 – ANESTÉSICOS LOCAIS**

### **1.1.1 - DEFINIÇÃO**

Quando aplicados localmente ao tecido nervoso em concentrações apropriadas, os anestésicos locais (AL) bloqueiam reversivelmente o potencial de ação responsável pela condução nervosa. Eles atuam em qualquer parte do sistema nervoso e em todo tipo de fibra nervosa. Na prática clínica, sua grande vantagem é que sua ação é reversível, sendo seguida por uma completa recuperação da função do nervo, sem evidência de danos às fibras nervosas ou às células (Catterall & Mackie, 2001).

### **1.1.2 – Histórico**

A dor e a fome tornam os seres humanos míseros. A dor é o desafio do cientista; a fome, de toda a humanidade. Esta assola um número de modo inverossímil e assustador, embora de uma determinada classe social; aquela não seleciona classes, assola a todas. Os míseros precisam de misericórdia, os doridos precisam de lenitivo ou tratamento às suas dores. A busca para o alívio da dor sempre fez parte da vida humana, transcendendo os primórdios. Não há distinção de classes, cor, religião, quando a dor se apodera do homem.

O desenvolvimento da anestesia, em geral, fez-se com uma alteração cultural. O conceito de dor (dor do parto, por exemplo) esteve ligado ao

conceito de pecado original, e a habilidade para suportar a dor foi relacionada como um sinal de caráter e, nos homens, esteve associada com a virilidade (Greene, 1971).

A história dos AL remonta desde a antiguidade. O cultivo e uso das folhas da coca na região da Bolívia e Andes vêm 700 anos antes de Cristo (a.C.), embora recentes descobertas no Equador indiquem seu uso de mais de 5000 anos atrás. Alfred Bühler hipotetizou que *Ahruaco*, uma tribo da região do Rio Negro, tenha sido a primeira a descobrir as propriedades da cocaína e difundido seu conhecimento para os povos vizinhos (Calatayud & González, 2003).

A primeira referência dos efeitos AL das folhas da coca foi do jesuíta espanhol Bernabé Cobo em 1653, mencionando que dores de dente podem ser aliviadas ao mascar folhas da coca (Calatayud & González, 2003).

As folhas da coca são tomadas de arbustos do gênero *Erythroxylum*, um membro da família *Erythroxylaceae*. As folhas da *Erythroxylum coca* contêm a mais alta concentração do alcalóide conhecido como cocaína nas folhas, até 0,7-1,8% por peso (Ritchie & Greene, 1987).

O princípio ativo foi isolado das folhas de coca de modo não fácil. O naturalista austríaco Carl Von Scherzer viajou o mundo e coletou no Peru uma grande amostragem das folhas, enviando ao químico alemão Albert Niemann. Este, no laboratório de Göttingen, em 1860, isolou um princípio ativo, colocando o nome de cocaína. Niemann reportou e claramente demonstrou a

dormência da língua causada pelo alcalóide (Catterall & Mackie, 2001; Calatayud & González, 2003).

O desenvolvimento da anestesia local foi uma contingência da invenção da seringa hipodérmica. Em 1851, um cirurgião veterinário Charles Gabriel Pavraz de Lyon desenvolveu uma seringa para tratar aneurisma em animais. Em 1855, um médico escocês Alexander Wood publicou um trabalho com nove casos com uso da morfina por meio da seringa, aperfeiçoando a seringa (Collins, 1978; Fink, 1985).

O primeiro estudo experimental da cocaína foi conduzido por um médico peruano, ex-cirurgião naval, Thomas Moreno Y Maiz, como parte de sua tese de Doutorado, em 1868 em Paris. Ele descobriu que injeções de cocaína causavam insensibilidade em ratos, cobaias e em rãs; e na página 77 ele mencionou seus efeitos AL. Entretanto, ele não fez menção de seu uso em cirurgia (Covino & Vassalo, 1985; Carvalho, 1994; Calatayud & González, 2003).

Um médico e aristocrata russo, em 1880, Vassily (Basil) Konstantinovich von Anrep da Universidade de Würzburg publicou um artigo com experimentos em animais (ratos, cachorros, gatos, coelhos e pombos), órgãos e tecidos animais, e nele mesmo. Anrep injetou cocaína em solução a 0,6 % sob a pele em seu antebraço e uma solução a 1 % em sua língua, causando em ambos uma insensibilidade. De tal modo, ele recomendou a cocaína como um anestésico cirúrgico (Yentis & Vlassakov, 1999; Calatayud & González, 2003).

O crédito para introdução da cocaína é dado a dois médicos vienenses, Sigmund Freud e Karl Koller. Em 1884, Freud fez um estudo geral dos efeitos fisiológicos da cocaína. Ele estava impressionado pelas ações centrais da droga e a utilizou para curar um dos seus colegas do vício da morfina. Embora tenha sido bem-sucedido, isso causou o aparecimento de um dos primeiros viciados em cocaína. O estudo sobre a ação estimulante central da cocaína deu a Freud o título de Pai da Psicofarmacologia (Vale & Simonetti, 2001).

Freud publicou uma revisão da cocaína, sem particular atenção ao efeito anestésico do alcalóide nas membranas mucosas. Koller atentou para esta importância. Ele utilizou cocaína 2-5 % em córneas de cachorros e cobaias, embora que seus primeiros experimentos tenham sido realizados em rãs. Ele também usou a cocaína em si mesmo e alguns pacientes. Em 11 de Setembro de 1884, ele realizou a primeira cirurgia usando anestésico local em um paciente com glaucoma. Josef Brettauer leu seu trabalho no congresso de oftalmologia de Heidelberg no dia 15 de Setembro de 1884, o que tornou Koller o pai da anestesia local (Calatayud & González, 2003).

William Halsted, no final de 1884, publicou a primeira realização, com sucesso, do bloqueio de nervo. Halsted e seu colega Richard John Hall desenvolveram técnicas de bloqueio regional e em nervos (Collins, 1978).

Um neurologista de Nova York, em 1885, Leonard Corning utilizou cães para produzir anestesia em nervos raquídeos. A primeira anestesia humana foi casual, pois Corning injetou cocaína a 0,5 % para o tratamento de um paciente masturbador compulsivo. A primeira raquianestesia foi realizada por August Bier em Kiel (Alemanha), em 1898, para analgesia cirúrgica de

um joelho, utilizando a agulha de punção lombar de Quincke (Collins, 1978; Vale & Simonetti, 2001).

A utilização da cocaína se espalhou pelo mundo. Contudo, a cocaína era administrada em altas concentrações (10 a 30 %), suscitando uma gama de alarmantes efeitos colaterais. Entre 1884 e 1891, 200 casos de intoxicação sistêmica e 13 mortes atribuídas a droga foram relatadas, extinguindo o entusiasmo por seu uso. Além disso, os efeitos do vício da cocaína começaram a surgir, vitimando Freud e Halsted (Calatayud & González, 2003).

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

Uma pesquisa química à procura de substitutos sintéticos para a cocaína começou em 1892, com Alfred Einhorn, um químico alemão. Ele patenteou dezoito derivados do ácido para-aminobenzóico em Hesse, Alemanha. O composto número dois trouxe uma alteração radical no cenário existente, era a procaína (Ritchie & Greene, 1987).

O professor Heinrich Braun, em 1905, reportou em um artigo excelentes resultados com a procaína. Foi achada segura e rapidamente se tornou o padrão dos AL. A procaína era suficientemente hidrossolúvel em solução, possuindo uma boa margem de segurança local e sistêmica para uso

clínico (Covino & Vassalo, 1985). Contudo, seus efeitos AL eram fracos e alguns pacientes e profissionais apresentavam elevado índice de reações alérgicas (Miller & Katzung, 2003).

Novas drogas do tipo éster foram sintetizadas. A tetracaína, o mais potente da série dos derivados do ácido para-aminobenzóico, surgiu em 1930. A cloroprocaína, a menos tóxica deste grupo, foi descoberta em 1952 (Covino & Vassalo, 1985).

Todas as drogas vinham de uma origem comum, tendo em comum uma porção amina e, na cadeia intermediária, um grupamento tipo éster. Assim, possuem uma tendência a produzir reações alérgicas (Covino & Vassalo, 1985).

Uma grande descoberta na química dos AL aconteceu em 1943, quando Nils Löfgren e Bengt Lundquist sintetizaram um derivado xilidina denominado lidocaína. A lidocaína representou a maior descoberta química, em relação aos AL anteriores, visto que não é um éster, mas uma amida derivada do ácido dietilaminoacético, isenta de reações de sensibilização (Covino & Vassalo, 1985; Holmdahl, 1998; Calatayud & González, 2003).

Outras drogas do tipo amida foram desenvolvidas. Em 1957, Boaf Ekenstam e colaboradores sintetizaram a mepivacaína e a bupivacaína; em 1969, a prilocaína foi sintetizada por Nils Löfgren e Cläes Tegner; em 1972, Adams e colaboradores desenvolveram a etidocaína. A articaína apareceu em 1972. A ropivacaína surgiu em 1996, enquanto a levobupivacaína em 2000 (Liu & Hodgson, 2001; Calatayud & González, 2003).

Até hoje, não há substâncias oriundas de animais que são utilizadas como AL na prática clínica.

### **1.1.3 – FARMACOLOGIA**

#### **1.1.3.1 – ESTRUTURA**

Os AL utilizados na prática clínica são capazes de produzir interrupção reversível da função neural de modo muito similar. Um fator estrutural em todos os AL é a ligação de dois diferentes grupos químicos. Uma molécula que resulta da combinação de dois grupos diversos é denominada anfipática, possuindo um lado lipofílico e outro hidrofílico, ligados por uma cadeia intermediária. A ligação intermediária ocorre por um éster ou uma amida, gerando duas classes de AL: tipo éster e tipo amida (**Figura 1**) (Liu & Hodgson, 2001; Berde & Strichartz, 2000).

Os AL são, na sua maioria, aminas terciárias, derivadas da amônia. Devido à natureza iônica dos derivados da amônia, a molécula resultante é uma base fraca. Assim, os AL possuem uma baixa hidrossolubilidade, sendo preparados como um sal, mais freqüentemente do ácido clorídrico. O componente resultante dissocia-se em equilíbrio entre a forma neutra, denominada base, e a forma carregada, denominada cátion, dependendo das condições ácido-básicas da solução (Covino & Vassalo, 1985; Liu & Hodgson, 2001).

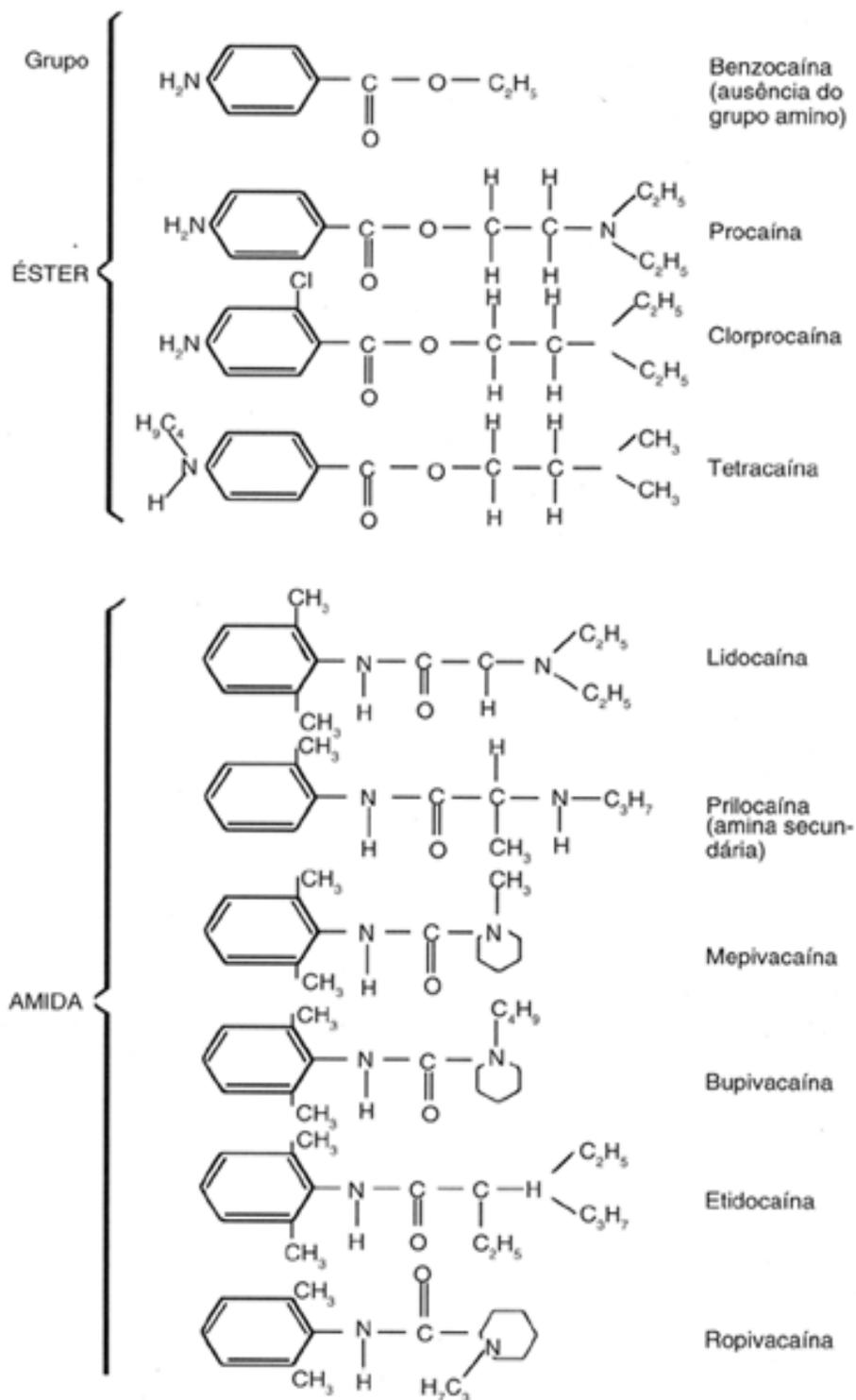
A ligação ao anel aromático propicia a classificação dos AL em tipo éster pela ligação éster (-CO-) e em tipo amida pela ligação amida (-C-NH-) (Vale & Simonetti, 2001). A ligação da cadeia intermediária é geralmente o primeiro passo na biotransformação. Os AL do tipo éster são oriundos do ácido benzóico, e a cadeia intermediária está sujeita à rápida hidrólise pela colinesterase plasmática, possuindo uma meia-vida curta. O grupo amida é oriundo da anilina e seu metabolismo requer biotransformação por conjugação hepática, possuindo uma meia-vida mais longa. A potência bem como a toxicidade são determinadas pela redistribuição antes da eliminação. A presença do anel aromático dá um caráter lipofílico à molécula dos AL. A porção lipofílica é a parte da molécula que facilita a captação e a passagem através da membrana celular do nervo. A potência anestésica está relacionada à solubilidade lipídica. Há uma forte correlação entre coeficiente de partição óleo e água *in vitro* dos AL e sua potência, estabelecida em modelo animal *in vivo* (Liu & Hodgson, 2001).

A solubilidade lipídica é um fator determinante da atividade. O aumento da solubilidade resulta em aumento do seqüestro na mielina e em outros compartimentos lipossolúveis, gerando um início de ação mais lento. De conformidade, a duração da ação é aumentada, devido ao depósito com lenta liberação dos AL. Finalmente, a solubilidade lipídica aumentada produz aumento da potência dos AL (Gissen et al., 1982; Liu & Hodgson, 2001; Berde & Strichartz, 2000).

O grau de ligação protéica afeta também a atividade dos AL. Há uma correlação onde o aumento da ligação protéica associa-se a um aumento da duração. Embora o canal de sódio, local de ação dos AL, tenha uma estrutura

protéica, não parece justificar a correlação entre ligação protéica e duração de ação. Estudos recentes sugerem que a dissociação das moléculas anestésicas locais dos canais de sódio ocorre em fração de segundos. Assim, o prolongamento na duração da ação deve envolver outras proteínas de membrana ou extracelulares (Ulbricht, 1981; Liu & Hodgson, 2001).

A estereoisomeria é uma propriedade física de interesse recente na prática clínica. Isômeros *R*-(+) parecem ter maior potência *in vitro* para bloquear canais de sódio neurais e cardíacos, apresentando maior eficácia terapêutica e potencial toxicidade sistêmica. Os canais de sódio são formados por aminoácidos levógiros, possuindo maior afinidade pelos AL dextrógiros. A ropivacaína é um isômero levógiro puro, tendo se mostrado menos cardiotoxicidade (McClure, 1996; Liu & Hodgson, 2001; Vale & Delfino, 2003).



**Figura 1.** Estruturas químicas dos anestésicos locais.

(Fonte: Silva, 2002).

### 1.1.3.2 – RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE

Para uso clínico, os AL são preparados como forma de sais, mais usualmente cloridratos. Em solução aquosa, o sal ioniza-se para uma forma de amina quaternária positivamente carregada, equilibrando-se com sua forma não-carregada ou também chamada básica. A porcentagem exata de cada forma depende do pKa, ou constante de dissociação, do anestésico local e do pH do meio. À medida que o pH diminui, o equilíbrio é desviado para a forma protonada (Carpenter & Mackey, 1996).

A combinação de pH do meio e pKa de um anestésico local determina quanto do composto existirá em cada forma, básica ou catiônica (carregada). O sítio primário de ação dos AL está no lado intracelular, e a forma carregada é a forma ativa. A penetração da forma solúvel em lipídio através da membrana neural é forma primária de acesso das moléculas de AL, embora alguma forma carregada possa entrar via canal de sódio aquoso. Deste modo, diminuindo o pKa para um dado meio com seu pH aumentará a porcentagem da forma básica, acelerando a penetração na membrana neural e encurtando o início de ação (latência) (Covino & Vassalo, 1985; Carpenter & Mackey, 1996).

A lidocaína possui um pKa de 7,7-7,9 e a bupivacaína, 8,1. Em condições de pH normal de 7,4, as soluções contêm 65% de lidocaína na forma catiônica e 80-85% de bupivacaína na forma catiônica. Em tecido com pH menor, como na acidose sistêmica ou acidose local de infecção, a porcentagem da forma catiônica fica maior (Carpenter & Mackey, 1996; Berde & Strichartz, 2000).

As propriedades básicas dos AL podem ser manipuladas através de alterações na sua estrutura molecular. A adição de grupos alifáticos à cadeia intermediária ou à amina terciária aumenta ambos, solubilidade lipídica e potência (Strichartz et al., 1990). Um exemplo é transição da mepivacaína (metil) para bupivacaína (butil) que ocorre com a substituição do grupo de hidrocarbono simples na amina terciária, resultando em aumento do potencial lipofílico, potência e toxicidade da bupivacaína comparada à mepivacaína (Tetzlaff, 2000). Aumentando a amina terciária da lidocaína para uma amina quaternária cria um anestésico local com ação ultra-longa (Wang et al., 1995). A adição de um grupo com quatro carbonos à porção aromática da procaína gera a tetracaína, um anestésico significativamente mais lipossolúvel e potente (Concepcion & Covino, 1984).

### **1.1.3.3 – PREPARAÇÕES**

A forma neutra dos AL é pobremente solúvel em solução aquosa. Os AL são preparados como sais, cloridratos, e dissolvidos em água ou solução salina. A solução é acidificada para um pH de 4,40 a 6,40, favorecendo a forma catiônica. Um artifício na prática clínica é aumentar o pH da solução, destarte que se encurta o início e aumenta a duração do bloqueio, bem como aumenta o risco de precipitação (Carpenter & Mackey, 1996).

Quando se adiciona epinefrina às soluções, elas devem ser acidificadas, visto que soluções alcalinas promovem oxidação de catecolaminas. Contudo, a alcalinização das soluções, contendo epinefrina no ato anestésico, resulta em uma queda significativa na concentração de epinefrina. Os anti-oxidantes têm sido adicionados para retardar a degradação

da epinefrina. O metabissulfito de sódio é bastante utilizado, mas está implicado em quadros de neurotoxicidade da cloroprocaína (Carpenter & Mackey, 1996; Miller & Katzung, 2003).

Conservantes têm sido utilizados com as soluções dos AL, posto que apresentam atividades antibacteriana e antifúngica. Eles estão implicados em desenvolver potencial efeito citotóxico, não sendo recomendados em anestésias espinhal, epidural ou caudal. Os mais utilizados são metilparaben, etilparaben e propilparaben. Estes são potentes alergênicos e estão implicados em reações alérgicas inicialmente atribuídas aos AL (Carpenter & Mackey, 1996; Berde & Strichartz, 2000).

#### **1.1.4 – ANATOMIA DO NERVO**

O bloqueio dos AL dá-se em nervos centrais e periféricos. Os nervos periféricos são nervos mistos, contendo fibras aferentes e eferentes. Os axônios individuais, no nervo periférico, são envoltos por tecido conjuntivo frouxo, o endoneuro. O fascículo nervoso é um feixe composto por pequenos grupos de axônios intimamente associados. O fascículo é definido por bainha de tecido conjuntivo, o perineuro, que confere força mecânica ao nervo periférico e barreira à difusão. Essa barreira ajuda a preservar o ambiente iônico do axônio. Vários fascículos reunidos formam feixes fasciculares, e estes por sua vez formam coletivamente o nervo periférico, incluído em tecido conjuntivo frouxo, chamado epineuro (Kingsley, 2001). Deste modo, diversas camadas de tecidos envolvem os axônios individuais, atuando como barreiras à penetração dos AL.

O Sistema Nervoso Periférico contém apenas um tipo de célula de sustentação, a célula de Schwann. Esta desempenha todas as funções de sustentação básica nos nervos. Os axônios mielinizados e os não-mielinizados são isolados do ambiente extracelular pelas células de Schwann (Kingsley, 2001). A mielina, constituída por lipídios e proteínas de membrana, é produzida pelas células de Schwann. Todos os nervos de mamíferos com diâmetro maior do que  $1\mu\text{m}$  são mielinizados. As fibras nervosas mielinizadas são envolvidas pelas células de Schwann por centenas de vezes em cada axônio, fazendo com que a mielina seja a metade da espessura de fibras  $> 1\mu\text{m}$ . Separando as regiões mielinizadas, estão os nodos de Ranvier, onde elementos estruturais para excitação neuronal são encontrados. Os nodos são cobertos por interdigitações de células de Schwann e glicoproteínas carregadas negativamente. Estas áreas permitem a passagem de drogas e íons. As fibras nervosas não-mielinizadas são revestidas por uma célula de Schwann que envolve 5-10 fibras de uma vez. Estas não possuem interrupções, os nodos de Ranvier. A existência de múltiplas camadas de proteção, em ambas as fibras nervosas, apresenta uma barreira substancial para a entrada de AL usados clinicamente. Modelos animais sugerem que somente 1,6% da dose injetada dos AL penetram no nervo (Liu & Hodson, 2001).

As fibras nervosas são classificadas pelo tamanho, velocidade de condução e função. Geralmente, a mielinização e o diâmetro do nervo aumentam a velocidade de condução. A presença de mielina acelera a velocidade de condução pela condução saltatória. Os nervos mielinizados e não-mielinizados carregam funções aferentes e eferentes (Liu & Hodgson, 2001; Berde & Strichartz, 2000).

### 1.1.5 – ELETROFISIOLOGIA DO NERVO

O potencial de repouso existe em todas as células vivas do reino animal e vegetal, mas o que caracteriza o neurônio é o potencial de ação (PA). O PA é um sinal elétrico muito rápido e de natureza digital; ele confere ao neurônio à capacidade de transmitir informação (Lent, 2001).

Os sinais que passam de neurônio a neurônio são de natureza elétrica. Estes sinais ocorrem como mudanças transitórias nas diferenças de potencial elétrico através dos neurônios. Tais potenciais são gerados por gradientes iônicos. O citoplasma de um neurônio em repouso tem baixas concentrações de sódio e cloreto 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  $-70$  a  $-60$  mV. No estado de repouso, a membrana é 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 cargas positivas 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 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 de íons, contra um gradiente de concentração (Covino & Vassalo, 1985). Esse transporte ativo de íons é possível através do funcionamento que se denomina bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ . A bomba funciona levando os íons sódio para exterior e os íons potássio para o interior da célula, isso restabelece as diferenças de concentração entre o interior e o exterior da membrana (Garrett & Grisham, 1995).

### 1.1.6 – FARMACODINÂMICA

O mecanismo primário de ação dos AL consiste em inibir a condução nervosa, por bloqueio dos canais de sódio regulados por voltagem (Olschewski et al., 1998; Miller & Katzung, 2003; Zink & Graf, 2003).

O potencial de membrana de repouso é pouco afetado pelos AL. Os AL causam uma diminuição na taxa e no grau de despolarização do impulso nervoso; de tal forma que, progressivamente, o limiar de excitabilidade para a transmissão não é mais atingido e o impulso nervoso deixa de ser propagado ao longo do nervo (Kohane et al., 2000; Vladimirov et al., 2000).

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, 1996).

Os AL podem penetrar a membrana, causando expansão e distorção dos canais de sódio, de modo análogo à hipótese de volume crítico dos anestésicos gerais (Morgan et al. 2001). O conceito de expansão se aplica à ação de substâncias neutras como a benzocaína, não explicando a atividade anestésica das moléculas carregadas (Savarese & Covino, 1984).

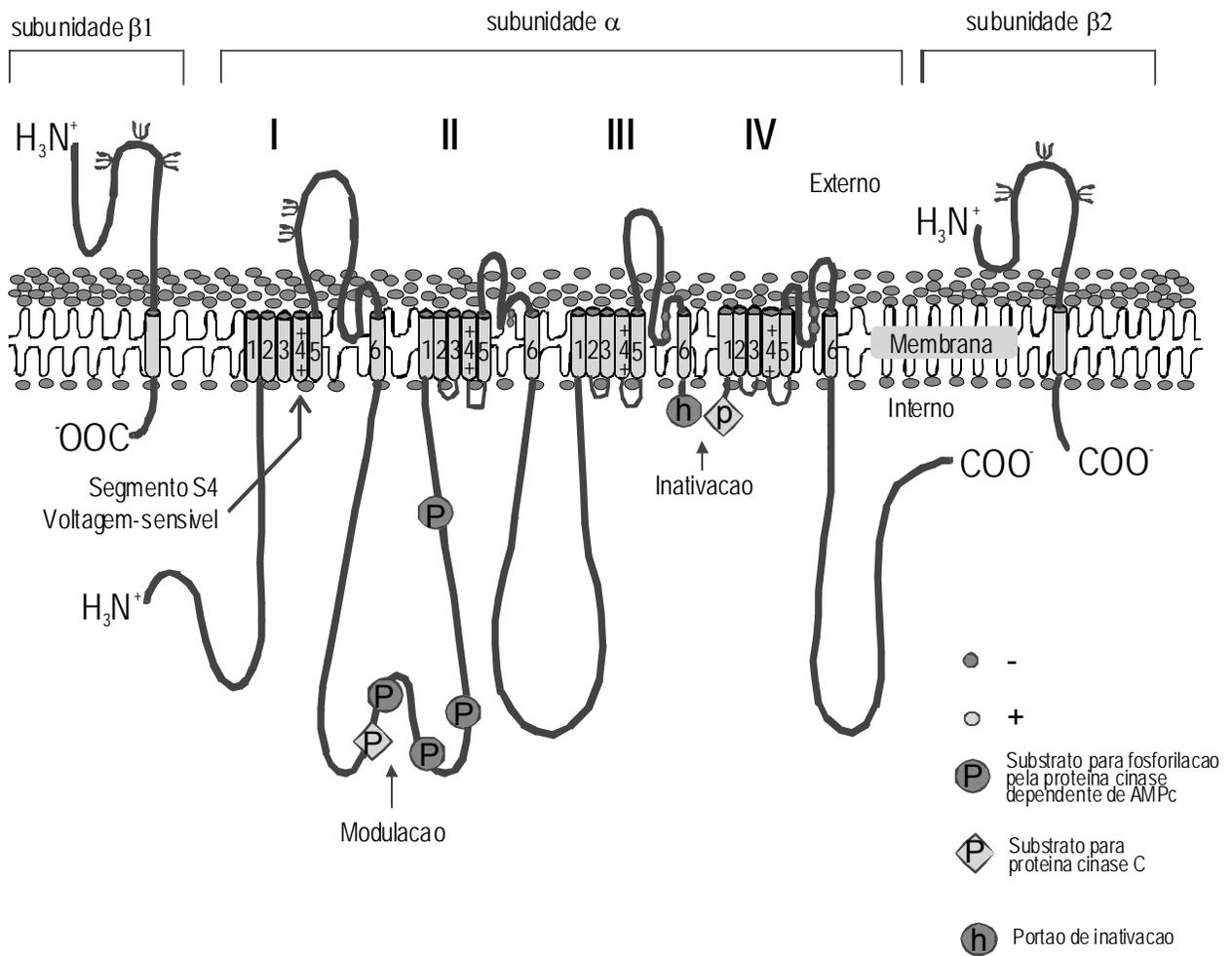
O bloqueio dos canais de sódio pela maioria dos AL é dependente do tempo e da voltagem. Os canais no estado de repouso apresentam menor afinidade do que os canais no estado ativado (aberto) e no estado inativado

(fechado). Assim, o efeito é mais acentuado nos axônios de rápida descarga do que nas fibras em repouso (Miller & Katzung, 2003).

Análogos quaternários dos AL bloqueiam a condução, quando aplicados internamente em axônios gigantes de lula, sendo ineficazes quando aplicados externamente. Essas observações sugerem que o local onde os AL atuam, pelo menos a sua forma ionizada, só é acessível a partir da superfície interna da membrana (Narahashi & Frazier, 1971; Strichartz & Ritchie, 1987). Portanto, os AL aplicados externamente necessitam atravessar primeiro a membrana, antes que possam exercer uma ação bloqueadora (Catterall & Mackie, 2001).

Os AL locais interagem com um ou mais locais específicos de ligação no canal de sódio (Butterworth & Strichartz, 1990).

O canal de sódio sensível à voltagem é uma proteína transmembrana essencial para geração dos potenciais de ação nas células excitáveis. O canal de sódio dos mamíferos é um complexo heterotrimérico de proteínas glicosiladas com um agregado molecular de tamanho superior a 300 kilodaltons (**Figura 2**); as subunidades individuais são denominadas como alfa (260 kilodaltons), beta-1 (36 kilodaltons) e beta-2 (33 kilodaltons). As subunidades  $\alpha$  e  $\beta_2$  são covalentemente ligadas por pontes de dissulfetos, enquanto a  $\beta_1$  está associada não covalentemente (Catterall, 1992; Garrett & Grisham, 1995; Catterall & Mackie, 2001; Scholz, 2002; Catterall, 2002).



**Figura 2.** Apresentação bidimensional das subunidades α (centro), β1 (esquerda) e β2 (direita) do canal de sódio sensível à voltagem no cérebro de mamíferos.

(Fonte: Silva, 2002)

O local de condução do canal de sódio é a chamada subunidade alfa. Sua seqüência funcional de aminoácidos resulta em uma cadeia de 1950 aminoácidos, que transpõe a membrana celular diversas vezes (Scholz, 2002).

O canal consiste de quatro domínios (DI-DIV), cada um contém seis hélices que transpõe a membrana e são denominados segmentos S1-S6 (Scholz, 2002).

Há um sensor de voltagem para ativação da abertura do canal. Este sensor de voltagem está localizado na hélice transmembrana S4 de cada domínio. As hélices S4 são hidrofóbicas e têm cargas positivas, e contêm resíduos de lisina ou arginina em cada terceira posição. Os segmentos S4 podem exibir o movimento externo ou de rotação para abrir o portão de ativação (Catterall & Mackie, 2001; Wang & Wang, 2003).

Os segmentos S6 transmembrana hidrofóbicos de cada domínio formam o largo limite interno do poro central do canal. Enquanto as alças curtas SS1-SS2, associadas à membrana entre S5 e S6, formam o limite externo do poro central do canal. Os resíduos de aminoácidos nesses segmentos curtos são determinantes críticos da condutância ao íon e da seletividade do canal (Catterall & Mackie, 2001; Wang & Wang, 2003).

Em fração de milissegundos, o canal de sódio é inativado, decorrente do fechamento de um portão de inativação. A alça curta que conecta os domínios III e IV funciona como o portão de inativação. Este se dobra na borda intracelular do poro ocluindo-o. A seqüência de três resíduos

hidrofóbicos de aminoácidos (isoleucina-fenilalanina-metionina, IFM) é importante para a inativação rápida, funcionando como uma tampa, fechando o poro internamente. Os íons sódio não podem mais passar, embora o poro esteja aberto na parte externa (Catterall & Mackie, 2001; Scholz, 2002).

Os resíduos de aminoácidos importantes para a ligação com os AL são encontrados no segmento S6 do domínio IV (Ragsdale et al., 1994).

Os aminoácidos fenilalanina (F) 1764 e tirosina (Y) 1771 são resíduos aromáticos hidrofóbicos separados por duas voltas na mesma face da hélice do segmento S6 formador do poro, onde funcionam como sítio receptor dos AL. O terceiro resíduo é a isoleucina (I) 1760. A substituição deste resíduo (I) em resíduo menor, alanina, próximo à terminação extracelular deste segmento, cria uma via de acesso para os agentes AL carregados eletricamente, provenientes da solução extracelular para o receptor. Esses achados colocam o receptor do anestésico local na metade intracelular do poro transmembrana do canal de sódio, no segmento S6 da região IV (Catterall & Mackie, 2001, Sholz, 2002).

### **1.1.7 – FARMACOCINÉTICA**

Os AL são administrados por injeção na área das fibras nervosas a serem bloqueadas. Portanto, para atingirem seu órgão-alvo, não precisam ser transportadas para circulação sistêmica. Fenômenos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção não estão no início do efeito; contudo, estão na determinação da taxa de término da anestesia e da toxicidade cardíaca e do

sistema nervoso central. Exclui-se a aplicação tópica, onde a difusão é importante para o início da ação (Pereira, 1996; Miller & Katzung, 2003).

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).

A absorção sistêmica dos AL é determinada por alguns fatores: sítio de injeção, dose e volume, adição de vasoconstritores e perfil farmacológico da droga (Berde & Strichartz, 2000).

Quantidade relativa de gordura e vascularização em torno do sítio de injeção dos AL interagirão com as propriedades fisicoquímicas dos fármacos, afetando a taxa de absorção sistêmica. Áreas com maior vascularização terão captação mais rápida e completa comparadas com áreas gordurosas. As taxas de absorção diminuem na seguinte ordem de administração: venosa> traqueal> intercostal> caudal> peridural> plexo braquial> ciático/femoral (Liu & Hodgson, 2001; Vale & Simonetti, 2001).

A maior dose total de anestésico local injetado, maior absorção sistêmica e maiores os níveis sanguíneos. Para a maioria das drogas, há uma relação linear entre a quantidade da droga administrada e os níveis sanguíneos anestésicos resultantes. A relação não é relativamente afetada pela concentração do fármaco e a velocidade de injeção (Kohane et al., 2000; Liu & Hodgson, 2001).

A adição de epinefrina e, menos comumente fenilefrina, causa vasoconstrição no local de administração, com aumento do efeito anestésico e diminuição do efeito tóxico sistêmico (Vale & Simonetti, 2001). A epinefrina contrabalança as características vasodilatadoras da maioria dos AL, excetuando-se ropivacaína e levobupivacaína. A redução da absorção com epinefrina é mais efetiva em anestésicos menos lipossolúveis, menos potentes e de meia-vida curta; assim como a ligação tecidual aumentada, melhor do que o fluxo sanguíneo local, pode ser maior determinante de absorção para agentes de longa duração (Liu & Hodgson, 2001).

A distribuição sistêmica dos AL pode ser descrita por um modelo bicompartimental. A fase rápida de distribuição inicial se deve a captação da droga por órgãos ricamente perfundidos (cérebro, coração, fígado e rins). A fase lenta de distribuição ocorre pela captação por tecidos moderadamente perfundidos (músculos e intestinos) (Miller & Katzung, 2003).

A farmacocinética regional dos AL no cérebro e coração não tem sido completamente delineada; de tal forma que o volume de distribuição no equilíbrio (VDss) é freqüentemente usado para descrever a distribuição dos AL. Contudo, o VDss descreve a extensão da distribuição total no corpo e pode ser impreciso para sistemas com órgãos específicos (Liu & Hodgson, 2001).

A maior ligação à alfa<sub>1</sub>-glicoproteína ácida, e em menor extensão à albumina, mantém o anestésico local no sangue. A pequena fração livre é facilmente captada pelo tecido em função de sua lipossolubilidade. A massa

muscular e o tecido gorduroso funcionam como reservatórios (Vale & Simonetti, 2001).

Devido à meia-vida plasmática extremamente curta, os agentes do tipo éster não possuem estudos no que tange à sua distribuição nos tecidos (Miller & Katzung, 2003).

O padrão de metabolismo de agentes AL varia de acordo com a classificação química. Os agentes do tipo éster sofrem hidrólise no plasma pela enzima pseudocolinesterase. Por conseguinte, possuem tipicamente meias-vidas plasmáticas curtas, menos de 1 minuto para a procaína e a cloroprocaína (Miller & Katzung, 2003).

Os agentes do tipo amida sofrem degradação enzimática primariamente no fígado. Há três mecanismos envolvidos: hidroxilação aromática, n-desalquilação e hidrólise de amida (Pereira, 1996). A ligação amida é hidrolisada pelo citocromo P450 microsomal hepático. A ordem de metabolização é a seguinte: prilocaína > etidocaína > lidocaína > mepivacaína > ropivacaína > bupivacaína. Nas hepatopatias, há uma tendência maior para ocorrer toxicidade (Liu & Hodgson, 2001; Miller & Katzung, 2003).

A excreção dos metabólitos dos AL tipo amida ocorre via rins. Menos de 5 % de droga inalterada é excretada pelos rins na urina (Berde & Strichartz, 2000).

### **1.1.8 - TOXICIDADE**

Se administrados em doses apropriadas e em correta localização anatômica, as drogas AL são relativamente livres de efeitos colaterais (Kohane et al., 2000). Reações tóxicas localizadas ou sistêmicas podem ocorrer, decorrentes de injeção intravascular acidental ou intratecal ou de dose excessiva (Cox et al., 2003). Reações adversas podem advir com certas drogas, tais como reações alérgicas dos AL do tipo éster e metemoglobinemia, seguindo o uso da prilocaína (Berde & Strichartz, 2000).

As reações sistêmicas dos AL envolvem principalmente o sistema nervoso central (SNC) e o sistema cardiovascular (SCV) (Meunier et al., 2001; Srinivasa et al., 2003; Stewart et al., 2003). O SNC é mais susceptível do que o sistema cardiovascular, de modo que a dose e o nível sanguíneo são usualmente menores para toxicidade no SNC do que no colapso cardiovascular (Liu & Hodgson, 2001).

Os efeitos sobre o SNC em baixas doses incluem uma dormência perioral e na língua, que podem ser acompanhados por sonolência, distúrbios visuais e auditivos, e inquietação. Em doses mais altas, podem ocorrer nistagmo e contrações musculares. Finalmente, podem ocorrer convulsões tônico-clônicas, depressão do SNC e morte. A reação dicotômica aos AL pode ocorrer devido a maior sensibilidade dos neurônios corticais inibitórios, permitindo assim a atividade dos componentes excitatórios (Achar & Kundu, 2002; Miller & Katzung, 2003).

A potência da toxicidade no SNC correlaciona-se com a potência dos AL. De modo geral, as diminuições na ligação protéica e na depuração aumentam o risco de toxicidade. A acidose e a PaCO<sub>2</sub> aumentada

potencializam a toxicidade no SNC, talvez por perfusão cerebral aumentada ou ligação protéica diminuída. As convulsões e a depressão no SNC produzem hipoventilação e acidose respiratória, exacerbando a toxicidade. A administração de oxigênio e a hiperventilação são mandatórias durante as convulsões. O limiar para as convulsões é aumentado pela administração de barbitúricos e benzodiazepínicos (Liu & Hodson, 2001).

Em geral, doses maiores de AL são necessárias para produzir toxicidade no sistema cardiovascular do que no SNC. Igualmente, a potência tóxica no sistema cardiovascular reflete a potência do anestésico. Os agentes mais lipossolúveis produzem um curso diferente na toxicidade. Aumentando as doses de lidocaína, agente pouco lipossolúvel usado na clínica, leva a hipotensão, bradicardia e hipóxia; enquanto a bupivacaína, agente bem lipossolúvel, produz súbito colapso cardiovascular, decorrente de fibrilação ventricular resistente à ressuscitação (Liu & Hodson, 2001).

A administração de largas doses de prilocaína gera um quadro de metemoglobinemia. O metabolismo hepático da prilocaína resulta em formação de *o*-toluidina, que é responsável pela oxidação da hemoglobina em metemoglobina. O azul de metileno administrado endovenosamente reverte o quadro (Liu & Hodgson, 2001).

As reações alérgicas são raras. As drogas do tipo éster podem produzir reações, pois são derivadas do ácido *p*-aminobenzóico, que é conhecido ser alergênico. As reações com as drogas do tipo amida são extremamente raras. A adição de conservantes tais como metilparaben e metabissulfito pode também provocar resposta alérgica. Os teste de pele com injeções

intradérmicas podem determinar tolerância, devendo estes testes ser realizados com cuidado, pois reações severas e fatais podem ocorrer em pacientes verdadeiramente alérgicos (Carpenter & Mackey, 1996).

As drogas AL usadas na clínica raramente produzem danos aos nervos, exceto quando são utilizadas em concentrações excessivamente elevadas. Não se sabe o mecanismo envolvido, porém foi constatado que não resulta do bloqueio excessivo dos canais de sódio (Sakura, 1995; Miller & Katzung, 2003).

## 1.2 – ANFÍBIOS

### 1.2.1 - EVOLUÇÃO

Na era paleozóica, há 300-350 milhões de anos, surgiram os anfíbios dos mares Devonianos, conquistando o ambiente terrestre após profundas mudanças evolutivas (Lazarus & Atila, 1993). Foram os primeiros cordados a viver fora da água, evoluindo a partir de peixes sarcopterígeos pertencentes ao grupo crossopterígeos. Alguns caracteres novos os adaptaram para vida terrestre (Storer et al., 1985).

Incluso no Reino *Animalia*, Filo *Chordata*, Subfilo *Vertebrata*, a Classe *Amphibia* e subclasse *Lissamphibia* agrupam espécies de formas e utilidades diversas. Os anfíbios são agrupados em três Ordens: Urodela ou *Caudata* (salamandras e tritões), Ápode ou *Gymnophiona* (cobras-cegas ou cecílias) e Anura ou *Salientia* (sapos, rãs e pererecas) (Storer et al., 1985; Pough et al., 1993).

*Amphibios* (gr. *Amphi*, dual e *bios*, vida) é uma palavra derivada do grego, que dá nome a classe *Amphibia*. Significa vivendo uma vida dupla, definindo um animal que vive tanto na água como na terra (Duellman, 1992).

Os anfíbios vivem espalhados por todo o mundo, exceto Groenlândia e Antártida. Não possuem estruturas que lhe permitem total adaptação aos ambientes terrestres, vivendo principalmente na água ou em lugares úmidos, nunca no mar. Podem ser encontrados na Serra da Nevada, nos Andes ou desertos da América do Norte e da Austrália (Storer et al., 1985).

Desde que surgiram na face da terra, os anfíbios são predadores de insetos, minhocas e outros invertebrados, excetuando-se o sapo-de-chifre (*Ceratophrys*) que se alimenta de filhotes de pássaros e camundongos. Não são predadores ágeis. Possuem glândulas de veneno na pele, que liberam o veneno quando os anfíbios são comprimidos, o que ocorre quando são presas de um predador. O sabor desagradável e o efeito tóxico fazem com que os predadores evitem os anfíbios (Lopes, 1999).

### **1.2.2 – MORFOLOGIA DOS ANFÍBIOS**

Os anfíbios são divididos em ápodes, urodelos e anuros. Os ápodes são animais de corpo alongado, vermiforme, sem apêndices locomotores. São chamados de cobras-cegas ou cecílias por terem olhos vestigiais, às vezes recobertos por uma membrana. Os urodelos têm corpo alongado com dois pares de apêndices locomotores e cauda. As salamandras e tritões são exemplos desse grupo. Os anuros são assim denominados por terem a cauda

atrofiada. Não têm pescoço, os membros anteriores são curtos e fortes, adaptados para absorver o impacto do animal sobre o solo; e os posteriores mais longos, empregados para impulsionar o animal. O sapo, a rã e a perereca são anuros (Marcondes & Lammoglia, 1991; Pough et al., 1993).

A morfologia externa dos anfíbios é descrita a partir do sapo, animal que origina a substância de estudo. O corpo do sapo divide-se em cabeça, tronco e membros, não havendo pescoço e cauda (**Figura 3**). A cabeça é diferenciada e de forma triangular. A boca, presente na cabeça, é 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. Os sapos possuem pequenos dentes nas mandíbulas, mas só os usam para se defender e segurar suas vítimas, não cortam nem mastigam (Marcondes & Lammoglia, 1991; Lopes, 1999).

Há dois olhos lateral e superiormente a cabeça, 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).

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,

denominadas parotóides que produzem secreção venenosa (Storer et al., 1985).

O tronco é globoso e levemente afilado junto à parte posterior. A coluna vertebral é curta e rígida; as vértebras estão ligadas de modo a restringir movimentos laterais; a região pélvica é reforçada e firmemente ligada à coluna vertebral. 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; Lopes, 1999).



**Figura 3.** *Bufo paracnemis*

### 1.2.3 - A PELE DOS ANFÍBIOS: FUNÇÕES

A pele dos anfíbios é um órgão complexo morfológica, bioquímica e fisiologicamente, com um arsenal de funções para a preservação da espécie. Suas funções estão relacionadas com a respiração, regulação de água, mecanismo de defesa contra predadores, microorganismos e fungos, excreção, controle da temperatura, reprodução, camuflagem e outras (Pough et al., 1993; Clarke, 1997).

A pele constitui-se como extremamente importante na sobrevivência. É através da pele que alterações ambientais são percebidas e monitoradas; é o sítio responsável para produção de respostas apropriadas para medir tais alterações. Quando a superfície da pele é alterada, eles podem sucumbir a infecções por microorganismos e fungos. A eficiência normal é alterada na hibernação, onde as funções de defesa operam em um nível mínimo (Clarke, 1997).

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 granuladas (Neuwirth et al., 1979; Toledo, 1986; Flucher, 1986).

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 natureza viscosa dificulta a apreensão dos anfíbios por eventuais predadores (Toledo & Jared, 1989). Esse muco controla o pH e o grau de umidade da pele, propiciando condições adequadas para a respiração cutânea (Toledo, 1986).

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).

A secreção mucosa exerce um papel defensivo, contudo a secreção granulosa é 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 estar dispersas ou concentradas em uma determinada região da pele do animal (Whitear, 1977; Toledo & Villa, 1987; Reilly et al., 1994).

As glândulas granulosas, cuja secreção é freqüentemente 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 morfologicamente 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 granulosas (Toledo & Jared, 1989).

As glândulas granulosas são as de maior interesse, sendo o sítio de síntese de um grande número de compostos químicos, que provêm proteção contra infecções por bactérias e fungos, bem como contra ação de predadores (Preusser, 1975; Cevikbas, 1978).

O número e a diversidade de compostos produzidos por anfíbios nas glândulas granulosas são surpreendentemente altos. As principais categorias de secreções incluem amins biogênicas, alcalóides, peptídeos, proteínas e substâncias proteináceas e esteróides (bufogeninas e bufotoxinas) (Erspamer, 1984; Roseghini, 1986; Daly et al, 1987; Lazarus & Attila, 1993; Carvalho, 1995).

As amins biogênicas incluem derivados de catecolaminas e indolalquilaminas. Erspamer (1971) dividiu as amins aromáticas encontradas na pele dos anfíbios em três grupos: as indolalquilaminas que incluem 5-hidroxitriptamina e derivados N-metilados, tais como bufotenina e bufotenidina (alucinógenos, vasoconstritores e convulsivantes); as imidazolalquilaminas e histaminas relacionadas e as hidroxifenilaminas, que incluem leptodactilina, epinefrina, norepinefrina, dopamina e epinina (Lazarus et al., 1994; Clarke, 1997).

Os alcalóides têm sido definidos como compostos contendo nitrogênio cíclico, com uma distribuição limitada na natureza. Entre os anfíbios, os alcalóides são encontrados principalmente no veneno das rãs de família *Dendrobatidae* e *Phyllobates*, mas também têm sido encontrados em salamandras, tritões, sapos e outras espécies de rãs. Os alcalóides mais comuns são batracotoxinas, histrionicotoxinas, indolizidinas, pumiliotoxinas-A, decahidroquinolonas, piridil-piperidinas, indoalcalóides, alcalóides amidínicos, morfina, epibatidina, tetrodotoxina e um grupo de alcalóides miscelâneos. Recentes trabalhos indicam que muitos alcalóides são derivados de insetos e milípedes, que formam uma parte principal da dieta de rãs (Daly et al., 1987; Lazarus & Attila, 1994; Daly, 1995; Daly, 1995; Caldwell, 1996).

Há uma grande variedade de peptídeos na secreção cutânea dos anfíbios, a maioria exibe uma potente atividade biológica em mamíferos. Os peptídeos mais comuns são taquicininas, bradicininas, ceruleínas, bombesinas, opióides (dermorfinas e deltorfinas), xenopsinas, hormônio liberador de tireotropina, angiotensina; um grupo apresenta atividade antimicrobiana, tais como as magaininas, fragmentos precursores de xenopsina (XPF), fragmentos precursores de ceruleínas (CPF), e outros (Giovanni et al., 1987; Zasloff, 1987, Carvalho et al., 1992). As magaininas foram uma descoberta importante na pesquisa dos peptídeos, pois exibem atividade antimicrobiana de amplo espectro. Em contraste com os alcalóides, as aminas biogênicas e os peptídeos da pele dos anfíbios não são oriundos da dieta ou de bactérias (Clarke, 1997).

As proteínas e substâncias proteináceas secretadas da pele de anfíbios incluem diversas proteínas isoladas e clonadas (Berger & Kreil, 1989; Gmachl

et al., 1990) e uma mucina, lectina ligada a  $\beta$ -galactosídeo (Marshall et al., 1992). Há enzimas envolvidas na biossíntese, nas modificações pós-translacionais (amidação, sulfatação, isomerização, etc.) e inativação de substâncias (Carvalho, 1995). As enzimas identificadas em anfíbios são as convertases, amidases (peptidil-glicina- $\alpha$ -hidroxi-peptidase e peptidil-hidroxi-glicina N-C ligase), exopeptidases (dipeptidil-aminopeptidase e carboxipeptidase), endopeptidases (metaloprotease) e outras (Carvalho et al., 1992; Camarão, 1995).

Quanto aos esteróides, há os cardiotônicos: as bufogeninas, também denominadas bufaginas ou bufadienólídeos 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 uma família de substâncias heterocíclicas que inibem a bomba de  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase e possuem ações cardiotônicas (Lazarus et al., 1994).

### 1.3 – IMPORTÂNCIA DO ESTUDO

Há inúmeras descrições sobre o uso terapêutico das secreções cutâneas do sapo. Nos séculos XVII e XVIII, venenos de sapo foram utilizados como diurético contra edema. Na Ásia, as secreções do sapo ainda são utilizadas com este propósito. O veneno foi também 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).

A diversidade de compostos produzidos por anfíbios nas glândulas granulosas é surpreendentemente alta. Essa diversidade abre perspectivas nos mais diversos campos da ciência, na busca por estruturas moleculares novas com funções potencialmente úteis na clínica, tornando os anfíbios um grupo alvo de estudo.

Os bufadienolídeos têm sido fonte de estudo atualmente na regulação da pressão sanguínea e na gênese da hipertensão (Oberfrank et al., 1991); no plasma de mamíferos, há um material imunorreativo semelhante ao marinobufagin, tipo digital (Dmitrieva & Doris, 2002); inibição da bomba  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ , atividade vasoconstritora, inibição da diferenciação celular, apoptose, angiogênese, indução de citocinas inflamatórias, ação na pré-eclâmpsia, efeito na redução do reforço do etilismo, marcador de insuficiência cardíaca severa e outros (Numazawa et al., 1994; Bagrov et al., 1995; Kurosawa et al., 2000; Kashkin, 2002).

Em 1976, foi descrito um trabalho, demonstrando atividade anestésica superficial em córnea de coelhos de um bufadienolídeo obtido do *Ch'an Su*, o (a) bufalin (a) (Yoshida, 1976).

A história dos AL inicia-se com um princípio ativo obtido das folhas da coca. Sua evolução a partir dos tipo éster, com propriedades alergênicas, para os do tipo amida foi um avanço da química farmacêutica industrial. No entanto, até agora não há nenhuma estrutura oriunda de animais que tenha suscitado ações anestésicas locais na prática clínica. O telocinobufagin não foi descrito em nenhum trabalho na literatura sobre um potencial efeito anestésico local, embora alguns dados preliminares tenham sido descritos: bloqueio do reflexo córneo-palpebral em coelhos; bloqueio concentração-dependente na preparação frênico-diafragma de ratos; inibição da contração evocada eletricamente no músculo longitudinal do canal deferente de camundongos; e diminuição na primeira fase, e abolição na segunda fase, do tempo de lambida da pata no teste da formalina em camundongos (Patrocínio, 1997). Portanto, o telocinobufagin foi selecionado para a realização de estudos farmacológicos em comparação com a bupivacaína, um anestésico local clássico bastante utilizado na prática clínica.

## 2 – OBJETIVOS

- √ Purificar o telocinobufagin, um bufodienolídeo das glândulas parotóides do *Bufo paracnemis*, em cromatografia líquida de alta eficiência.
  
- √ Realizar estudo farmacológico *in vitro*, comparativamente com a bupivacaína, do telocinobufagin em um modelo experimental que envolva a participação neuronal, como a resposta contrátil de íleo isolado de cobaio pelo estímulo de campo elétrico.
  
- √ Realizar estudo farmacológico *in vitro*, comparativamente com a bupivacaína, do telocinobufagin em um modelo experimental de condução de um impulso nervoso, como na condução do potencial de ação composto em nervo ciático isolado de rato.
  
- √ Realizar estudo farmacológico *in vitro*, comparativamente com a bupivacaína, do telocinobufagin em um modelo experimental para avaliação da atividade cardiotóxica, como a avaliação da atividade inotrópica e cronotrópica de átrio isolado de rato.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 – ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO**

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) e cobaios albinos (*Cavia porcellus*), adultos-jovens, 2 - 4 meses, machos, com peso variando entre 200 - 250 g e 400 - 450 g, respectivamente. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará e mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina. Os animais foram mantidos em gaiolas com no máximo cinco animais, em condições ambientais semelhantes, com ciclos de alternância claro / escuro de 12 horas, recebendo ração e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados de acordo com o Guia de Cuidados e Usos de Animais de Laboratório (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, publicado pelo *US National Institute of Health* - NIH Publicação 85 - 23, revisado em 1996, Estados Unidos da América (EUA)).

Cobaios albinos foram utilizados nos experimentos com segmentos isolados de íleo e ratos, nos experimentos para avaliação das alterações do cronotropismo e inotropismo cardíacos, bem como para os estudos do potencial de ação composto.

#### **3.2- SOLUÇÕES FISIOLÓGICAS**

Solução fisiológica de Tyrode normal modificada (TN) foi utilizada como meio de superperfusão para a preparação de íleo isolado de cobaio. O TN foi preparado com água destilada, apresentando a seguinte composição em mM: NaCl 136; KCl 5; MgCl<sub>2</sub> 0,98; CaCl<sub>2</sub> 2,0; NaHCO<sub>3</sub> 11,9 e glicose 5,5.

A solução fisiológica de Krebs-Henseleit (KH), utilizada nos experimentos conduzidos no átrio e ventrículo para estudar cronotropismo e inotropismo, respectivamente, teve a seguinte composição em mM: glicose 11; NaCl 118; NaHCO<sub>3</sub> 25; KCl 4,7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; CaCl<sub>2</sub> 1,2 e MgSO<sub>4</sub> 1,2.

Para os experimentos com nervo ciático isolado de rato, foi utilizada como solução nutritora a solução de Locke modificada com a seguinte composição em mM: NaCl- 140; KCl-5,6; MgCl<sub>2</sub>- 1,2; CaCl<sub>2</sub>- 2,2; Tris (trihidroximetil-aminometano) 10,0; Glicose- 10,0.

Todos os sais utilizados no preparo das soluções foram de grau de pureza analítica obtidos das companhias Sigma (St. Louis, MO, USA), Merck (Darmstadt, Germany) ou Reagen (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

### **3.3 – TELOCINOBUFAGIN**

#### **3.3.1 – EXTRAÇÃO**

A fonte de obtenção do material utilizado foi o sapo, *Bufo paracnemis*. Vários sapos foram coletados em diferentes épocas do ano. O

veneno foi extraído por compressão das glândulas parotóides dos sapos, e colocado em placas de Petri. O veneno foi dissolvido em etanol (1:5; p:v) e mantido a 4 °C durante 24 horas. A mistura foi centrifugada a 5000 g por 30 minutos e o material precipitado foi descartado.

### **3.3.2 – 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 5 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. 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) para uma concentração final de 0,5 mg/ml.

### **3.3.3 – DETERMINAÇÃO DO GRAU DE PUREZA**

Antes de se realizarem os estudos farmacológicos, 20 µl de solução a 0,5 mg/ml com etanol e água bidestilada (1:1; v:v) do pico 2 (telocinobufagin) foram injetados no HPLC em uma coluna fina, analítica específica, eluída em um fluxo de 1 ml/ml 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- DROGAS**

Foram utilizadas nas preparações de íleo de cobaio, soluções de telocinobufagin, bupivacaína e acetilcolina (ACh). O telocinobufagin, obtido por cromatografia, foi dissolvido em álcool etílico. A bupivacaína foi utilizada na forma líquida de cloridrato de bupivacaína, obtida do laboratório Astra (Brasil). A acetilcolina foi obtida da Sigma (USA). As soluções de telocinobufagin e bupivacaína foram diluídas em Tyrode Normal, a partir da solução inicial.

### **3.5- AVALIAÇÃO EM PREPARAÇÕES**

#### **3.5.1. ÍLEO DE COBAIO**

##### **3.5.1.1 – MEDIDA DE CONTRATILIDADE**

Cobaios foram sacrificados por concussão cerebral. O íleo foi removido e seccionado em pequenos fragmentos. Segmentos de íleo foram montados de acordo com a metodologia de Paton (1957), em câmaras para preparações isoladas de músculo liso, sendo mantidos em solução de Tyrode a 37 °C, pH 7,4 e constantemente aerada. A tensão basal aplicada ao tecido foi 1 g. O registro das contrações foi realizado por intermédio de transdutores de força, acoplados a pré-amplificadores (Dataq, PM-1000, USA) e a um sistema

de aquisição de dados conectado a um computador para armazenamento dos registros experimentais. As preparações foram deixadas em equilíbrio por 60 min. A estimulação por campo elétrico (ECE) foi realizada através de dois eletrodos de prata cloretada, utilizando os seguintes parâmetros: 40 V, 10 Hz e 0,5 ms, durante 10 s. Em um outro protocolo, sem a utilização da ECE, foi utilizada acetilcolina (ACh) na dose de 1 $\mu$ M.

### **3.5.1.2 – PROTOCOLO EXPERIMENTAL**

Os segmentos de íleo de cobaio foram, inicialmente, estabilizados por um período de 1 hora. As primeiras contrações, em média de seis, foram consideradas as basais. Depois, o telocinobufagin foi utilizado nas concentrações de 0,01  $\mu$ M até 1 mM. O ensaio foi iniciado com a concentração de 0,01  $\mu$ M de telocinobufagin, em 5 ml de volume final contendo TN, e deixado em solução por 6 minutos. Em seguida, aplicava-se o ECE e registrava-se a resposta. Posteriormente, esvaziava-se a câmara de superperfusão e era colocada uma concentração dez vezes maior, até se chegar a concentração de 1 mM. O protocolo foi repetido tanto com a bupivacaína, porém com a concentração inicial de 0,1  $\mu$ M até 1 mM, como com o solvente, etanol, nas concentrações de 0,01  $\mu$ M até 1 M.

No outro protocolo experimental, a ACh foi administrada, no lugar da ECE, para determinar a presença ou bloqueio da contração do íleo de cobaio.

A bupivacaína e telocinobufagin foram avaliados no íleo isolado de cobaio de acordo com o protocolo abaixo.

**Quadro 1.** Protocolo do Telocinobufagin em experimentos de contração por estimulação por campo elétrico no íleo isolado de cobaio

| Período de equilíbrio (1h) | Contrações por ECE (intervalo 6 min)<br>↓ | Telocinobufagin (0,01 μM-1 mM)<br>↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ | Recuperação<br>↓ |
|----------------------------|---|---|------------------|
| —                          | • • • • • •                               | • • • • • •                                       | —                |

**Quadro 2.** Protocolo da Bupivacaína em experimentos de contração por estimulação por campo elétrico no íleo isolado de cobaio

| Período de equilíbrio (1h) | Contrações por ECE (intervalo 6 min)<br>↓ | Bupivacaína (0,1 μM -1 mM)<br>↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ | Recuperação<br>↓ |
|----------------------------|---|---|------------------|
| —                          | • • • • • •                               | • • • • • •                                   | —                |

**Quadro 3.** Protocolo do Etanol em experimentos de contração por estimulação por campo elétrico no íleo isolado de cobaio

| Período de equilíbrio (1h) | Contrações por ECE (intervalo 6 min)<br>↓ | Etanol (0,01 μM até 1 M)<br>↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ | Recuperação<br>↓ |
|----------------------------|---|---|------------------|
| —                          | • • • • • •                               | • • • • • •                                     | —                |

**Quadro 4.** Protocolo do Telocinobufagin em experimentos de contração basais por Acetilcolina no íleo isolado de cobaio.

| Período de equilíbrio (1h) | Contrações basais por acetilcolina (ACh)<br>↓ | Telocinobufagin<br>(0,01 μM-1 mM)<br>↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ | Recuperação<br>↓ |
|----------------------------|---|--|------------------|
| —                          | • • • • • •                                   | • • • • • •                                      | —                |

**Quadro 5.** Protocolo do Bupivacaína em experimentos de contração basais por Acetilcolina no íleo isolado de cobaio.

| Período de equilíbrio (1h) | Contrações basais por acetilcolina (ACh)<br>↓ | Bupivacaína<br>(0,1 μM -1 mM)<br>↓ ↓ ↓ ↓ ↓ | Recuperação<br>↓ |
|----------------------------|---|--|------------------|
| —                          | • • • • • •                                   | • • • • •                                  | —                |

**Quadro 6.** Protocolo do Etanol em experimentos de contração basais por Acetilcolina no íleo isolado de cobaio.

| Período de equilíbrio (1h) | Contrações basais por acetilcolina (ACh)<br>↓ | Etanol<br>(0,01 μM até 1 M)<br>↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ | Recuperação<br>↓ |
|----------------------------|---|--|------------------|
| —                          | • • • • • •                                   | • • • • • • • • •                                | —                |

### 3.5.2. DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE AÇÃO COMPOSTO

### **3.5.2.1. REGISTRO EXTRACELULAR**

O registro extracelular, armazenagem e análise dos dados foram realizados de acordo com a técnica descrita por Paterson e Hamilton (1970).

Ratos Wistar foram sacrificados por deslocamento cervical e os nervos ciáticos cuidadosamente dissecados. Removido de sua inserção junto à medula, o nervo ciático foi posto em solução de Locke modificada à temperatura ambiente e com pH ajustado para 7,4. Ulteriormente, foi posicionado transversalmente sobre eletrodos de platina da câmara tipo “Harvard” adaptada. Uma pequena parte do nervo 10 - 20 mm ficou submersa entre dois pares de eletrodos, o de estimulação e o de registro, na solução na qual foram diluídas as substâncias. Após o seu posicionamento na câmara, uma de suas extremidades foi estimulada eletricamente por um estimulador RFM, modelo ESF - 10 (São Paulo, Brasil), utilizando um pulso com amplitude de 10 - 20 V, duração de 0,1 ms e aplicados com frequência de 0,2 Hz. O potencial de ação composto, evocado pela estimulação, foi registrado com eletrodo de platina colocado 4 a 5 cm de distância do eletrodo de estimulação. Saindo do estimulador, o pulso chega à preparação, onde deu origem a um PAC que se propaga ao longo do nervo. Ao passar pela parte submersa do nervo, o PAC foi avaliado com ausência ou presença de alterações, dependendo da substância utilizada e de suas concentrações na solução.

A leitura do PAC foi feita quando este passa pelos eletrodos de registro. O sinal foi incrementado por um amplificador de alta impedância de entrada Dataq, Modelo BMA-931 (USA), que permitiu a transformação, leitura e armazenamento do sinal pelo computador através de um software (Windaq/200, USA). Os dados foram armazenados no disco rígido do próprio computador para posterior análise.

### **3.5.2.2 – PROTOCOLO EXPERIMENTAL**

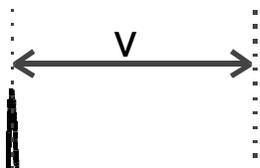
O nervo passou, em cada experimento, por um período de estabilização de uma hora com pulsos de corrente despolarizante cujos parâmetros foram descritos na seção anterior. O registro do PAC foi realizado a cada 15 minutos. O terceiro registro, após o período de estabilização, foi considerado como o tempo 0. Os registros subsequentes foram considerados como os tempos 15, 30, 45, 60, 75, 90 e 105 min. O registro do PAC no tempo 0 foi considerado o controle para cada experimento. Os registros do PAC nos tempos 15 e 30 são correspondentes ao período de exposição ao telocinobufagin (1 mM) ou à bupivacaína (1 mM) dissolvido(a) em solução de Locke modificada. As drogas foram retiradas da preparação por lavagens sucessivas com a solução de Locke modificada, para cada intervalo desde o tempo imediatamente posterior ao registro do PAC no tempo 30 até o tempo 105 min, a fim de se determinar o grau de recuperação da atividade do nervo. Uma vez que o solubilizante utilizado nesses ensaios foi o DMSO (1:6; v/v), foram realizados experimentos apenas com o solubilizante para se determinar o grau de alteração encontrado no PAC promovido pelo DMSO.

### 3.5.2.3. ANÁLISE DE DADOS

O efeito do telocinobufagin sobre a condutibilidade nervosa foi avaliado através das mudanças verificadas na amplitude pico-a-pico e na velocidade de condução do PAC.

Os dados para a verificação das alterações na amplitude e velocidade de condução foram feitos pelo *software* Dataq, Pro+acquisition (USA). A amplitude pico-a-pico foi estabelecida através da soma da maior amplitude positiva com o módulo da maior amplitude negativa atingida pelo PAC (**Figura 4**).

Para o cálculo da velocidade de condução, foi utilizada a proporção entre a distância percorrida pelo PAC, desde o eletrodo de estimulação localizado mais próximo do ponto de imersão do nervo na solução até o eletrodo de registro, e o tempo percorrido no percurso. Utilizou-se para a definição de tempo o intervalo entre o ponto final do artefato de estímulo visto no gráfico de registro e o ponto onde a inflexão ascendente do gráfico de PAC atinge 50 % de sua amplitude máxima positiva.





### **3.5.3 - EXPERIMENTOS PARA AVALIAÇÃO DA CARDIOTOXICIDADE**

#### **3.5.3.1 - DESCRIÇÃO DA TÉCNICA**

O método foi utilizado para localizar o sítio maior de atividade das drogas que apresentem atividade cardíaca direta, de acordo com a metodologia de Vaughan-Williams (1970). Este objetivo foi alcançado isolando o marca-passo fisiológico, átrio direito de ratos com atividades elétrica e mecânica espontâneas. Os ratos Wistar foram sacrificados por deslocamento cervical, seguido de exsanguinamento. O átrio direito foi excisado, fixado por um gancho de aço inoxidável e imerso em uma câmara de superperfusão (5 ml) para musculatura lisa, contendo solução de Krebs–Henseleit (KH) aerada com 5% CO<sub>2</sub> em oxigênio, com pH ajustado para 7,4 e mantido a 37 °C. Uma tensão inicial de 1 g foi aplicada ao átrio direito. Tiras longitudinais de átrio esquerdo foram excisadas e montadas de maneira semelhante. Valores iniciais de frequência (átrio direito) e força (átrio esquerdo) foram registrados através de um transdutor de força (F-60, Narco Biosystems, Houston, TX, USA) acoplado a um fisiógrafo (Narco Biosystems, USA) e considerados como referência controle (100 %). As tiras de átrio esquerdo foram estimuladas eletricamente com um eletrodo bipolar acoplado a um estimulado S6 Grass (Grass, Quincy, MA, USA). O estímulo no átrio esquerdo foi dado eletricamente, utilizando um pulso com amplitude de 5 V, duração de 5 ms e aplicados com frequência de 2 Hz. Os efeitos inotrópicos foram avaliados pelo registro da máxima taxa de desenvolvimento de força durante estimulação elétrica a uma frequência fixa de 120 batidas / min.

### **3.5.3.2 – PROTOCOLO EXPERIMENTAL**

O átrio, para estudo do cronotropismo, foi mantido em repouso por 1 h, com lavagens sucessivas de 15 em 15 min. Três medidas basais foram registradas antes da administração das drogas, com intervalos de 5 minutos. A partir do terceiro minuto, de cada medida, foi aferida a frequência durante 60s. O telocinobufagin foi utilizado nas concentrações de 0,1  $\mu$ M até 1 mM. O estudo foi iniciado com 0,1  $\mu$ M do telocinobufagin (volume de 5  $\mu$ l) adicionado à câmara de superperfusão (5 ml), obedecendo ao protocolo de efetuar medidas durante o terceiro minuto. As concentrações ulteriores foram administradas a cada 5 minutos. Este ensaio foi executado de maneira cumulativa, sem efetuar troca da solução KH na câmara. Os grupos da bupivacaína (0,1  $\mu$ M até 1 mM) e do etanol (de 0,1  $\mu$ M até 1 M) foram realizados de modo semelhante. O isoproterenol, na concentração de 1  $\mu$ g/ml, foi utilizado como controle positivo, verificando reversão ou não no grupo do etanol.

### **3.6 - ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados obtidos experimentalmente foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). Comparações de apenas dois grupos foram realizadas utilizando teste t de Student. As múltiplas comparações foram feitas com o teste ANOVA. Para a técnica de contraste, foi utilizado o teste de Dunnett. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que

5 % ( $p < 0,05$ ). Os valores de  $CI_{50}$  (concentração que produz 50 % do efeito inibitório máximo) foram calculados por interpolação semi-logarítmica e foram expressos como a média geométrica e o intervalo de confiança 95 %.

## 4- RESULTADOS

### 4.1 - RESULTADOS DA PURIFICAÇÃO

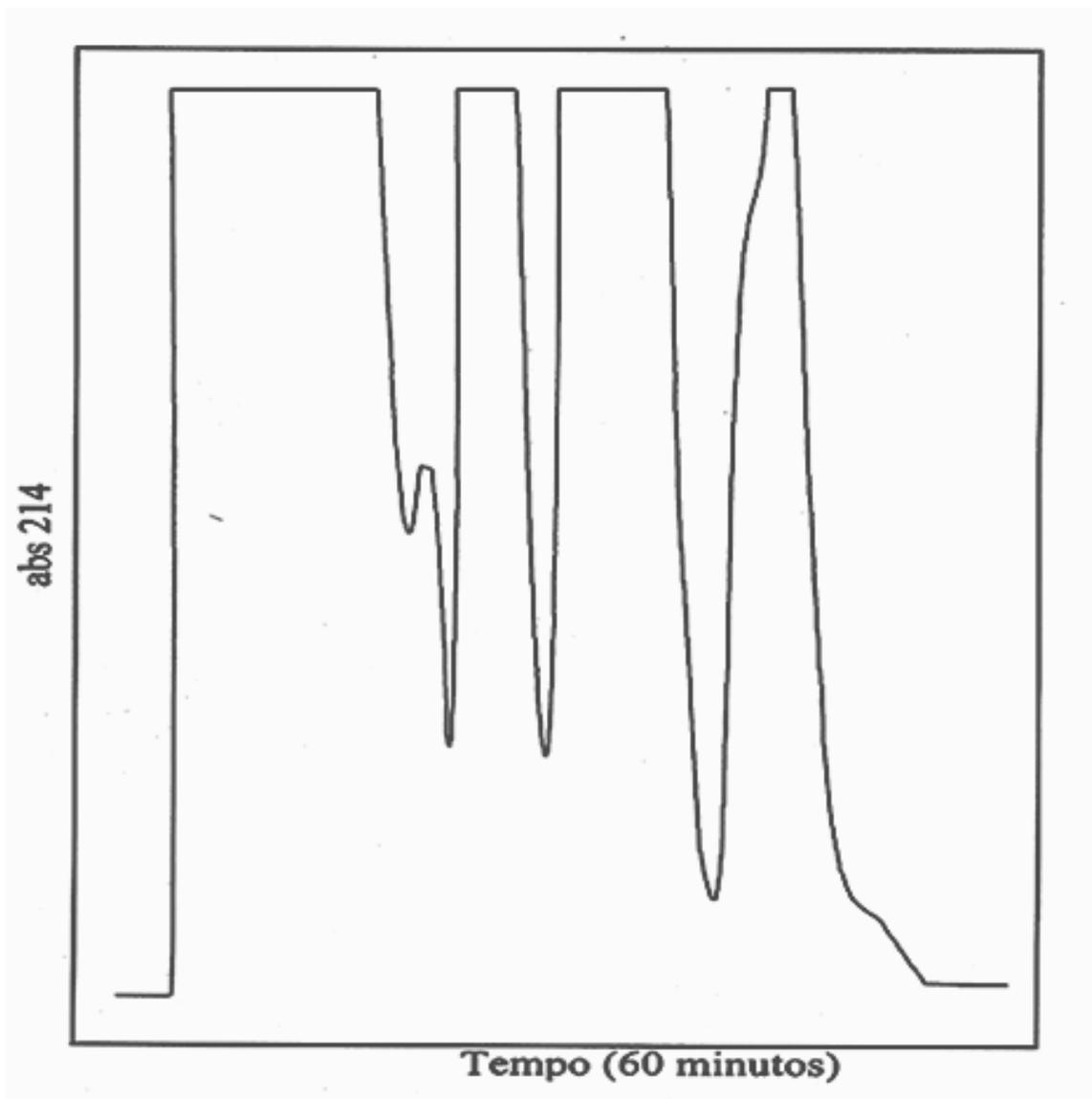
#### 4.1.1 - PURIFICAÇÃO EM COLUNA PREPARATIVA

Após obtenção por compressão das glândulas parotóides do sapo, *Bufo paracnemis*, o veneno foi injetado no HPLC com coluna preparativa. O material foi coletado em cinco picos, correspondentes às frações (**Figura 5**).

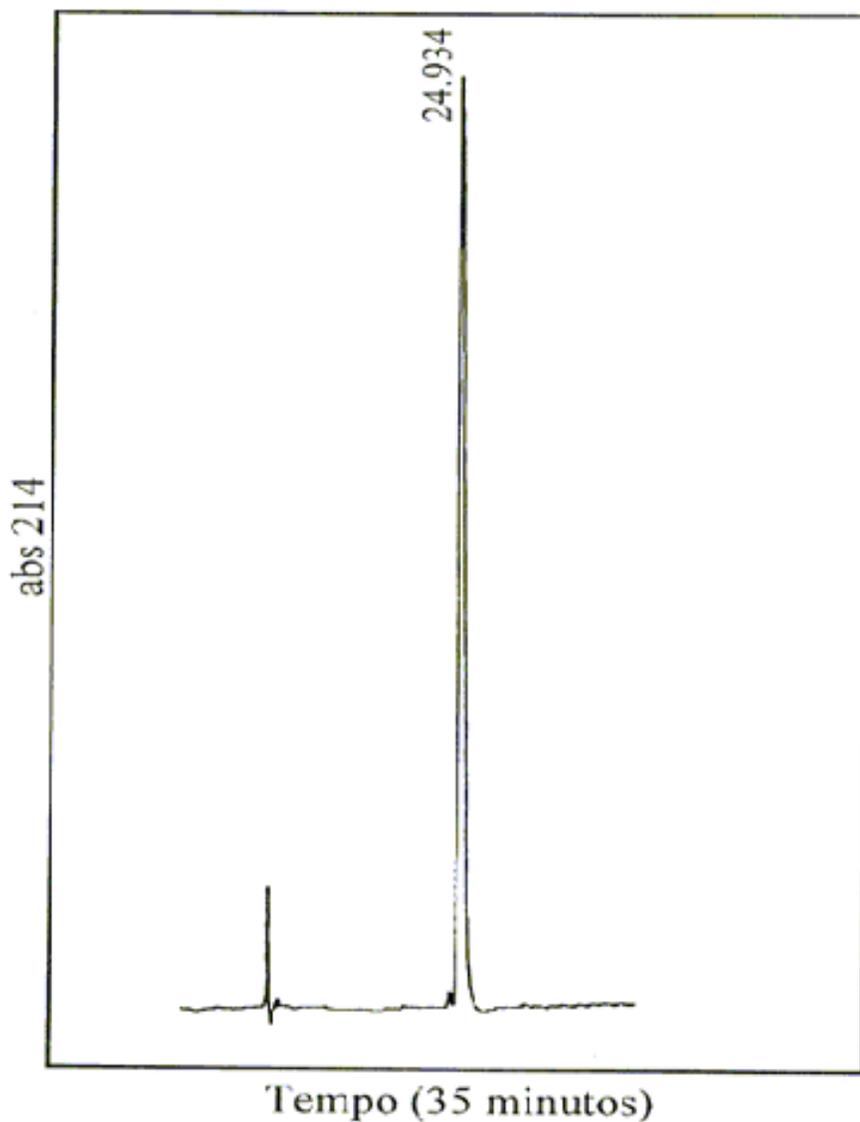
#### 4.1.2 – DETERMINAÇÃO DO GRAU DE PUREZA EM HPLC

As frações, picos coletados, foram liofilizadas e o material foi obtido em pó seco. Posteriormente, foram ressuspendidas em etanol e água bidestilada 1:1 (v:v). O pico 2 foi injetado em HPLC com coluna analítica. Evidenciou-se a inexistência de outros picos ou contaminantes, demonstrando o grau de purificação do material, mais de 97 % (**Figura 6**).

A determinação estrutural foi realizada com espectroscopia no infravermelho e de massas com ponto de fusão 229,8° – 234° C, peso molecular de 402 Da e proposição estrutural a um bufadienolídeo, o telocinobufagin.



**Figura 5- Perfil de eluição do veneno das glândulas paratóides 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 trifluoroacético em 60 minutos com fluxo de 7 ml/min, monitorizada a 214 nm.



**Figura 6. 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, 145 X 4,5 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.

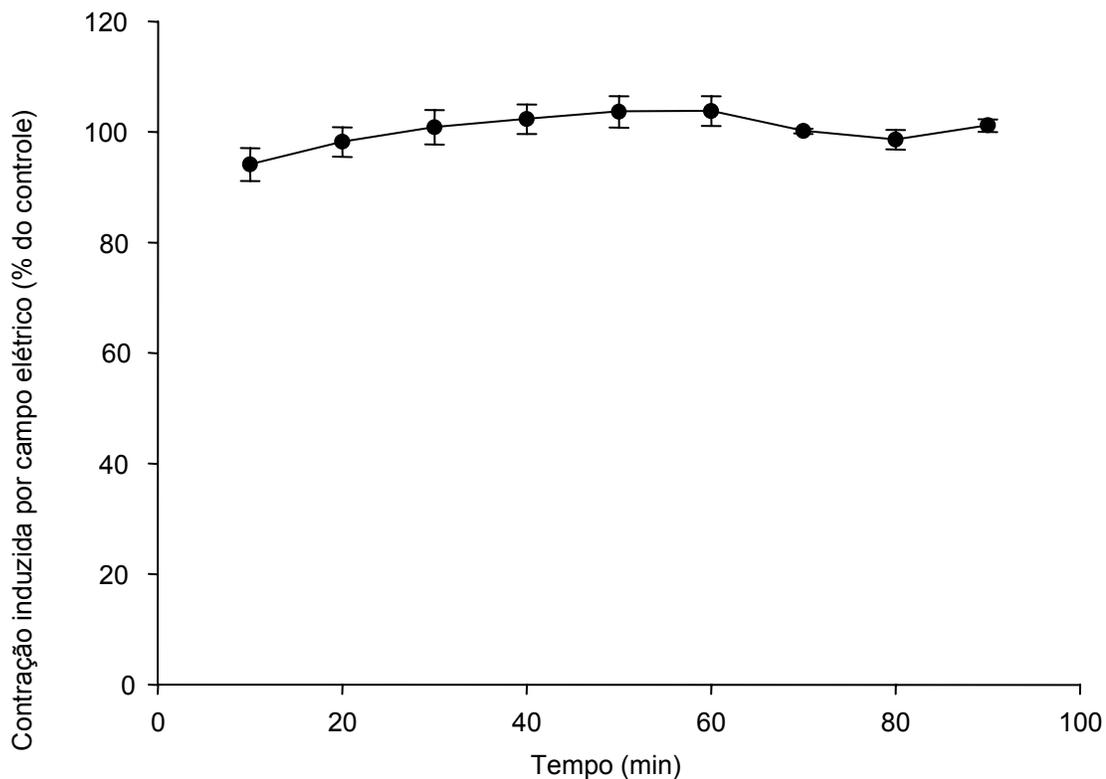
## 4.2 - EFEITOS DO TELOCINOBUFAGIN SOBRE AS CONTRAÇÕES INDUZIDAS PELA ESTIMULAÇÃO POR CAMPO ELÉTRICO EM ÍLEO DE COBAIO

A aplicação de pulsos elétricos despolarizantes através dos eletrodos, mergulhados na solução fisiológica (40 V, 0,5 ms, 10 Hz, 10 s), produziu respostas contráteis, cuja amplitude se manteve inalterada durante repetições subseqüentes dos estímulos como demonstrado na **Figura 7**. A adição prévia de atropina (1  $\mu$ M) na solução superperfusora, em alguns experimentos, bloqueou as contrações induzidas pelo campo elétrico (dados não mostrados).

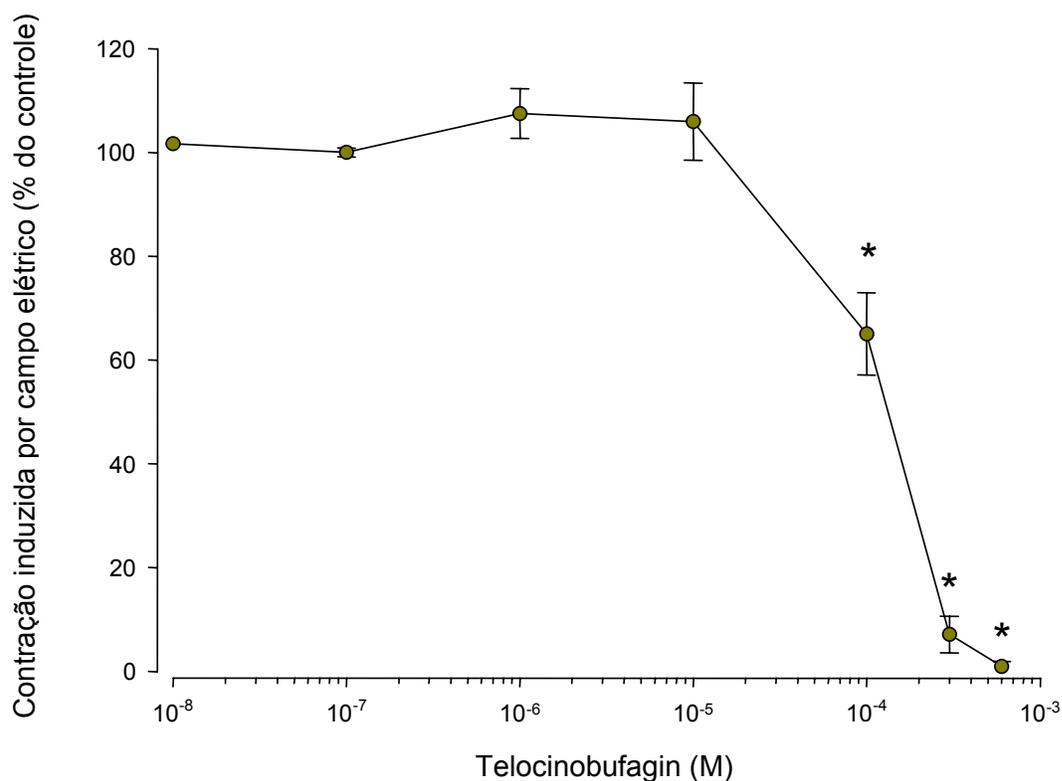
O telocinobufagin ( $10^{-8}$  -  $6 \times 10^{-4}$  M) produziu, de maneira dependente de concentração ( $p < 0,01$ , ANOVA), um efeito inibitório sobre as contrações de segmentos isolados de íleo de cobaio, induzidas pela estimulação por campo elétrico (**Figura 8**). O efeito foi significativo a partir da concentração de  $10^{-4}$  M e apresentou valor para a  $CI_{50}$  correspondente a 125,0 [85,3 – 125,3]  $\mu$ M ( $n = 5$ ). Na concentração de  $6 \times 10^{-4}$  M, o bloqueio foi praticamente total com a resposta sendo reduzida para  $0,9 \pm 0,9$  % da resposta obtida pela estimulação elétrica na ausência do telocinobufagin. Lavagens sucessivas da preparação com solução de Locke não foram suficientes para recuperar a resposta contrátil bloqueada pelo telocinobufagin, mesmo após um período de 510 min da retirada do bufadienolídeo (**Figura 9**).

A concentração de etanol, utilizado como solubilizante para os experimentos com segmentos isolados de íleo de cobaio, variou de acordo com a concentração do telocinobufagin, embora não tenha sido superior a uma

concentração de 0,01 M. Uma curva concentração-efeito para o etanol foi construída para verificar uma possível interferência do solubilizante no efeito inibitório do telocinobufagin (**Figura 10**). O etanol não alterou significativamente a resposta contrátil induzida pela estimulação elétrica na faixa de concentração de  $10^{-4}$  a  $6 \times 10^{-2}$  M. Na concentração de  $10^{-1}$  M, a resposta foi significativamente diminuída para  $69,4 \pm 9,7$  % ( $n = 5$ ) da contração no período controle e foi abolida com 1 M de etanol ( $p < 0,05$ , teste de Dunnett). A retirada do etanol produziu rapidamente a recuperação quase total da resposta. Após 6 min, a resposta contrátil correspondeu a  $65,9 \pm 4,8$  %, enquanto que após 20 minutos da retirada do solubilizante a contração atingiu  $79,9 \pm 10,1$  % daquela obtida no controle.

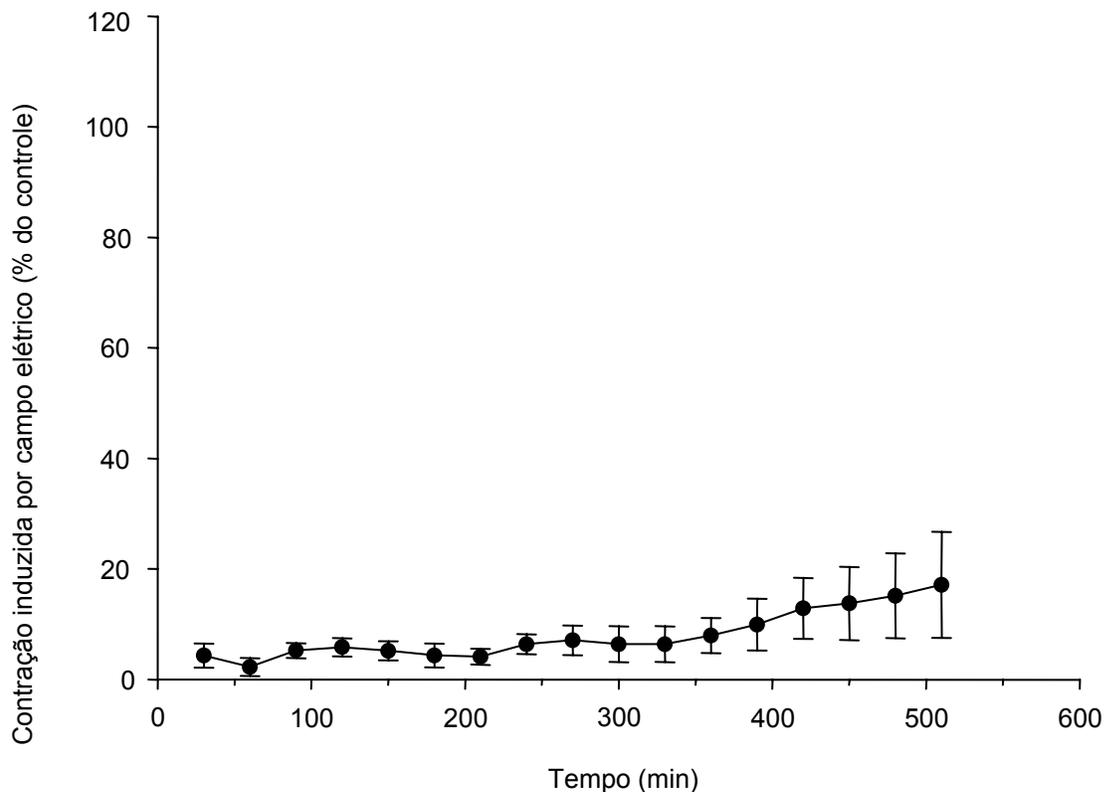


**Figura 7. Resposta contrátil induzida pela estimulação por campo elétrico de segmentos isolados de íleo de cobaio.** Amplitude das contrações induzidas pelo campo elétrico durante um período de 90 minutos. Os segmentos de íleo foram mantidos apenas com solução fisiológica de Tyrode para avaliação de possíveis alterações das respostas contráteis em função do tempo de estimulação. Os pontos no gráfico representam a média expressa em valores % da primeira resposta contrátil obtida após o período de equilíbrio da preparação e as barras sobre os pontos representam o E.P.M.(n=5)



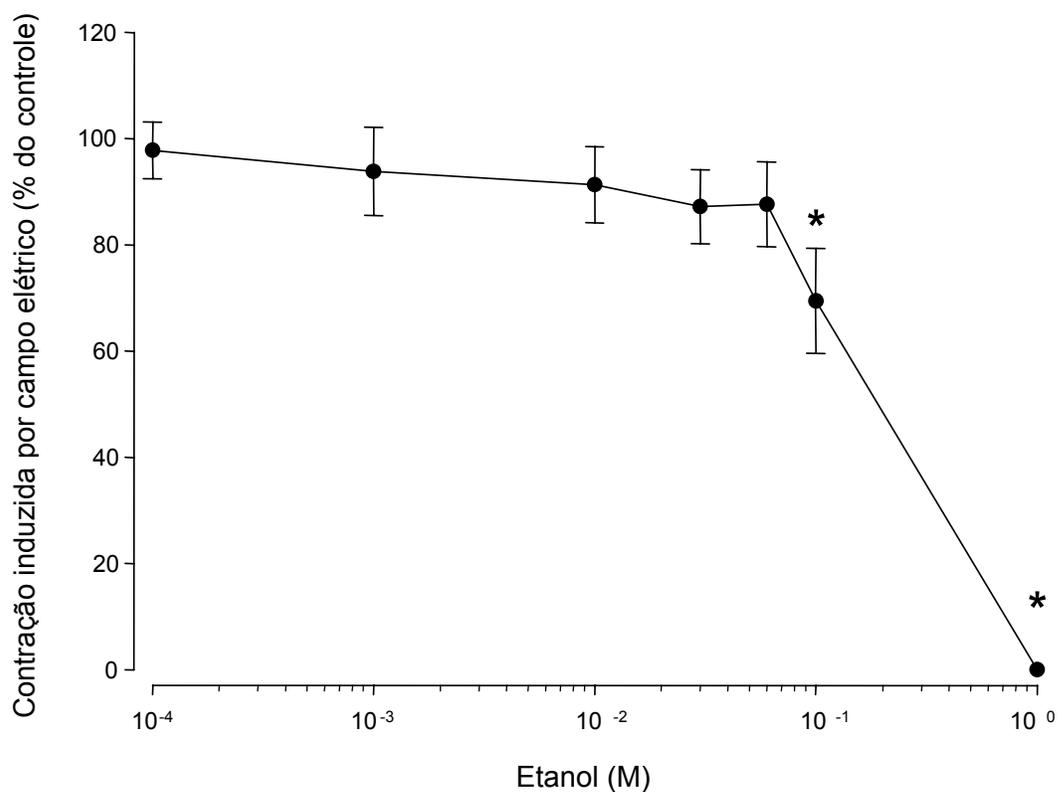
**Figura 8. Efeito do telocinobufagin sobre a resposta contrátil induzida pela estimulação por campo elétrico de segmentos isolados de íleo de cobaio.** Amplitude das contrações induzidas pelo campo elétrico na presença de concentrações crescentes de telocinobufagin. A amplitude média das contrações está expressa como % do controle, considerado como a deflexão da resposta contrátil obtida na ausência do telocinobufagin. Os pontos no gráfico representam a média e as barras sobre os pontos representam o E.P.M.

\*,  $p < 0,05$ , teste de Dunnett ( $n = 5$ )



**Figura 9. Resposta contrátil induzida pela estimulação por campo elétrico de segmentos isolados de fêo de cobaio após a retirada do telocinobufagin.** Amplitude das contrações induzidas pelo campo elétrico após a retirada do telocinobufagin por lavagens sucessivas da preparação com Tyrode modificado. A amplitude média das contrações está expressa como % do controle, considerado como a deflexão da resposta contrátil obtida na ausência do telocinobufagin. Os pontos no gráfico representam a média e as barras sobre os pontos representam o E.P.M.

\*,  $p < 0,05$ , teste de Dunnett ( $n = 5$ )



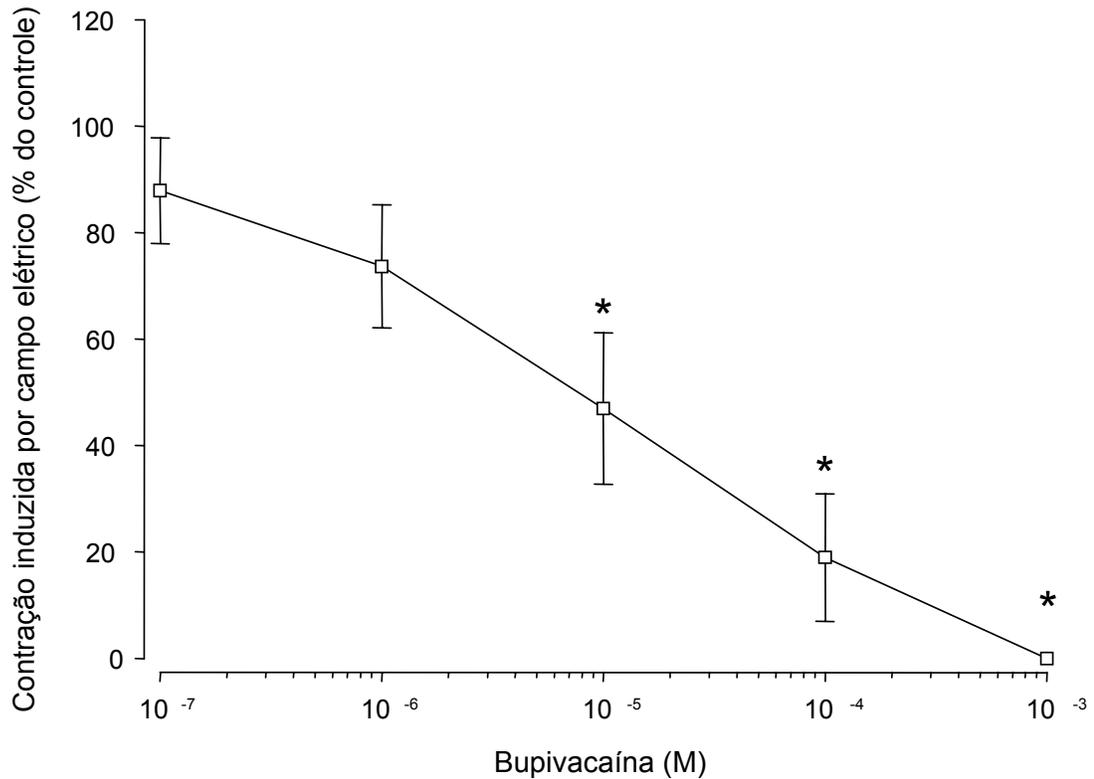
**Figura 10. Efeito do etanol sobre a resposta contrátil induzida pela estimulação por campo elétrico de segmentos isolados de íleo de cobaio.**

Amplitude das contrações induzidas pelo campo elétrico na presença de concentrações crescentes de etanol. A amplitude média das contrações está expressa como % do controle, considerado como a deflexão da resposta contrátil obtida na ausência do etanol. Os pontos no gráfico representam a média e as barras sobre os pontos representam o E.P.M.

\*,  $p < 0,05$ , teste de Dunnett (n = 5)

### 4.3 - EFEITOS DA BUPIVACAÍNA SOBRE AS CONTRAÇÕES INDUZIDAS PELA ESTIMULAÇÃO POR CAMPO ELÉTRICO EM ÍLEO DE COBAIO

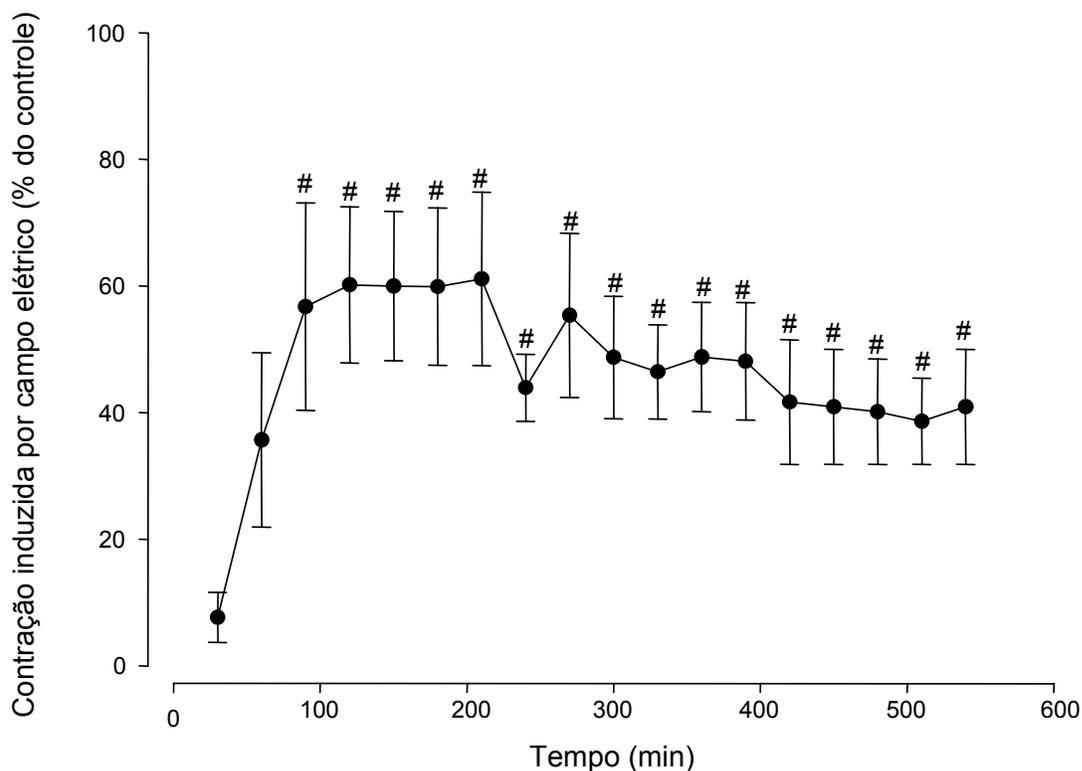
A adição de bupivacaína ( $10^{-7}$  -  $10^{-3}$  M) causou, de maneira dependente de concentração ( $p < 0,01$ , ANOVA), um efeito inibitório sobre as contrações de segmentos isolados de íleo de cobaio, induzidas pela estimulação por campo elétrico (**Figura 11**). O efeito foi significativo a partir da concentração de  $10^{-5}$  M e apresentou valor para a  $CI_{50}$  (**Tabela 1**) correspondente a 3,4 [0,2–61,2]  $\mu$ M ( $n = 5$ ). Na concentração de  $10^{-3}$  M, o bloqueio foi total. A retirada da bupivacaína por lavagens sucessivas da preparação com solução de Locke produziu uma reversão parcial (~60 %) da resposta contrátil, sendo significativa a partir de 90 minutos da retirada do anestésico local. Entretanto, mesmo após 540 min não houve incremento adicional da recuperação da resposta (**Figura 12**).



**Figura 11. Efeito da bupivacaína sobre a resposta contrátil induzida pela estimulação por campo elétrico de segmentos isolados de íleo de cobaio.**

Amplitude das contrações induzidas pelo campo elétrico na presença de concentrações crescentes de bupivacaína. A amplitude média das contrações está expressa como % do controle, considerado como a deflexão da resposta contrátil obtida na ausência da bupivacaína. Os pontos no gráfico representam a média e as barras sobre os pontos representam o E.P.M.

\*,  $p < 0,05$ , teste de Dunnett ( $n = 5$ )



**Figura 12. Resposta contrátil induzida pela estimulação por campo elétrico de segmentos isolados de íleo de cobaio após a retirada da bupivacaína.**

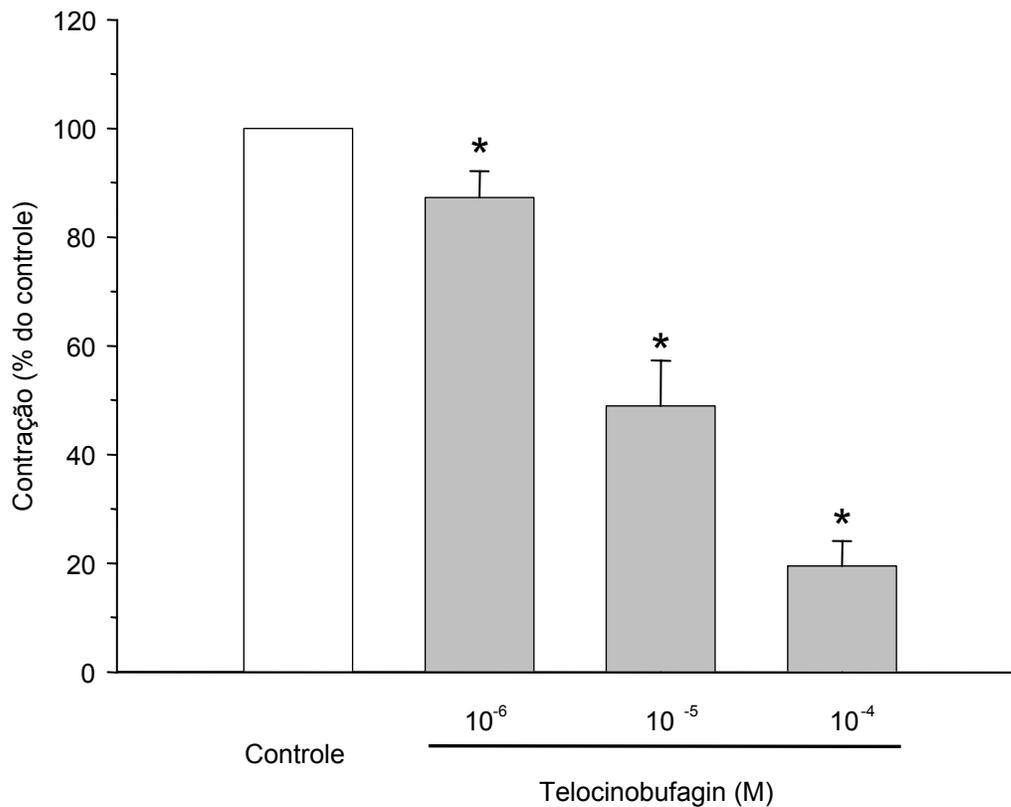
Amplitude das contrações induzidas pelo campo elétrico após a retirada da bupivacaína por lavagens sucessivas da preparação com Tyrode modificado. A amplitude média das contrações está expressa como % do controle, considerado como a deflexão da resposta contrátil obtida na ausência da bupivacaína. Os pontos no gráfico representam a média e as barras sobre os pontos representam o E.P.M.

#,  $p < 0,05$ , teste de Dunnett ( $n = 5$ ) em relação à resposta contrátil obtida na concentração de  $10^{-3}$  M de bupivacaína. A recuperação foi apenas parcial visto que todos os pontos são significativamente diferentes da resposta obtida na ausência da bupivacaína ( $p < 0,05$ , teste de Dunnett, dados não mostrados).

#### **4.4 - EFEITOS DO TELOCINOBUFAGIN SOBRE AS CONTRAÇÕES INDUZIDAS PELA ACETILCOLINA EM ÍLEO DE COBAIO**

A adição de acetilcolina (ACh), usada em uma concentração (1  $\mu$ M) menor que a necessária para produzir efeito máximo no tecido, induziu contrações que se mantiveram estáveis com exposições subseqüentes ao neurotransmissor colinérgico. A presença do telocinobufagin ( $10^{-6}$  -  $10^{-4}$  M) produziu, de maneira dependente de concentração ( $p < 0,01$ , ANOVA), um efeito inibitório sobre as contrações de segmentos isolados de íleo de cobaio, induzidas pela ACh (**Figura 13**). O efeito foi significativo a partir da concentração de  $10^{-6}$  M e apresentou valor para a  $CI_{50}$  (**Tabela 1**) correspondente a 12,1 [5,1 – 28,4]  $\mu$ M ( $n = 8$ ), significativamente diferente de 125,0 [85,3 – 125,3]  $\mu$ M encontrado para o bloqueio das contrações induzidas pelo campo elétrico ( $p < 0,001$ , teste t não pareado). Após 3 horas de lavagens sucessivas da preparação a recuperação da resposta foi significativa atingindo  $68,7 \pm 4,9$  % em relação ao controle.

A curva concentração-efeito para o etanol ( $10^{-5}$  – 1 M), sobre a resposta colinérgica em segmentos de íleo de cobaio, não demonstrou qualquer alteração significativa na amplitude das contrações até a concentração de  $10^{-2}$  M de etanol (**Figura 14**). Na concentração de  $10^{-1}$  M, a resposta foi significativamente diminuída para  $62,2 \pm 4,2$  % ( $n = 5$ ) da contração no período controle e foi abolida com 1 M de etanol ( $p < 0,05$ , teste de Dunnett). Por outro lado, a recuperação da resposta contrátil foi rápida com a lavagem da preparação. Após 6 min e 20 min da retirada do etanol, a contração da ACh correspondeu a  $63,4 \pm 8,2$  % e  $91,4 \pm 6,15$  % da obtida no controle.



**Figura 13. Efeito do telocinobufagin sobre as contrações induzidas pela acetilcolina em íleo isolado de cobaio.** Amplitude das respostas contráteis induzidas por  $1\mu\text{M}$  de acetilcolina (Ach) na ausência (controle) e na presença de concentrações crescentes de telocinobufagin. As barras com linhas verticais no topo indicam a média e o E.P.M., respectivamente.

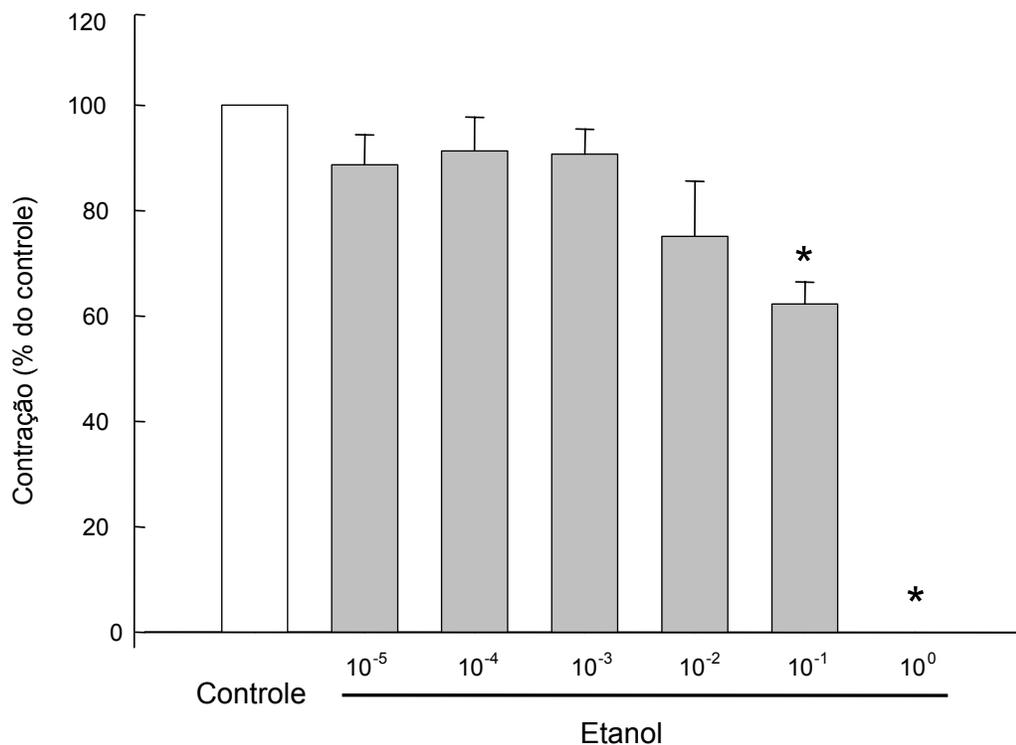
\*,  $p < 0,05$ , teste de Dunnett (n = 8)

**Tabela 1: Valores da  $CI_{50}$  para o bloqueio das contrações induzidas por acetilcolina (ACh;  $1\mu\text{M}$ ) e estimulação por campo elétrico (ECE) pelo telocinobufagin e bupivacaína em íleo isolado de cobaio**

| <b>Droga</b>    | <b>ACh (<math>1\mu\text{M}</math>)</b> | <b>ECE</b>           |
|-----------------|--|----------------------|
| Telocinobufagin | 12,1 [5,1 – 28,4]                      | 125 [85,3 -183,3]*** |
| Bupivacaína     | 8,6 [3,0 – 24,2]                       | 3,4 [0,2 – 61,2]     |

- Valores em  $\mu\text{M}$  expressos como média geométrica e o intervalo de confiança (95%)

- \*\*\*,  $p < 0,001$ ; teste t não pareado

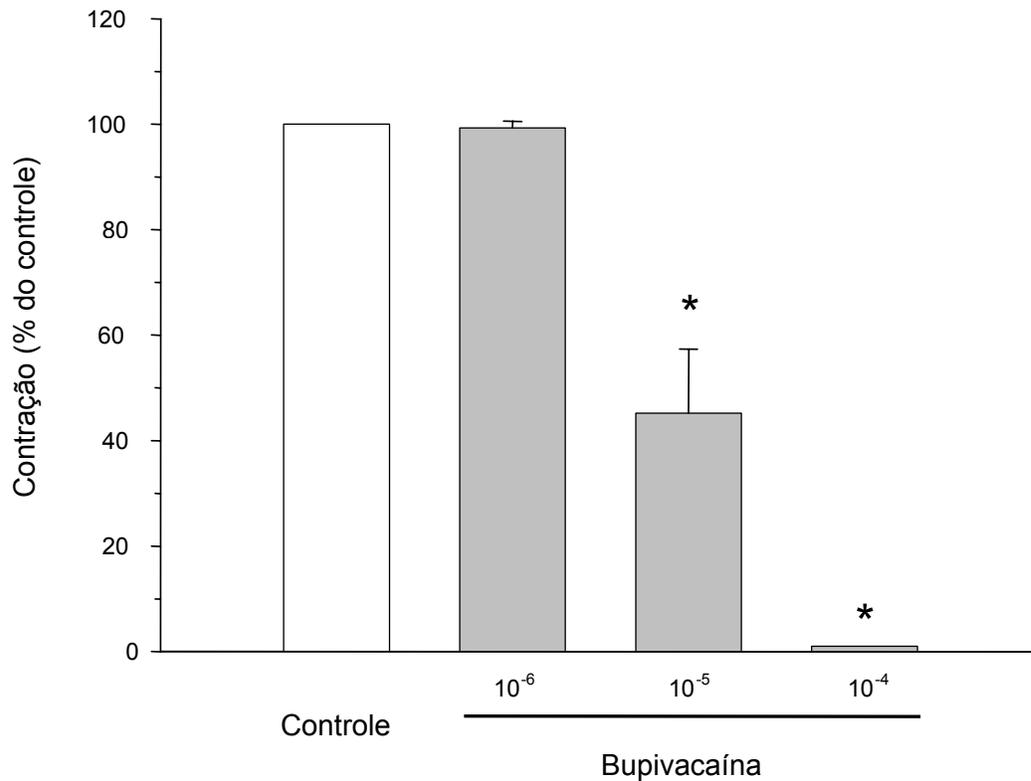


**Figura 14. Efeito do etanol sobre as contrações induzidas pela acetilcolina em fêo isolado de cobaio.** Amplitude das respostas contráteis induzidas por 1 $\mu$ M de acetilcolina (ACh) na ausência (controle) e na presença de concentrações crescentes de etanol. As barras com linhas verticais no topo indicam a média e o E.P.M., respectivamente.

\* ,  $p < 0,05$ , teste de Dunnett (n = 5)

#### **4.5 - EFEITOS DA BUPIVACAÍNA SOBRE AS CONTRAÇÕES INDUZIDAS PELA ACETILCOLINA EM ÍLEO DE COBAIO**

A adição de bupivacaína ( $10^{-6}$  -  $10^{-4}$  M) causou, de maneira dependente de concentração ( $p < 0,01$ , ANOVA), um efeito inibitório sobre as contrações induzidas pela acetilcolina (Ach) (**Figura 15**). O efeito foi significativo a partir da concentração de  $10^{-5}$  M e apresentou valor para  $CI_{50}$  (**Tabela 1**) correspondente a  $8,6 [3,0-24,2]$   $\mu$ M ( $n=5$ ). A comparação com o efeito inibitório da bupivacaína sobre as contrações induzidas pelo campo elétrico não revelou qualquer diferença significativa ( $p > 0,05$ , teste t não pareado). Na concentração de  $10^{-4}$  M, o bloqueio foi total. A lavagem da preparação produziu recuperação total da resposta, que correspondeu a  $120,8 \pm 8,5$  % da obtida no período controle, após 30 minutos da retirada do anestésico local.



**Figura 15. Efeito da bupivacaína sobre as contrações induzidas pela acetilcolina em íleo isolado de cobaio.** Amplitude das respostas contráteis induzidas por 1  $\mu$ M de acetilcolina (ACh) na ausência (controle) e na presença de concentrações crescentes de bupivacaína. As barras com linhas verticais no topo indicam a média e o E.P.M., respectivamente.

\* ,  $p < 0,05$ , teste de Dunnett (n = 5)

#### 4.6 – EFEITOS DO TELOCINOBUFAGIN SOBRE O POTENCIAL DE AÇÃO COMPOSTO EM NERVO CIÁTICO ISOLADO DE RATO

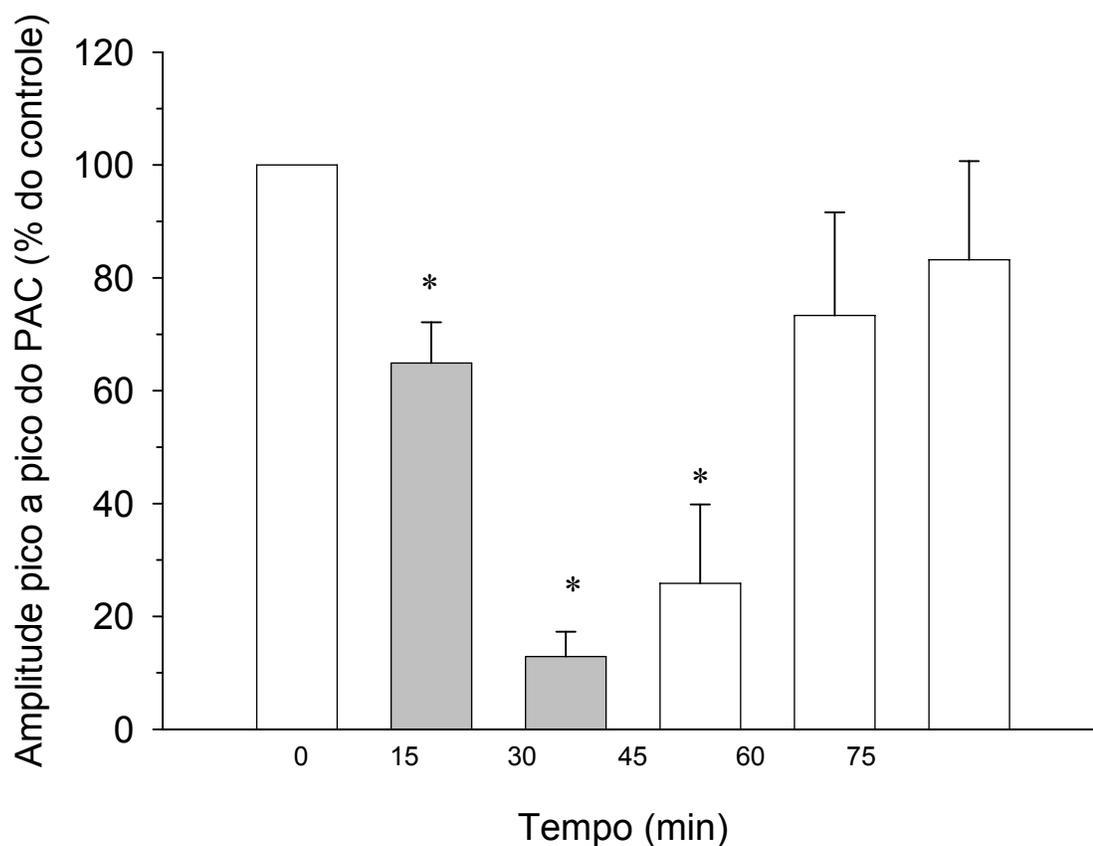
A aplicação de pulsos quadrados despolarizantes (20 V, 0,1 ms, 0,2 Hz), na extremidade proximal do nervo, foi suficiente para a propagação de um potencial de ação composto (PAC) que apresentou amplitude pico-a-pico correspondente a  $3,4 \pm 0,18$  mV e velocidade de condução de  $44,8 \pm 5,0$  m/s ( $n = 6$ ), conforme os traçados obtidos pelos eletrodos de registro dispostos a aproximadamente 3,5 cm de distância dos eletrodos de estimulação. A amplitude e a velocidade de condução do PAC não sofreram alterações significativas, quando as condições às quais os nervos estavam submetidos não foram alteradas, mesmo por um período equivalente a 4 horas.

Uma vez que o telocinobufagin produziu um efeito inibitório sobre as contrações de segmentos isolados de íleo de cobaio em mais de 80 % da sua amplitude, na faixa de concentração entre  $10^{-4}$  e  $6 \times 10^{-4}$ , decidiu-se utilizar a concentração de  $10^{-3}$  M de telocinobufagin para avaliar seus efeitos sobre alguns parâmetros do potencial de ação composto, obtido de nervo ciático isolado de rato, como amplitude pico-a-pico e velocidade de condução nervosa.

A adição do telocinobufagin ( $10^{-3}$  M) produziu uma diminuição significativa dos parâmetros avaliados do PAC. A amplitude pico-a-pico foi reduzida para  $64,9 \pm 7,2$  % e  $12,9 \pm 4,4$  % em comparação ao controle, após 15 e 30 minutos de contato com o telocinobufagin, respectivamente ( $p < 0,05$ , teste de Dunnett, **Figura 16**). Na lavagem do nervo com solução de Locke, o

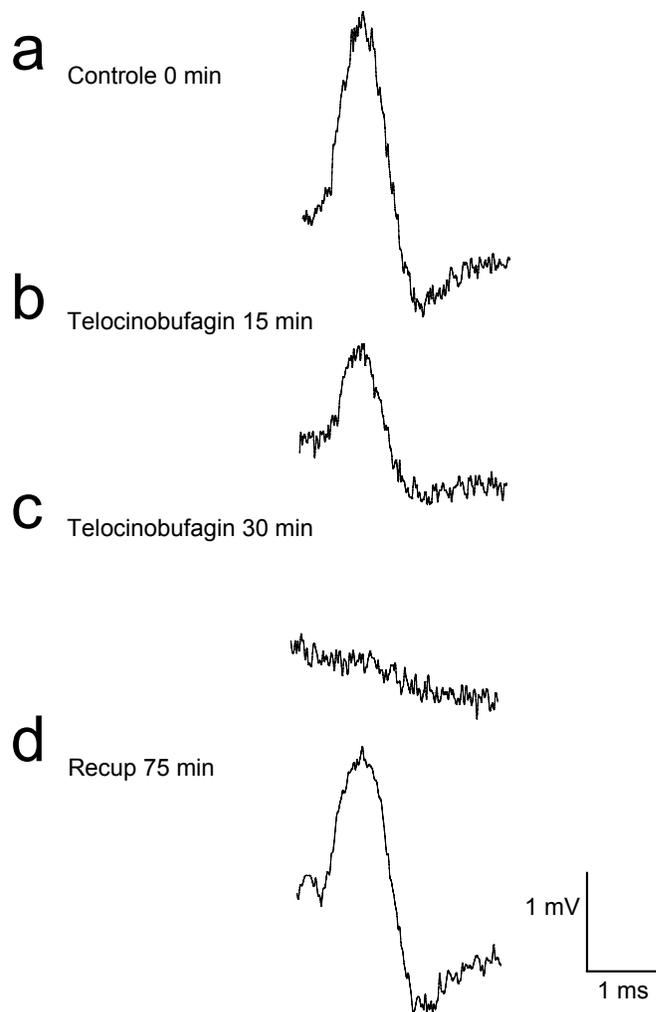
registro do PAC foi rapidamente recuperado, atingindo um valor correspondente a  $25,8 \pm 14,0$  % e  $83,2 \pm 17,5$  % da amplitude pico-a-pico obtida no controle, após 15 e 45 minutos da retirada do telocinobufagin, respectivamente (**Figura 17**).

O telocinobufagin também diminuiu a velocidade de condução do PAC no nervo ciático (**Figura 18**). A velocidade de condução foi significativamente reduzida para  $15,0 \pm 15,0$  % em comparação ao controle, somente após 30 minutos de contato com o telocinobufagin ( $p < 0,05$ , teste de Dunnett). A retirada do telocinobufagin reverteu quase totalmente a velocidade de condução para  $78,7 \pm 7,2$  % da obtida pelo controle, após 45 minutos da retirada do bufadienolídeo da solução.

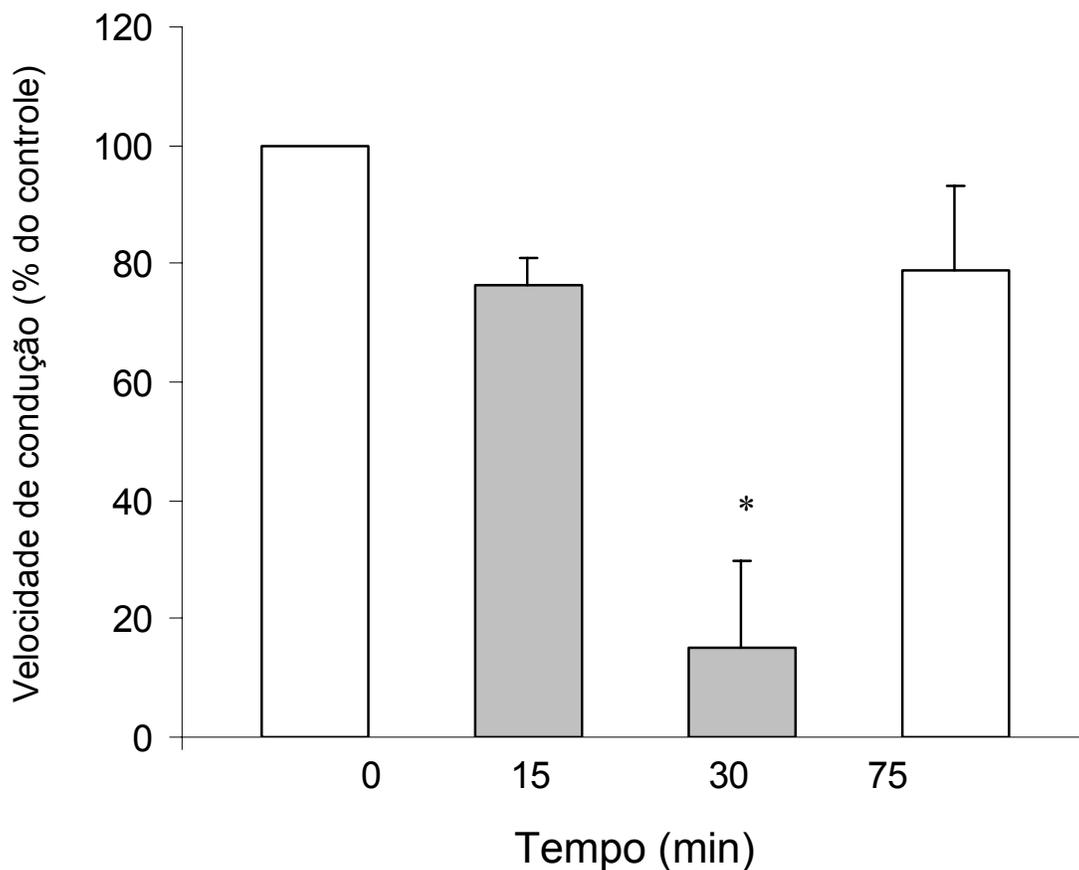


**Figura 16 . Efeito do telocinobufagin sobre a amplitude pico-a-pico do potencial de ação composto do nervo ciático de rato.** O gráfico mostra o efeito da exposição do nervo ciático de rato ao telocinobufagin (1 mM) durante 30 min e a recuperação, após lavagens sucessivas, da amplitude pico-a-pico do potencial de ação composto. Ordenada, % do controle; abscissa, tempo em min. Os pontos no gráfico representam a média e as barras sobre os pontos representam o E.P.M

\*,  $p < 0,05$ , teste de Dunnett (n = 6)



**Figura 17. Efeito do telocinobufagin sobre o potencial de ação composto em nervo ciático isolado de rato.** Traçados originais dos registros do potencial de ação composto obtidos de nervo ciático isolado de rato na ausência (a) e na presença nos tempos 15 (b) e 30 (c) minutos de contato com a preparação do telocinobufagin ( $10^{-3}$  M), bem como a recuperação da resposta após 45 minutos da retirada do bufodienolídeo (d). Calibração vertical: 1 mV; Calibração horizontal: 1 ms



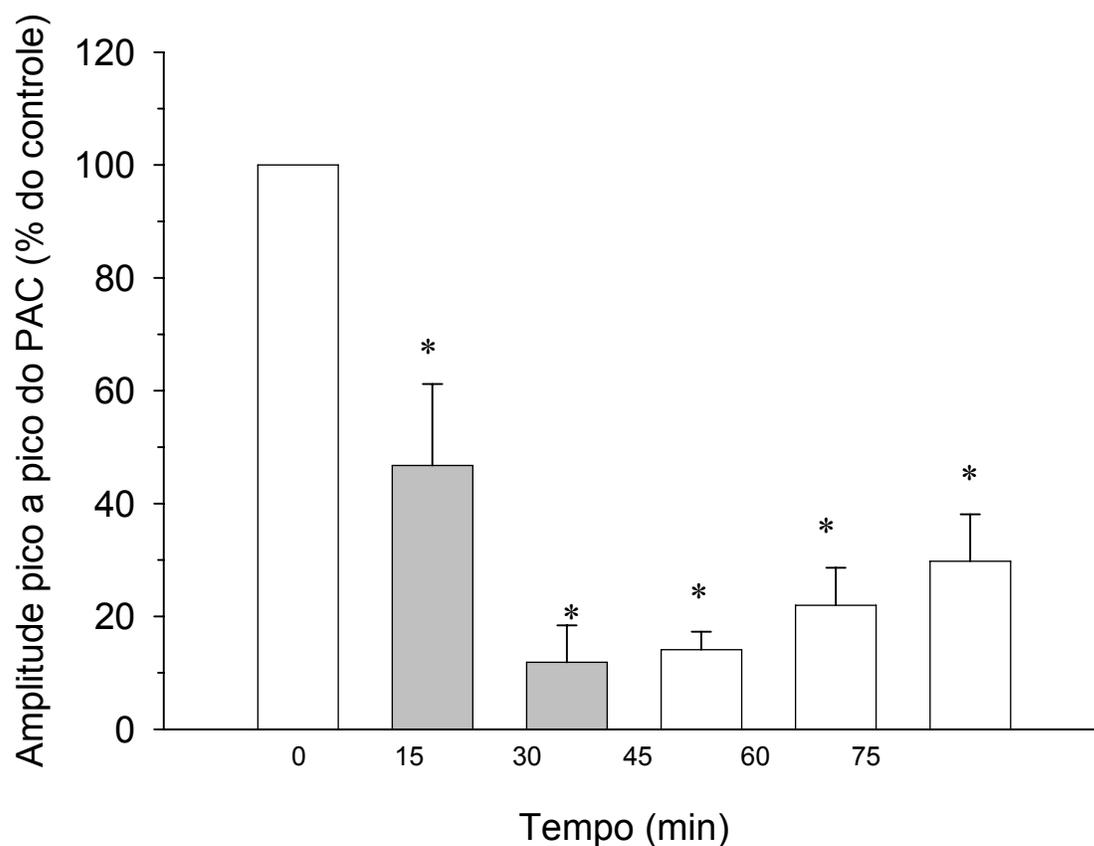
**Figura 18. Efeito do telocinobufagin sobre a velocidade de condução do potencial de ação composto do nervo ciático de rato.** O gráfico mostra o efeito da exposição do nervo ciático de rato ao telocinobufagin (1 mM) durante 30 min e a recuperação, após lavagens sucessivas, da velocidade de condução do potencial de ação composto. Ordenada, % do controle; abscissa, tempo em min. Os pontos no gráfico representam a média e as barras sobre os pontos representam o E.P.M.

\*,  $p < 0,05$ , teste de Dunnett (n = 6)

#### 4.7 - EFEITOS DA BUPIVACAÍNA SOBRE O POTENCIAL DE AÇÃO COMPOSTO EM NERVO CIÁTICO ISOLADO DE RATO

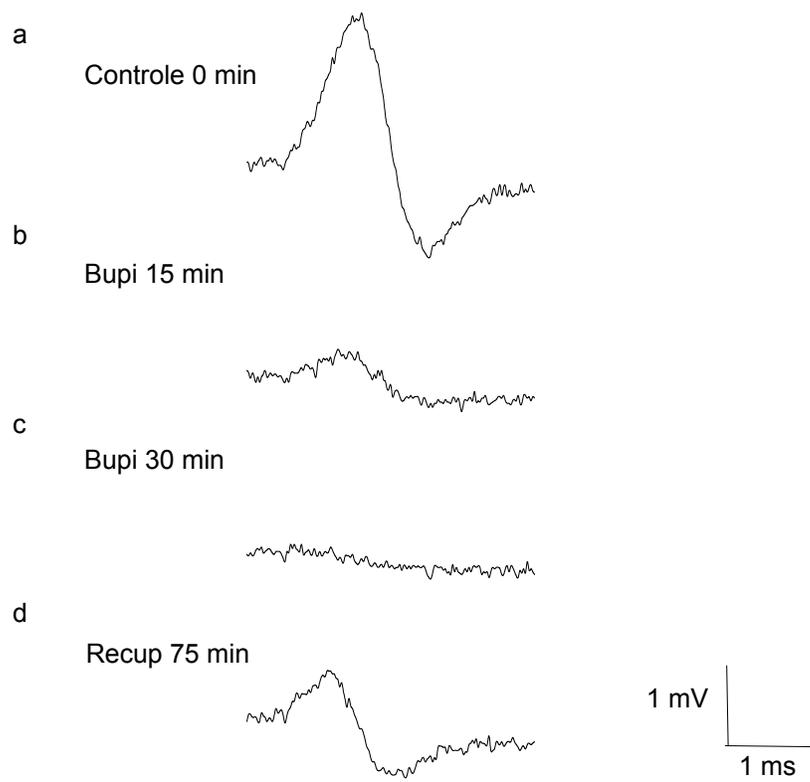
A adição da bupivacaína ( $10^{-3}$  M) causou uma diminuição significativa da amplitude pico-a-pico do potencial de ação composto (PAC) (**Figura 19**), que foi reduzida para  $46,7 \pm 14,4$  % e  $11,8 \pm 6,5$  % em comparação ao controle, após 15 e 30 minutos de contato com a bupivacaína, respectivamente ( $p < 0,05$ , teste de Dunnett). Na lavagem do nervo com solução de Locke, o registro do PAC foi recuperado apenas parcialmente, atingindo um valor correspondente a  $14,1 \pm 3,2$  % e  $29,7 \pm 8,3$  % da amplitude pico-a-pico obtida no controle, após 15 e 45 minutos da retirada da bupivacaína, respectivamente (**Figura 20**).

A bupivacaína também diminuiu a velocidade de condução do PAC no nervo ciático, que no período controle correspondeu a  $42,7 \pm 7,9$  m/s ( $n = 6$ ). A velocidade de condução foi significativamente reduzida ( $p < 0,05$ , teste de Dunnett) para  $17,4 \pm 11,2$  %, após 30 minutos. A retirada da bupivacaína reverteu parcialmente a velocidade de condução para  $44,8 \pm 14,5$  % da obtida pelo controle, após 45 minutos da retirada do anestésico da solução (**Figura 21**).

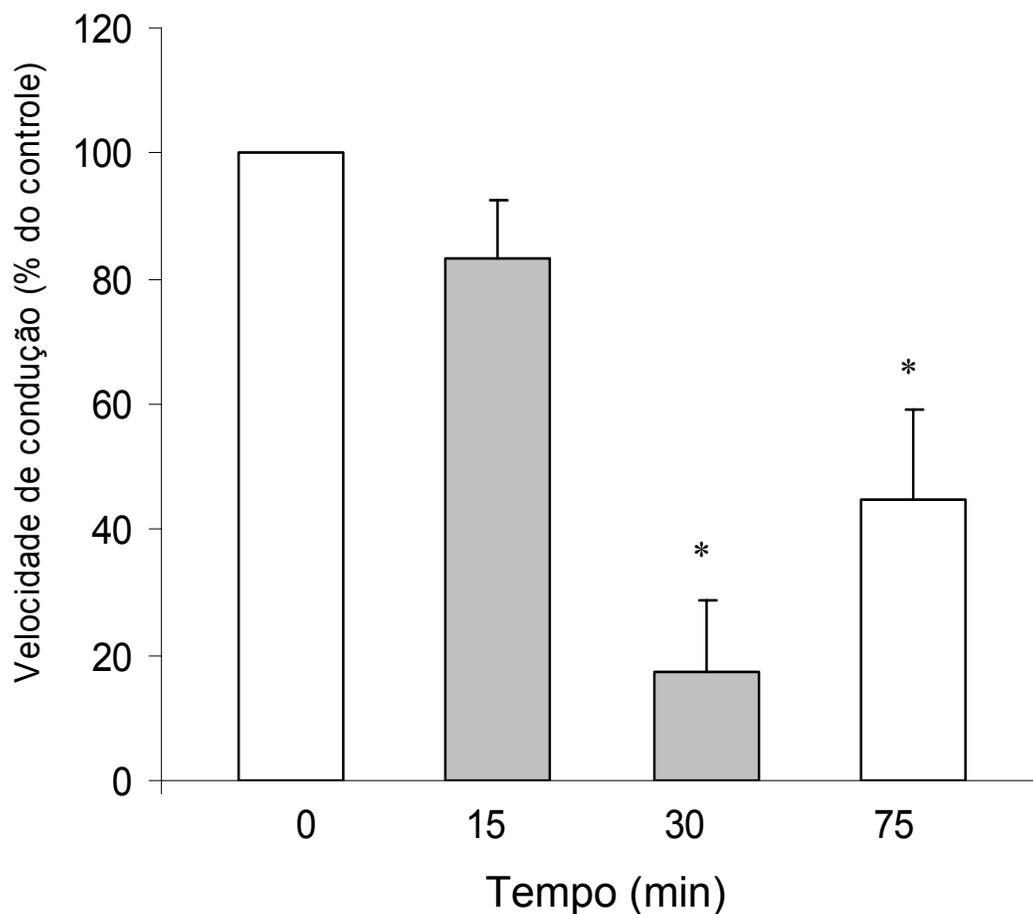


**Figura 19. Efeito da bupivacaína sobre a amplitude pico-a-pico do Potencial de Ação Composto do nervo ciático de rato.** O gráfico mostra o efeito da exposição do nervo ciático de rato à bupivacaína (1 mM) durante 30 min e a recuperação, após lavagens sucessivas, da amplitude pico-a-pico do potencial de ação composto. Ordenada, % do controle; abscissa, tempo em min. Os pontos no gráfico representam a média e as barras sobre os pontos representam o E.P.M.

\*,  $p < 0,05$ , teste de Dunnett ( $n = 6$ )



**Figura 20. Efeito da bupivacaína sobre o potencial de ação composto (PAC) em nervo ciático isolado de rato.** Traçados originais dos registros do PAC obtidos de nervo ciático isolado de rato na ausência (a) e na presença (nos tempos 15 (b) e 30 (c) minutos de contato com a preparação) da bupivacaína ( $10^{-3}$  M), bem como a recuperação da resposta após 45 minutos da retirada do anestésico local (d). Calibração vertical: 1 mV; Calibração horizontal: 1 ms



**Figura 21. Efeito da bupivacaína sobre a velocidade de condução do Potencial de Ação Composto do nervo ciático de rato.** O gráfico mostra o efeito da exposição do nervo ciático de rato à bupivacaína (1 mM) durante 30 min e a recuperação, após lavagens sucessivas, da velocidade de condução do potencial de ação do PAC. Ordenada, % do controle; abscissa, tempo em min. Os pontos no gráfico representam a média e as barras sobre os pontos representam o E.P.M.

#### 4.8 - EFEITOS DO TELOCINOBUFAGIN SOBRE O INOTROPISMO DE ÁTRIO ISOLADO DE RATO

Para estudar os possíveis efeitos deletérios no coração, foi inicialmente utilizado o modelo do átrio isolado de rato para avaliação da força de contração (inotropismo) cardíaca. O átrio esquerdo de rato foi utilizado para estudo da atividade inotrópica. Os dados foram expressos como força de contração (g de tensão).

A aplicação de pulsos quadrados (5 V, 5 ms, 2 Hz), no átrio esquerdo com frequência de 120 bpm, foi suficiente para produzir uma força de contração cardíaca de  $0,63 \pm 0,09$  g de tensão. A resposta na contratilidade não sofreu alterações significativas, quando as condições às quais o átrio esquerdo estava submetido no meio de superperfusão foram mantidas.

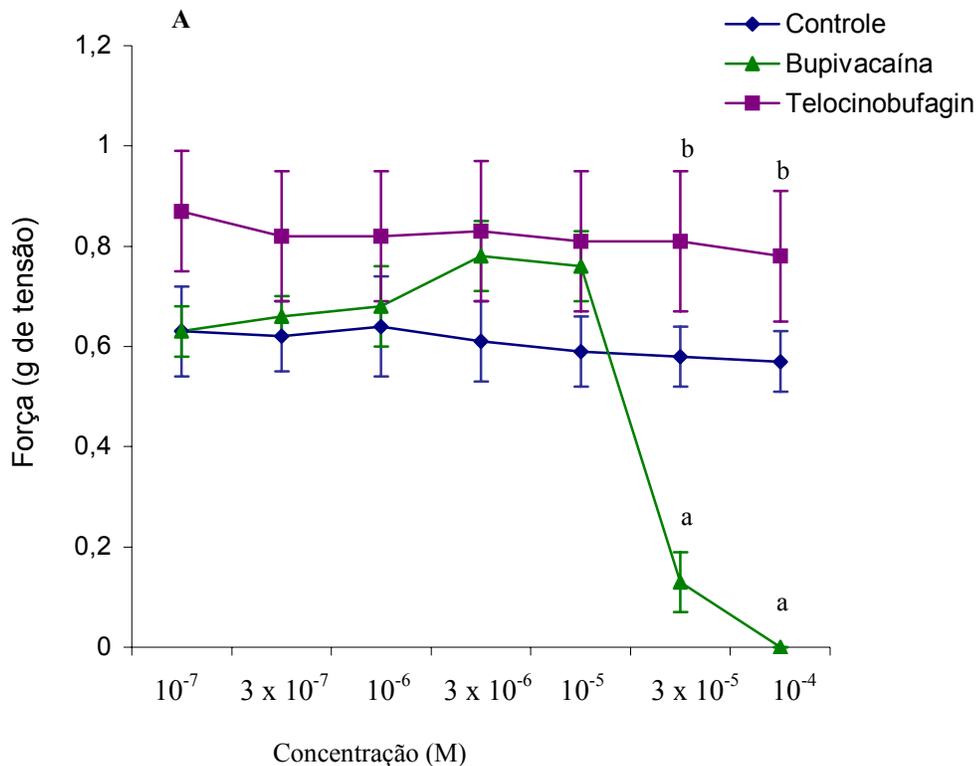
Na presença do telocinobufagin, nenhuma alteração significativa foi observada durante 5 min na força de contração cardíaca, comparada ao controle, nas concentrações de  $10^{-7}$  a  $10^{-4}$  M (**Figura 22 A**). Uma concentração de  $10^{-3}$  M e com duração de 12 min de telocinobufagin foi posteriormente utilizada (**Figura 23**); todavia, esta concentração também não produziu alteração significativa na força de contração cardíaca ( $p > 0,05$ , teste de Dunnett).

Uma curva concentração-efeito para o etanol foi construída para verificar uma possível ação do solubilizante em possível efeito inotrópico negativo (**Figura 24**). O etanol não alterou significativamente a força de

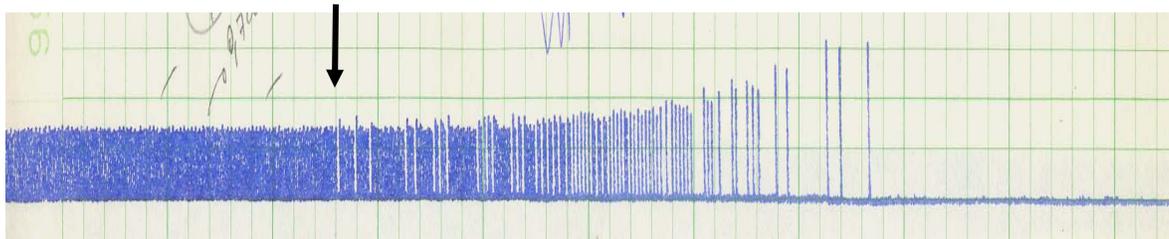
contração do átrio esquerdo induzida pela estimulação elétrica nas concentrações de  $10^{-9}$  a  $10^{-1}$  M. Na concentração de 1 M, a resposta foi significativamente alterada para 0 g de tensão, totalmente abolida ( $p < 0,05$ , teste de Dunnett). O efeito de inibição foi revertido após lavagem ou administração do isoproterenol 1ug/ml com resposta de  $0,71 \pm 0,18$  g de tensão na força de contração cardíaca.

#### **4.9 - EFEITOS DA BUPIVACAÍNA SOBRE O INOTROPISMO DE ÁTRIO ISOLADO DE RATO**

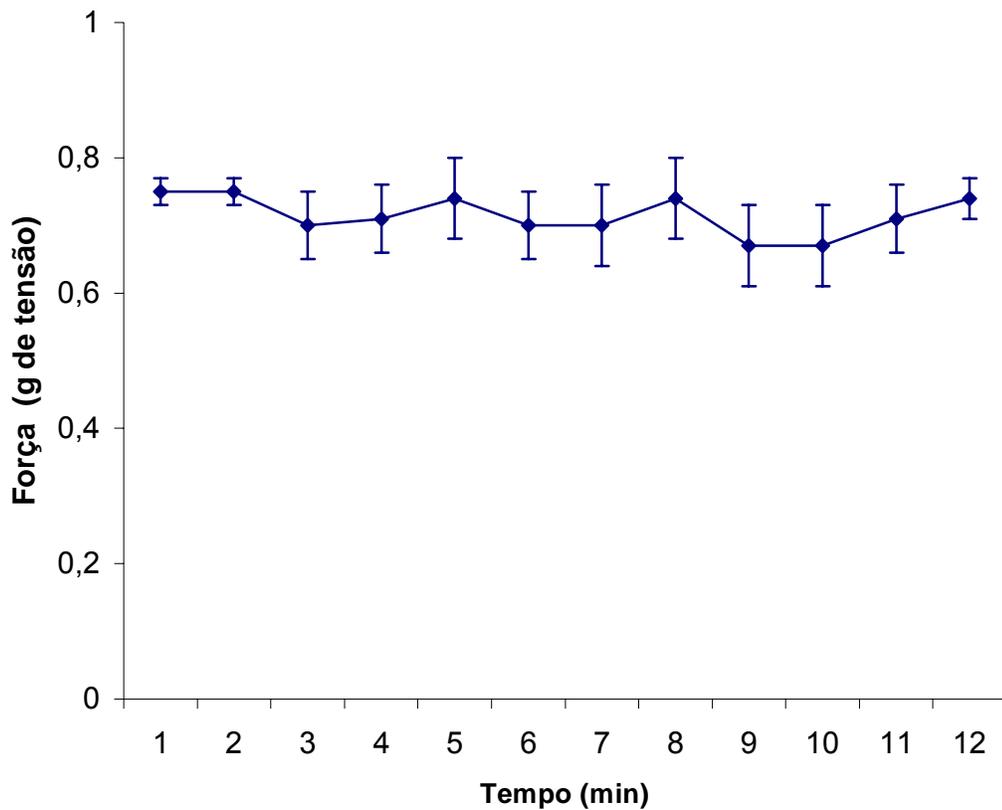
A bupivacaína (**Figura 22 A e B**) na concentração de  $3 \times 10^{-5}$  M diminuiu significativamente a força de contração cardíaca para  $0,13 \pm 0,06$  g de tensão, e na concentração de  $10^{-4}$  M bloqueou totalmente a força de contração cardíaca para 0 ( $p < 0,05$ , teste de Dunnett).



**B** Bupivacaína  $10^{-4}$

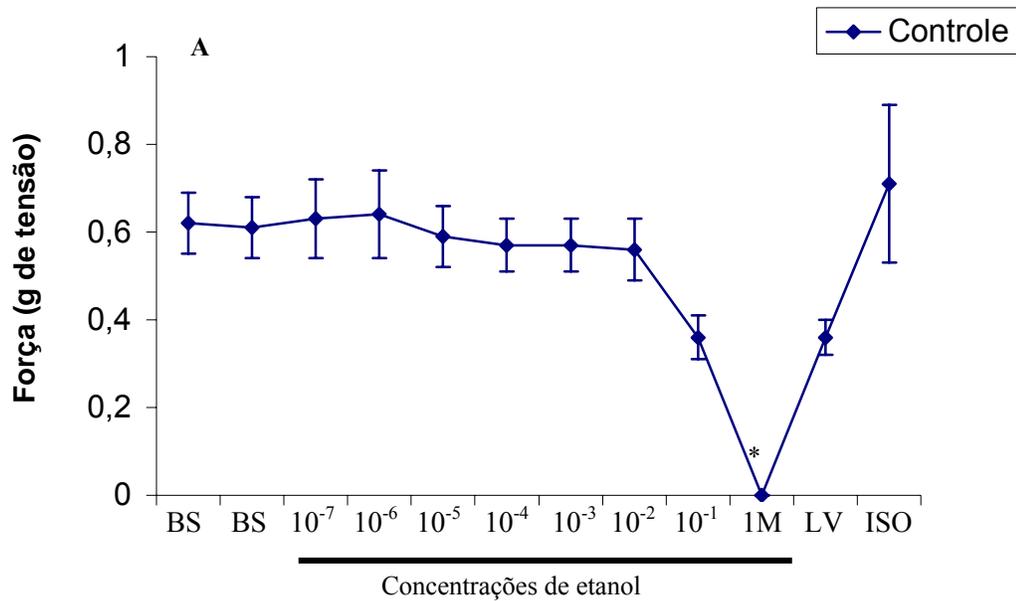


**Figura 22- Efeitos do controle (etanol), bupivacaína e telocinobufagin na força de contração (Inotropismo) cardíaca de ratos.** O painel A mostra o efeito do etanol, bupivacaína e telocinobufagin na força de contração (Inotropismo) cardíaca de ratos em diferentes concentrações ( $10^{-7}$  a  $10^{-4}$ ). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM ( $n=6$ ). Anova e Dunnett como teste *post hoc*,  $p<0,005$ . **a** vs controle, **b** vs bupivacaína. Em B é mostrado um traçado registrado em polígrafo representando do efeito da bupivacaína no átrio esquerdo de ratos. As setas indicam o momento da adição da bupivacaína ( $10^{-4}$ ).

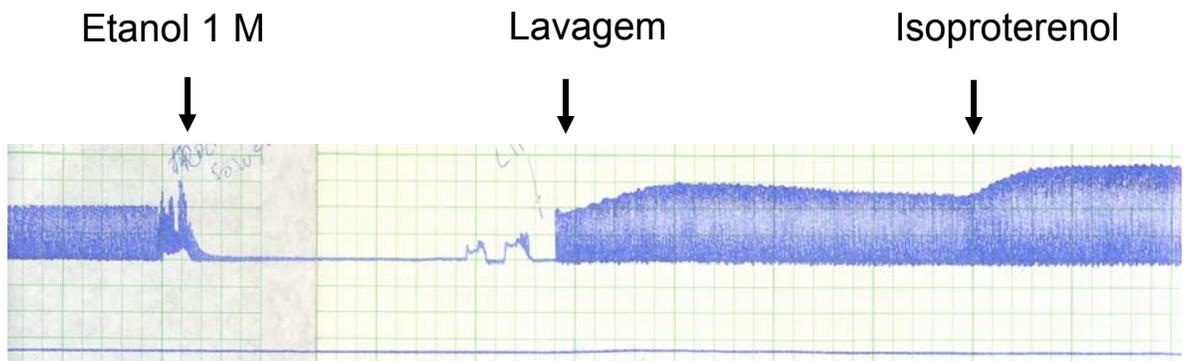


**Figura 23- Efeitos do telocinobufagin na força de contração (Inotropismo) cardíaca de ratos durante 12 minutos de observação.** A figura mostra o efeito do telocinobufagin na força de contração (inotropismo) cardíaca de ratos na concentração de 10 M durante 12 min. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM (n=6).

\*,  $p < 0,05$ , teste de Dunnett (n = 6)



B



**Figura 24. Efeitos do controle (etanol) na força de contração cardíaca do átrio esquerdo de ratos.** O painel A mostra o efeito do etanol na força de contração do átrio esquerdo em diferentes concentrações ( $10^{-7}$  a 1 M) e na presença de isoproterenol (1  $\mu\text{g/ml}$ ). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM (n=6). Anova e Dunnett como teste post hoc,  $p < 0,05$ . Em B é mostrado um traçado registrado em polígrafo representando o efeito do etanol no átrio esquerdo de ratos. As setas marcam o momento da adição do etanol (1M), lavagem e isoproterenol, respectivamente. BS-basal; LV- lavagem; ISO- Isoproterenol 1 $\mu\text{g/ml}$ .

#### 4.10 - EFEITOS DO TELOCINOBUFAGIN SOBRE O CRONOTROPISMO DE ÁTRIO ISOLADO DE RATO

Para ainda estudar os possíveis efeitos deletérios no coração, foi posteriormente utilizado o modelo do átrio isolado de rato para avaliação da frequência de contração (cronotropismo) cardíaca. O átrio direito de rato foi utilizado para estudo da atividade cronotrópica. Os valores da atividade mecânica espontânea do átrio direito foram expressos em frequência de contrações ou batimentos por minuto (bpm).

A frequência cardíaca foi de  $298 \pm 50$  contrações por minutos no átrio direito de rato. A resposta na frequência de atividade espontânea cardíaca não sofreu alterações significativas, quando as condições às quais o átrio direito estava submetido no meio de superperfusão foram mantidas.

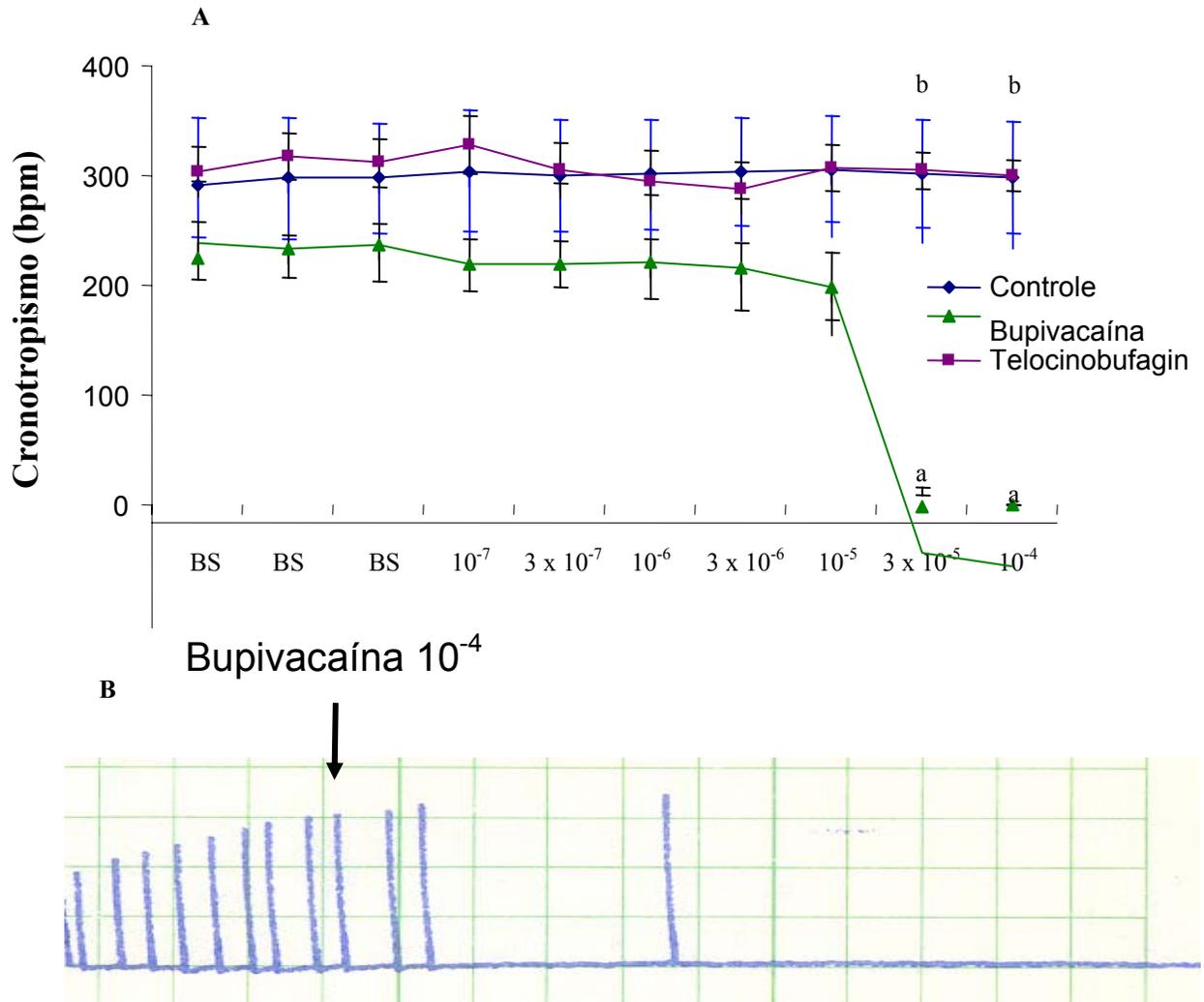
Na presença do telocinobufagin (**Figura 25 A**), nenhuma alteração significativa foi observada na atividade mecânica espontânea cardíaca, comparada ao controle, nas concentrações de  $10^{-7}$  a  $10^{-4}$  M ( $n=6$ ;  $p > 0,05$ , teste de Dunnett).

O etanol foi avaliado para verificar um possível efeito cronotrópico negativo (**Figura 26 A e B**). O solubilizante não alterou significativamente a frequência de atividade espontânea cardíaca nas concentrações de  $10^{-9}$  a  $10^{-1}$  M. Na concentração de 1 M, a resposta foi significativamente alterada para 0 contrações por minuto ( $p < 0,05$ , teste de Dunnett). O efeito de inibição foi

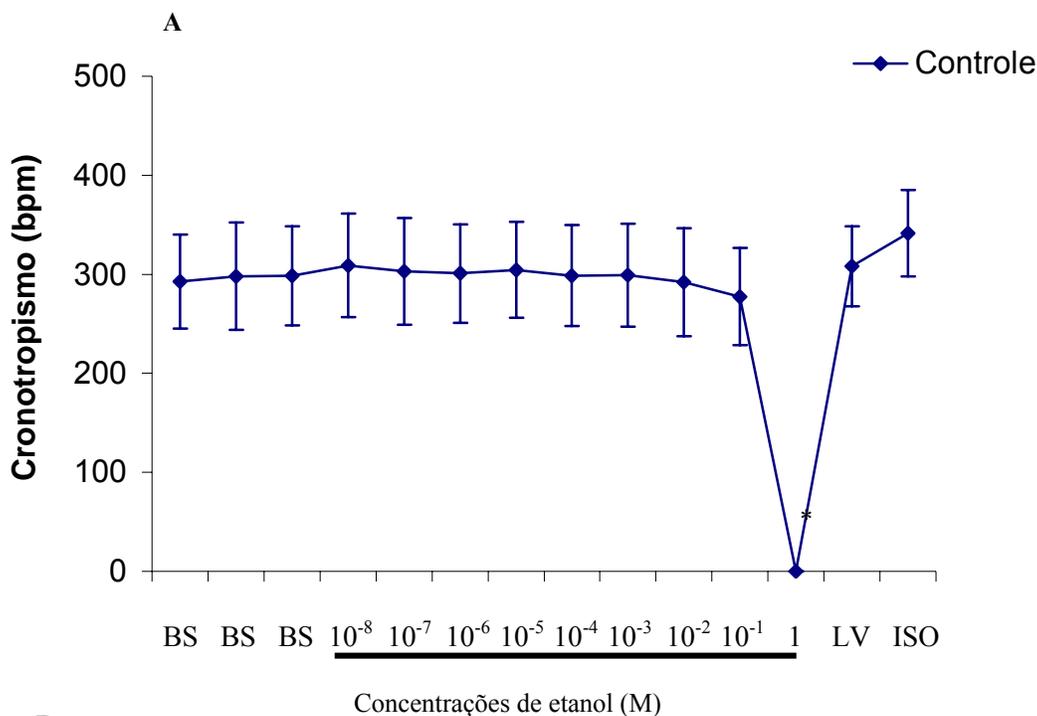
revertido após lavagem ou administração do isoproterenol 1µg/ml com resposta de  $341,3 \pm 43,7$  bpm.

#### **4.11 - EFEITOS DA BUPIVACAÍNA SOBRE O CRONOTROPISMO DE ÁTRIO ISOLADO DE RATO**

A bupivacaína (**Figura 25 A e B**) na concentração de  $3 \times 10^{-5}$  M diminuiu significativamente a frequência de atividade espontânea cardíaca para  $9,6 \pm 2,4$  bpm, e na concentração de  $10^{-4}$  M bloqueou totalmente a frequência cardíaca para 0 ( $p < 0,05$ , teste de Dunnett).



**Figura 25.** Efeitos do controle (etanol), bupivacaína e telocinobufagin na freqüência de contração espontânea do átrio direito de ratos. O painel **A** mostra o efeito do etanol, bupivacaína e telocinobufagin na freqüência das contrações espontâneas do átrio direito de ratos em diferentes concentrações ( $10^{-7}$  a  $10^{-4}$  M). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM (n=6). Anova e Dunnett como teste post hoc,  $p < 0,005$ . **a** vs controle, **b** vs bupivacaína. Em **B** é mostrado um traçado registrado em polígrafo representando o efeito da bupivacaína no átrio direito de ratos. As setas indicam o momento da adição do bupivacaína ( $10^{-4}$ ). BS- basal



**Figura 26. Efeitos do controle (etanol) na frequência de contração espontânea do átrio direito de ratos.** O painel **A** mostra o efeito do etanol na frequência das contrações espontâneas do átrio direito de ratos em diferentes concentrações ( $10^{-9}$  a 1M) e na presença de isoproterenol (1  $\mu$ g/ml). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM (n=6). Anova e Dunnett como teste post hoc,  $p < 0,005$ . Em **B** é mostrado um traçado registrado em polígrafo representando o efeito do etanol no átrio direito de ratos. As setas marcam o momento da adição do etanol (1M), lavagem e isoproterenol, respectivamente. BS-basal LV- lavagem; ISO- Isoproterenol 1 $\mu$ g/ml.

## 5 - DISCUSSÃO

Há séculos que as plantas têm sido a principal fonte de compostos ativos para produtos farmacêuticos, originando a substância ativa, a droga, ou alguma forma de modificação química para aumentar a potência de princípios ativos. Nos últimos anos, a pesquisa para novos fármacos de origem natural tem se intensificado para incluir fontes além do material de plantas (Clarke, 1997).

Por toda a História, o envenenamento por toxinas animais tem fascinado os homens. As toxinas animais têm feito uma contribuição significativa para intensificar o conhecimento na farmacologia e fisiologia humanas (Karalliedde, 1995).

Pesquisas recentes têm como objetivo encontrar substâncias com estruturas completamente novas, levando diretamente ou indiretamente para uma futura geração de fármacos, novos ou com atividades intensificadas. Tais moléculas podem ser de interesse geral ou acadêmico (bioquímico, biofísico ou farmacológico), desde que estruturas moleculares podem também possuir propriedades químicas ou farmacológicas desconhecidas, suscitadas quer por plantas, quer por animais (Clarke, 1997).

No solilóquio do duque Frederico de “Como gostais” de William Shakespeare, está escrito: Doces são os frutos da adversidade; semelhantes ao sapo que, feio e venenoso, usa uma jóia preciosa na cabeça. Há muitos relatos na literatura que descrevem a pele dos anfíbios como um vasto tesouro, ou uma mina de ouro como dizem alguns, em termos de conhecimento

acumulado e um futuro potencial terapêutico (Lazarus & Attila, 1993). Em Macabeth, Shakespeare descreve bruxas que preparam coquetéis de diversas composições químicas, entre elas misturas com veneno de sapos, refletindo um folclore hereditário que partes dos animais e plantas afetam o comportamento humano (Lazarus et al., 1994).

Toxinas de anfíbios têm sido fonte de uma infinidade de trabalhos na literatura, buscando princípios ativos acabados ou moldáveis para o uso terapêutico.

A pele dos anfíbios sintetiza e secreta uma admirável diversidade de compostos: bufogeninas (bufadienolídeos ou bufaginas), alcalóides, aminas biogênicas, peptídios e proteínas (Lazarus et al. 1994).

Na metodologia utilizada em nosso protocolo, o veneno extraído das glândulas parotóides do *Bufo paracnemis* foi dissolvido com etanol, que se mostrou excelente para obter frações lipossolúveis do material bruto. O material, após 24 horas de solubilização, foi centrifugado e levado ao HPLC.

O HPLC é um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, realizando separações e análises quantitativas de uma gama de compostos presentes em amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (Collins et al., 1993; Lindsay, 1992).

O HPLC fracionou o veneno em cinco picos, com elevado grau de pureza, em torno de 97 %. Em colaboração com o Parque de Desenvolvimento tecnológico do Estado do Ceará e Departamento de Química Orgânica da

UFC, foram realizados estudos com as frações através de espectroscopia no infravermelho, espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear. O resultado foi a determinação das estruturas de algumas frações. Três destas substâncias são bem descritas: o bufalin, o marinobufagin e o telocinobufagin.

Há um trabalho na literatura onde descreve que o bufalin (bufalina) provoca anestesia local na córnea de coelhos (Yoshida, 1976). Os relatos recentes com este bufadienolídeo reportam seu envolvimento na inibição da bomba  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  sobre a inibição da diferenciação celular, apoptose, angiogênese e indução de citocinas inflamatórias (Numazawa et al., 1994; Masuada et al., 1995; Watabe et al., 1996; Lee et al., 1997; Kurosawa et al., 2000).

O marinobufagin (marinobufagenina) é um cardiotônico, semelhante aos digitálicos, com ação inibitória na bomba  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ . Há muitas descrições em trabalhos, tais como ação vasoconstritora, na pré-eclâmpsia, efeito primário na redução do reforço do etilismo e marcador na insuficiência cardíaca severa (Fridman et al., 2002; Kashkin et al., 2002; Lopatin et al., 1999; Bagrov et al., 1995).

O telocinobufagin foi um outro bufadienolídeo isolado pela cromatografia realizada neste trabalho. Não há nenhum trabalho descrevendo as possíveis ações e o potencial terapêutico deste bufadienolídeo, exceto uma dissertação de mestrado (Patrocínio, 1997).

Estudos preliminares com o telocinobufagin foram realizados a partir de um contato acidental da córnea, após contato de um dos pesquisadores,

utilizando uma cromatografia líquida de alta eficiência para separação do material bruto do veneno das glândulas parotóides do *bufo paracnemis*. Testes experimentais de colocação do material puro na língua e mucosa labial de um pesquisador do trabalho, direcionando o estudo para um potencial efeito anestésico local, de tal forma que o telocinobufagin foi selecionado para realizar ensaios comparativa e quantitativa com a bupivacaína, um anestésico local clássico bastante utilizado na prática clínica.

O modelo do íleo isolado de cobaio, estimulado pela aplicação de um campo elétrico, de acordo com a descrição de Paton (1957), foi selecionada como um dos métodos para estudo, por envolver a participação de componentes neurais dos plexos nervosos presentes na parede do trato gastrointestinal. Diferentemente das fibras musculares esqueléticas, que são ativadas exclusivamente pelo sistema nervoso, o músculo liso pode contrair-se por sinais neurais, estimulação hormonal e eventos mecânicos, dentre outras maneiras (Guyton & Hall, 2002).

O controle neural das funções do trato gastrointestinal é realizado, principalmente, pelo sistema nervoso entérico. Este sistema age com o sistema nervoso autônomo (simpático e parassimpático) e nervos sensoriais terminais do epitélio luminal e parede intestinal (Lundgren et al., 1989).

O músculo liso do íleo apresenta ondas lentas e ondas em pontas. Estas são verdadeiros potenciais de ação; enquanto aquelas são alterações ondulantes no potencial de repouso da membrana (Bulbring, 1962). A contração do músculo liso do trato gastrointestinal decorre, dentre alguns fatores, da entrada de íons cálcio na fibra muscular. As ondas lentas estão

relacionadas à entrada de íons sódio, não causando a contração muscular. Durante os potenciais em ponta é que grande quantidade de íons cálcio penetra nas fibras, causando contração. A presença de potenciais em ponta talvez esteja relacionada à liberação de neurotransmissores excitatórios pelos neurônios intramurais durante o platô da despolarização provocada pela onda lenta (Sarna, 2002). É importante relatar que a abertura e o fechamento desses canais são muito mais lentos do que os dos canais rápidos de sódio das fibras nervosas, explicando a longa duração dos potenciais de ação neste músculo liso gastrointestinal, o íleo (Guyton & Hall, 2002).

O telocinobufagin bloqueou a contração de íleo de cobaio induzido por estímulo de campo elétrico, de maneira dependente de concentração, de  $10^{-4}$  M a  $10^{-3}$  M, sendo que esta última produziu bloqueio total da resposta. Esses dados sugerem que o bloqueio induzido pelo telocinobufagin pode ser causado por uma ação no sítio pré-juncional.

Para verificar se o efeito do telocinobufagin é exclusivamente pré-juncional, foram realizados alguns experimentos adicionando acetilcolina na solução extracelular, e foi avaliada sua resposta contrátil na ausência e na presença do bufadienolídeo. A acetilcolina é o principal mediador excitatório na estimulação da célula muscular lisa intestinal, uma vez que a atropina foi capaz de bloquear a resposta contrátil induzida pelo estímulo elétrico (dados não mostrados). O telocinobufagin causou bloqueio, na faixa de concentração entre  $10^{-6}$  M e  $10^{-4}$  M, sugerindo que o telocinobufagin também pode atuar em um mecanismo que envolve a ativação pós-juncional da célula muscular lisa, não excluindo, entretanto, a possibilidade de um possível efeito pré-juncional, como descrito anteriormente, ou mesmo de ambos.

Os valores das  $CI_{50}$  para o telocinobufagin no bloqueio das contrações induzidas pela acetilcolina e pela estimulação de campo elétrico foram calculados. A comparação estatística demonstrou que o telocinobufagin bloqueia as contrações induzidas pela adição exógena de acetilcolina, com uma potência cerca de uma ordem de magnitude maior que a necessária para inibir as contrações mediadas pela estimulação dos neurônios intramurais intestinais. Talvez a diferença de efeito para o telocinobufagin nos dois modelos estudados possa ser explicada pelo tempo de contato da preparação com o bufadienolídeo, que foi de 5 minutos entre a aplicação da substância e a estimulação da resposta contrátil. Como visto nos experimentos utilizando o registro do PAC, com 15 minutos de exposição, o telocinobufagin foi capaz de reduzir a amplitude do potencial de ação para cerca de apenas 65 % do controle, enquanto que após 30 minutos a resposta neural foi reduzida para aproximadamente 13 %. Entretanto, estudos adicionais serão necessários para elucidar com mais detalhes essas diferenças farmacológicas para o telocinobufagin.

Nos experimentos com estimulação por campo elétrico, o efeito inibitório do telocinobufagin apresentou pouca reversão, mesmo após um período de 8 h de lavagens subseqüentes da preparação, embora tenha havido uma pequena tendência de aumento da resposta contrátil, que não se mostrou significativa. Por outro lado, houve recuperação parcial, mas significativa, em torno de 69 % da resposta controle nos experimentos utilizando a adição da acetilcolina. Não há dados que expliquem essa diferença encontrada na recuperação dos experimentos, porém uma das possibilidades seria a de que o telocinobufagin pudesse bloquear irreversivelmente a atividade nervosa nos

neurônios intramurais. Entretanto, essa possibilidade parece pouco provável, uma vez que o bloqueio do telocinobufagin sobre o PAC em nervo ciático de rato foi totalmente revertido em menos de uma hora de lavagem da preparação.

Utilizada como controle positivo, a bupivacaína também bloqueou as contrações de íleo de cobaio induzidas por estímulo de campo elétrico, de maneira dependente de concentração, de  $10^{-5}$  M a  $10^{-3}$  M, sendo que esta última produziu bloqueio total da resposta contrátil. Por se tratar de uma substância classicamente conhecida como anestésica local, este bloqueio foi produzido, provavelmente, por uma ação deste anestésico local sítio pré-juncional.

Para verificar se o efeito da bupivacaína é exclusivamente pré-juncional, foram realizados alguns experimentos adicionando acetilcolina na solução extracelular. A bupivacaína, de modo semelhante, causou bloqueio da contração do íleo, de maneira dependente de concentração. Por conseguinte, este bloqueio sugere uma ação da bupivacaína também no sítio pós-juncional, diminuindo a contração que seria produzida pela acetilcolina. Os dados descritos no presente trabalho corroboram outros achados da literatura, nos quais há a demonstração de que os AL deprimem a contratilidade no intestino intacto e tiras de intestino isolado (Zipf & Dittmann, 1971).

É largamente aceito que os AL previnem reversivelmente a condução de impulsos elétricos em nervos, bloqueando os canais de sódio voltagem-dependentes (Carpenter & Mackey, 1996). Entretanto, suas propriedades parecem ser mais diversas. Ensaios de *binding* em canais de  $Ca^{++}$  revelaram a

existência de um sítio de ligação para os AL (Hirota et al., 1997). Funcionalmente, os AL podem deprimir diretamente a entrada de  $\text{Ca}^{++}$ . Por conseguinte, a anestesia pode também refletir as ações dos AL em alterar o influxo de  $\text{Ca}^{++}$  e sua liberação de estoques intracelulares (Sugyama & Muteki, 1994). A atividade anestésica local pode ocorrer devido a um deslocamento de cálcio de um sítio da membrana que controla a permeabilidade. Pois uma baixa concentração de íons cálcio intensifica a atividade anestésica local, e um aumento na concentração externa de íons cálcio antagoniza a ação de bloqueio dos AL (Carpenter & Mackey, 1996).

Wali et al. (1987) demonstraram que os AL, em íleo de rato com altas concentrações, bloqueiam os canais de  $\text{Ca}^{++}$  assim como os de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ; enquanto que em baixas concentrações têm pouco ou nenhum efeito nos canais de  $\text{Ca}^{++}$ . Baixas concentrações de bupivacaína, mesmo em outros tecidos como músculo papilar, deprimiram a contração principalmente devido ao bloqueio dos canais de  $\text{Na}^+$ , enquanto que altas concentrações bloquearam os canais de  $\text{Ca}^{++}$  (Shibuya et al., 1993).

O papel dos canais de  $\text{Ca}^{++}$ , subtipos L, N, T, P e Q, foi avaliado na anestesia infiltrativa produzida pela bupivacaína. Os resultados revelaram que o influxo de  $\text{Ca}^{++}$  através dos canais sensíveis a voltagem tipo L, em nociceptores da pele, parece ter um papel na modulação da duração e intensidade da anestesia com a bupivacaína (Smith et al., 2001).

Para avaliar se os efeitos encontrados para o telocinobufagin poderiam ser causados por alguma ação do solubilizante utilizado, foram realizados experimentos para avaliar a resposta contrátil do músculo liso intestinal na

presença de etanol. O etanol somente produziu inibição, na concentração de 1 M, sobre a resposta contrátil induzida pela estimulação por campo elétrico de segmentos isolados de íleo de cobaio. A concentração mais elevada para solubilizar o telocinobufagin foi 0,01 M de etanol, estando aquém da concentração que produziu alteração significativa. Nas contrações induzidas pela acetilcolina em íleo isolado de cobaio, o etanol causou inibição significativa nas concentrações de  $10^{-1}$  M e de 1 M. De forma idêntica, o etanol foi utilizado em concentração inferior àquelas que causaram alterações. Assim, é improvável que o etanol interfira na inibição produzida pelo do telocinobufagin, verificadas em íleo isolado de cobaio.

Os sinais nervosos são transmitidos por potenciais de ação, que são alterações rápidas no potencial de membrana celular do estado de repouso ou despolarizado. A amplitude, a área e a velocidade de condução do potencial de ação composto (PAC) são positivamente correlacionadas com o transporte de sódio e vários íons através de canais presentes na membrana plasmática neuronal. Além do mais, a amplitude do potencial de ação do nervo pode ser usada para estimar o número de fibras nervosas ativadas (Buyukakilli et al., 2003).

O PAC é a soma algébrica de muitos potenciais de ação “tudo ou nada” individuais, em um elevado número de axônios de um grande nervo composto. O PAC não se assemelha a um potencial de ação normal, visto que reflete medidas de alterações de voltagem registradas extracelularmente, e não monitoriza o que ocorre dentro do nervo (Khodorov et al., 1976).

O telocinobufagin, na concentração de 1 mM no nervo ciático de rato, produziu um bloqueio parcial após 15 min de adicionada ao banho e bloqueio quase total após 30 min. Depois dos 30 min de contato com o nervo, a solução com o bufadienolídeo foi trocada pela solução nutritiva, a Locke modificada. Então foi aferido que no tempo 45 e 60 min, da administração da droga, houve alguma recuperação e, diferente da bupivacaína, em 75 min houve uma recuperação quase total em relação ao controle.

De forma símile, pode-se dizer que também não há relatos do telocinobufagin, em relação ao estudo no potencial de ação composto. Todavia, o telocinobufagin é uma estrutura esteroideal, totalmente diferente dos anestésicos clássicos, com exceção da benzocaína. A benzocaína se apresenta somente na forma neutra, não ionizável, sendo capaz de produzir anestesia local e, de modo semelhante ao telocinobufagin, é bastante lipossolúvel (Suwalsky et al., 2004; Kutchai, 2000).

Uma descrição metodológica da benzocaína, na atividade elétrica do ureter de cobaio, demonstrou um bloqueio parcial após 5 min e bloqueio total após 10 min de sua administração. O efeito da benzocaína foi revertido de modo rápido e fácil (Burdyga & Magura, 1986).

Independente do mecanismo de ação molecular, pode-se inferir que o telocinobufagin, em preparação de nervo isolado de rato, produziu um efeito anestésico local e que, este efeito, foi seguido por uma propriedade extremamente importante, a reversibilidade, sugerindo não possuir efeito neurotóxico. Além disso, a própria reversibilidade indica que a diminuição dos parâmetros do PAC foi produzida pelo telocinobufagin e não por um

decaimento natural da excitabilidade neural. Essa observação foi confirmada com os experimentos onde o PAC foi registrado seguidamente por um período de mais de duas horas, tempo maior que o necessário para a realização dos experimentos, sem alteração significativa de seus parâmetros. Esses dados estão de acordo com outros descritos na literatura em relação à viabilidade da preparação (Theophilidis e Pavlidou, 1993), reforçando ainda mais que os efeitos encontrados nos registros foram provocados pelo telocinobufagin.

A bupivacaína, na concentração de 1 mM, causou um bloqueio parcial após 15 min de adicionada ao banho e bloqueio quase total após 30 min no nervo ciático de rato. Depois dos 30 min de contato com o nervo, a solução com o anestésico local foi trocada pela solução nutritiva, a Locke modificada. Foi então verificado que no tempo 45 min, da administração da droga, houve alguma recuperação, assim como em 60 min e 75 min. Entretanto, a recuperação mesmo no tempo 75 min não foi completa, em torno de 30 %. Era de se esperar tal ação, pois a bupivacaína é um anestésico local potente e de longa duração. A bupivacaína, em nervo ciático isolado de rã, apresenta uma potência relativa de 16 vezes maior que a procaína e 4 vezes maior que a lidocaína (Covino & Vassalo, 1985).

A literatura reporta alguns trabalhos de ação dos AL no PAC. A lidocaína 5 %, durante somente 15 minutos, causou bloqueio irreversível após 3 h de lavagem ou por toda a noite. Sua concentração menor, lidocaína 1,5 %, por 15 minutos no banho, propiciou uma recuperação em torno de 67 % após 3 h de lavagem (Lambert et al., 1994).

A bupivacaína 0,75 % (23 mM), por sua vez, usada no mesmo protocolo de 15 min, produziu um bloqueio total com recuperação da resposta em torno de 76 % da amplitude registrada no controle após 3 h de lavagem (Lambert et al., 1994).

A bupivacaína 1,3 % (40 mM), adicionada a um meio de superperfusão por 20 min, diminuiu a amplitude pico a pico em torno de 46 % em relação ao controle, atingindo uma recuperação de  $47 \pm 27$  após 3 h de lavagem contínua (Buyukakilli, 2003). Comparados com os resultados deste trabalho, pode-se perceber que mesmo após 3 de lavagem, a bupivacaína não completou sua recuperação, embora utilizada em um tempo menor, 20 min, mas com concentração maior, 40 mM.

Todos os AL, em uso na prática clínica, podem causar danos às fibras nervosas (Kyttä et al., 1986) quando usados em altas concentrações; contudo, os AL, usados em concentrações adequadas na prática, são geralmente seguros para os nervos periféricos (Miller & Katzung, 2003; Liu & Hodgson, 2001).

O Dimetilsulfóxido (DMSO) foi o solubilizante do telocinobufagin nos experimentos que avaliaram o efeito na amplitude pico-a-pico e velocidade de condução do PAC. Os resultados do DMSO não interferiram na ação bloqueadora do PAC na concentração utilizada neste trabalho (dados não mostrados). O DMSO bloqueia significativamente o PAC a partir de concentrações de 20 % (Larsen et al. 1996). Este trabalho utilizou o DMSO na concentração em torno de 15 %.

Para avaliar estudos de cardiotoxicidade, uma gama de preparações em diversas espécies tem sido utilizada, desde tiras musculares de átrios ou ventrículos até o átrio esquerdo inteiro nos estudos da atividade inotrópica, positiva ou negativa. Para avaliar a frequência cardíaca é utilizado o átrio direito, fonte do marcapasso, ou coração inteiro. Denomina-se bradicardia, uma redução da frequência cardíaca, enquanto uma elevação se chama taquicardia (Gilani et al., 1999; Cinel & Gür, 2000; Wilson & Bolter, 2002).

O inotropismo é definido como a força e a velocidade de contração do músculo cardíaco. Drogas vasoativas podem ser descritas como inotrópicas positivas ou negativas. A dobutamina e o isoproterenol são exemplos de drogas inotrópicas positivas, enquanto os bloqueadores dos canais de cálcio, inotrópicos negativos (Lacombe et al., 1991; Erdmann, 1997). O estudo do inotropismo foi utilizado como um método de verificar comparativamente a bupivacaína e o telocinobufagin; pois se sabe que os AL, quando acidentalmente penetram a circulação sistêmica na prática clínica, produzem arritmias que podem evoluir para parada cardíaca e êxito letal.

A atividade inotrópica foi avaliada, neste trabalho, a partir de uma estimulação do átrio esquerdo de rato com o telocinobufagin, a bupivacaína e o etanol.

O telocinobufagin, nas concentrações de  $10^{-7}$  M a  $10^{-4}$  M, não causou nenhuma alteração na contratilidade do átrio esquerdo. Poder-se-ia crer que uma concentração 10 vezes maior, no caso  $10^{-3}$  M, alteraria a resposta. No entanto, foi observado que o telocinobufagin, na concentração de  $10^{-3}$  M, também não evidenciou nenhuma alteração na resposta inotrópica durante 12

minutos, ao invés dos 5 minutos usados no protocolo experimental. Assim, pode-se inferir que o telocinobufagin é, no mínimo, dez vezes menos cardiotoxico que a bupivacaína. A concentração do telocinobufagin  $10^{-2}$  M não foi utilizada, visto que o etanol poderia alterar sinergisticamente com o bufadienolídeo.

Por outro lado, a bupivacaína, neste trabalho, diminuiu a atividade inotrópica na concentração de  $3 \times 10^{-5}$  M e bloqueou completamente esta atividade na concentração de  $10^{-4}$  M, demonstrando um efeito deletério na função de contração cardíaca.

Em 1979, Albright publicou um editorial alarmante que associava os AL de longa duração, bupivacaína e etidocaína, com parada cardíaca durante anestesia regional. Posteriormente, a concentração de bupivacaína foi reduzida para minimizar essa má-função da bupivacaína. Esses eventos produziram um ímpeto para o desenvolvimento de novas drogas anestésicas locais (Albright, 1979; Heath, 1983; Marx, 1984; McClure, 1996).

Os AL, como descrito anteriormente, bloqueiam não somente os canais de sódio voltagem dependentes, mas também os canais de cálcio e potássio. Um trabalho, usando a mesma metodologia deste, utilizou a bupivacaína, administrando-a cumulativamente no átrio esquerdo para avaliar o efeito inotrópico. A bupivacaína produziu um efeito inotrópico negativo na concentração de  $10^{-4}$  M (Herzig et al., 1994).

Outros manuscritos corroboram com o resultado verificado neste trabalho, onde a bupivacaína apresenta efeito inotrópico negativo no átrio

esquerdo com a concentração de  $10^{-4}$  M (Simonetti et al., 1998; Mazoit et al., 1993).

Um artigo recente relata que uma redução dose-dependente na contratilidade ocorre com intoxicação dos AL. Foram utilizados parâmetros para aferir a depressão na contração: redução na pressão arterial sistêmica, elevação na pressão término-diastólica do ventrículo esquerdo, redução no débito cardíaco, volume sistólico e fração de ejeção. Foi concluído que a extensão da depressão contrátil estava correlacionada com a potência bloqueadora de nervos; onde a bupivacaína, mais potente, reduz a contratilidade em menores doses e concentrações do que os anestésicos menos potentes, por exemplo, a lidocaína (Groban, 2003).

Há relatos que demonstram atividade inibitória dos AL na bomba de  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase. Contudo, os AL são mais potentes bloqueadores dos canais de sódio do que como inibidores da  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase (Kutchai et al., 2000).

Há uma vasta descrição da atividade bloqueadora de alguns bufadienolídeos na bomba  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase. O marinobufagin e o bufalin são citados como possuidores dessa atividade inibidora.

Os esteróides cardiotônicos compreendem um grupo de compostos que se ligam a uma superfície extracelular da importante proteína de transporte iônica celular, a bomba  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase. Membros deste grupo incluem fármacos derivados de plantas tais como drogas glicosídeos digitálicos e monoglicosídeo de planta (ouabaína) e esteróides cardiotônicos

aglicona derivados de vertebrados, tais como bufalin e marinobufagenin. Estes esteróides cardiotônicos derivados de vertebrados são conhecidos como venenos de anfíbios; entretanto, há evidências crescentes da sua presença em mamíferos (Dmitrieva et al., 2000; Dmitrieva & Doris, 2002).

Os bufadienolídeos estão presentes na circulação de mamíferos e devem estar envolvidos na regulação fisiológica da pressão sanguínea e na gênese da hipertensão (Oberfrank et al., 1991). O marinobufagenin por sua ação na bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  tem potente atividade vasoconstritora (Bagrov et al., 1995). A inibição da bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  por ouabaína e marinobufagenin ocorre em diferentes subunidades alfa (Fedorova & Bagrov, 1997).

O *Ch'an su* é preparado pela medicina chinesa tradicional para tratar arritmias e outras desordens cardíacas (Datta & Dasgupta, 2002).

É clássico o uso dos digitálicos no tratamento da Insuficiência Cardíaca Congestiva (ICC). Todos os digitálicos são potentes e inibidores altamente seletivos do transporte ativo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  através da membrana celular, por ligação em sítio específico na subunidade  $\alpha$  da bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  (Smith, 1988; Kelly & Smith, 1992; Cohn, 1996). A inibição da bomba leva a um aumento da concentração intracelular de sódio, seguida por uma redução relativa da expulsão de cálcio da célula pelo trocador de sódio-cálcio, aumentando os níveis de cálcio e um nítido aumento da contratilidade cardíaca (Miller & Katzung, 2003).

Os bufadienolídeos são conhecidos como substâncias que inibem a bomba  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ , contudo não há nenhum trabalho reportando a ação do telocinobufagin na atividade inibidora da bomba  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ . Pode-se, entretanto, concluir que o telocinobufagin não produz efeito negativo na função de contração cardíaca, determinada pela preparação de átrio esquerdo de rato, sendo um fator extremamente positivo em relação à toxicidade no inotropismo cardíaco, causado pelos AL clássicos.

O solvente utilizado para solubilizar o telocinobufagin foi o etanol. O álcool etílico somente causou efeito inotrópico negativo na concentração de 1 M; não afetando, portanto, os resultados no ensaio da bufogenina estudado neste trabalho.

A atividade cronotrópica foi avaliada, neste trabalho, deixando o átrio direito bater espontaneamente, com a bupivacaína, o telocinobufagin e o etanol.

Neste trabalho, a bupivacaína bloqueou totalmente a atividade cronotrópica, aferida no átrio direito de rato, nas concentrações  $3 \times 10^{-5}$  M e  $10^{-4}$  M, demonstrando um efeito deletério na frequência de batimentos cardíacos.

Embora a bupivacaína, na concentração de  $3 \times 10^{-5}$  M, tenha produzido parada dos batimentos atriais direito de ratos somente em 15 % dos casos; na concentração de  $10^{-4}$  M, houve parada atrial em 100 % dos átrios direitos utilizados (Simonetti et al., 1998). Utilizando a preparação de Langendorff, foram verificados o aparecimento de bradicardia, prolongamento do intervalo

P-R e alargamento do complexo QRS em concentrações baixas como  $0,5 \times 10^{-6}$  M a  $5 \times 10^{-6}$  M (Zapata-Sudo, 2001).

A bupivacaína tem uma grande vantagem sobre outros AL devido à sua longa anestesia sensorial; porém sua alta afinidade pelos canais de  $\text{Na}^+$  e canais de  $\text{Ca}^{++}$  tipo L nas células cardíacas a torna bastante cardiotoxicidade, tanto na depressão da contratilidade quanto no bloqueio da condução cardíaca (Zapata-Sudo, 2001).

Em conformidade com estudos *in vitro*, estudos eletrofisiológicos em animais intactos mostraram um prolongamento dose-dependente da condução cardíaca com depressão atividade do nó sinoatrial, bradicardia, bloqueio parcial e completo atrioventricular com o uso da bupivacaína (Block & Covino, 1981; Komai & Rusy, 1981; Tans & Poortvliet, 1984; Heavner, 2002; Groban, 2003).

A atividade cronotrópica do átrio esquerdo de rato foi também avaliada pelo telocinobufagin. Nas concentrações de  $10^{-7}$  M a  $10^{-4}$  M, ele não causou nenhuma alteração na frequência do átrio direito, de modo similar ao estudo do inotropismo. Destarte, pode-se dizer que o telocinobufagin não apresentou atividade cronotrópica negativa, dessemelhante a bupivacaína que produziu ação cronotrópica negativa.

As bufogeninas e as bufotoxinas têm propriedades cardioaceleradoras, aumentando a força dos batimentos cardíacos e reduzindo a frequência cardíaca. As secreções da pele de sapos, chamadas *Ch'an su* e *Sen so*, foram

usadas na medicina Oriental há 8000 anos e foram introduzidas na Europa em 1600, sendo substituídas pelos digitálicos 200 anos depois (Clarke, 1997).

A partir de todos os dados observados e discutidos sobre as ações da função de contração e frequência cardíacas da bupivacaína e do telocinobufagin, pode-se inferir que o telocinobufagin apresenta uma enorme vantagem sobre a bupivacaína, no que se refere aos efeitos cardiotoxícos, visto que o telocinobufagin não produz efeitos inotrópico e cronotrópico negativos. Em resumo, o telocinobufagin possui efeito anestésico em nervo ciático isolado de rato sem interferir com a contratilidade atrial, quando comparado com a bupivacaína, que na mesma faixa de concentração interfere nos dois parâmetros. Essa observação é importante para ressaltar uma importante característica do telocinobufagin numa potencial utilização terapêutica.

Um grande número de neurotoxinas lipossolúveis, tais como batracotoxina, veratridine, aconitina, grayanotoxinas, inseticidas piretróides, brevetoxinas e ciguatoxina, atua em canais de sódio voltagem-dependentes para ações primárias. Elas promovem a abertura dos canais, induzindo despolarização da potencial de membrana de repouso, e assim drasticamente afetam a excitabilidade do nervo, músculo e coração (Wang & Wang, 2003).

As neurotoxinas que bloqueiam os canais de sódio com alta afinidade podem causar convulsões, paralisia, insuficiência respiratória e morte. Para terem potencial de uso na clínica, os bloqueadores de canais de sódio devem bloquear os canais de sódio em maneira prontamente reversível, como os AL clássicos. Todavia, os AL podem também causar convulsões e parada cardíaca

durante anestesia local, quando os AL são acidentalmente injetados na circulação sistêmica (Clarkson & Hondeghem, 1985).

As neurotoxinas possuem sítio de ação no segmento S6 de membrana dos canais de sódio, agindo no mesmo segmento que os AL, anticonvulsivantes, antiarrítmicos e anti-depressivos (Cestele & Catterall, 2000; Nau et al., 2000).

Novas drogas com atividade anestésica local de longa duração serão benéficas para o tratamento de dores neuropáticas ou de câncer (Wang & Strichartz; 2002). O Butamben, um anestésico local lipofílico da classe éster, produz um bloqueio diferencial de longa duração, que tem sido utilizado no tratamento do câncer (Shulman, 1987; Korsten et al., 1991; Shulman et al., 1998; McCarthy et al., 2002).

A veratridine é uma neurotoxina, um alcalóide esteroidal, que se liga preferencialmente aos canais de sódio, inibindo as fibras do tipo C em maneira dependente de concentração. A veratridine pode produzir uma nova classe de AL que somente bloquearia as vias nociceptivas, sem ações sobre outras fibras nervosas (Schneider, 1991; Carpenter & Mackey, 1996; Smith & Lindsay, 2003).

O grupo carbonila ( $=C=O=$ ) desempenha um papel importante na atividade anestésica. A existência de uma densidade eletrônica elevada no oxigênio da carbonila resulta em aumento da potência anestésica (Alves & Guanais, 2002).

O telocinobufagin e algumas neurotoxinas possuem grupamento carbonila. Este bufadienolídeo tem uma estrutura esteroidal com elevada lipossolubilidade, semelhante a outras neurotoxinas, podendo ter uma duração de sua atividade e potência elevadas.

O telocinobufagin é um bufadienolídeo, oriundo das glândulas parotóides do *Bufo paracnemis*, com ação bloqueadora da condução nervosa por ação provável nos canais de sódio, conclusão oriunda dos resultados obtidos pela inibição da amplitude pico-a-pico e velocidade de condução do potencial de ação composto em nervo ciático isolado de rato. Outra conclusão de inextinguível importância em um potencial uso na aplicação clínica é seu efeito anestésico local com a propriedade de reversibilidade, condição *sine qua non* para o uso de quaisquer classes de AL.

Finalmente, os AL em uso corrente produzem um temível quadro de cardiotoxicidade, que pode ocorrer desde arritmias a uma parada cardíaca refratária aos tratamentos usuais; contudo, o telocinobufagin, em doses equimolares à bupivacaína, não produz ações inotrópica e cronotrópica negativas, sendo um precioso atributo com elevado potencial para ser utilizado na terapêutica clínica.

## 6 - CONCLUSÕES

- √ O telocinobufagin pode ser obtido por cromatografia líquida de alta eficiência com elevado grau de pureza.
- √ O telocinobufagin é capaz de bloquear respostas contráteis mediadas pela liberação de neurotransmissores por neurônios intramurais, bem como bloqueia as contrações induzidas pela acetilcolina aplicada exogenamente no músculo liso isolado de cobaio.
- √ O telocinobufagin pode atuar tanto em sítios pré-juncionais como em pós-juncionais, ou em ambos, em preparações isoladas de íleo de cobaio.
- √ O telocinobufagin diminui reversivelmente a amplitude pico-a-pico e a velocidade de condução do potencial de ação composto em nervo ciático de rato, sugerindo não possuir efeito neurotóxico.
- √ O telocinobufagin possui propriedades anestésicas locais que, na mesma base molar, são semelhantes às da bupivacaína, um anestésico local clássico.

- √ O telocinobufagin apresenta vantagens em relação à bupivacaína, pois não causou sinais de toxicidade cardíaca em preparações de átrio isolado de rato.
  
- √ Este estudo abre perspectivas para pesquisas de novas estruturas com atividade anestésica local com potencial uso terapêutico nas vias nociceptivas.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHAR, S.; KUNDU, S. Principles of office anesthesia: part I. Infiltrative anesthesia. **Am. Fam. Physician.**, v. 66, p.91-94, 2002.

ALBRIGHT, G.A. Cardiac arrest following regional anesthesia with etidocaine or bupivacaine. **Anesthesiology**, v. 51, p.285-7, 1979.

ALVES, T.C.A.; GUANAIS, O. Anestésicos Locais. In Penildo Silva. **Farmacologia**. 6 edição. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 474-491, 2002.

BAGROV, A.Y.; DMITRIEVA, R.I.; FEDOROVA, O.V.; KAZAKOV, G.P.; ROUKOYATKINA, N.I.; SHPEN, V.M. Endogenous marinobufagenin-like immunoreactive substance. A possible endogenous Na, K-ATPase inhibitor with vasoconstrictor activity. **Am. J. Hypertens.**, v. 9, p.982-990, 1996.

BAGROV, A.Y.; ROUKOYATKINA, N.I.; PINAEV, A.G.; DMITRIEVA, R.I.; FEDOROVA, O.V. Effects of two endogenous Na<sup>+</sup>,K(+)-ATPase inhibitors, marinobufagenin and ouabain, on isolated rat aorta. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 274, p.151-8, 1995.

BERDE, C.B.; STRICHARTZ, G.R. Local anesthetics. In Miller, R.D. **Anesthesia**. 4 edicion. Ed. Churchill Livingstone. p. 491-521, 2002.

BERGER, H.; KREIL, G. The constituents of storage granules in the dermal glands of *Xenopus laevis*. Structure of a basic polypeptide deduced from cloned cDNA. **FEBS Lett.**, v. 249, p. 293-6, 1989.

BLOCK, A.; COVINO, B.G. Effect of local anesthetic agents on cardiac conduction and contractility. **Reg. Anesth. Pain. Med.**, v. 6, p. 55-61, 1981.

BULBRING, E. Electrical activity in intestinal smooth muscle. **Physiol. Rev.** v. 42, p. 160–178, 1962.

BURDYGA, T.H.V.; MAGURA, I.S. The effects of local anaesthetics on the electrical and mechanical activity of the guinea-pig ureter. **Br. J. Pharmacol.**, v. 88, p. 523-530, 1986.

BUTTERWORTH, J.F.; STRICHARTZ, G.R. Molecular mechanisms of local anesthesia: a review. **Anesthesiology**, v. 72, p.711-734, 1990.

BUYUKAKILLI, B.; COMELEKOGLU, U.; TATAROGLU, C.; KANIK, A. Reversible conduction block in isolated frog sciatic nerve by high concentration of bupivacaine. **Pharmacol. Res.**, v. 47, p. 235-241, 2003.

CALATAYUD, J.; GONZALEZ, A. History of the development and evolution of local anesthesia since the coca leaf. **Anesthesiology**, v. 98, p. 1503-1508, 2003.

CALDWELL, J.P. The evolutionary of myrmecophagy and its correlates in poison frogs. **J. Zoolg.**, v. 240, p. 75-101, 1996.

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.; MACKEY, D.C. Local anesthetics. In Barash, P.G.; Cullen, B.F.; Stoelting, R.K. (eds.). **Clinical Anesthesia**. 3 edition. Philadelphia: Lippincott, p. 509-544, 1996.

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.; LESENEY, A.M., COHEN, P. A peptide-hormone-inactivating endopeptidase in *Xenopus laevis* skin secretion. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 89, p. 84-88, 1992.

CATTERALL, W.A. Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. **Physiol. Rev.**, v. 72, p. 15-48, 1992.

CATTERALL, W.A. Molecular mechanisms of gating and drug block of sodium channels. **Novartis. Found. Symp.**, v. 241, p. 206-18, 2002.

CATTERALL, W.A.; MACKIE, K. Local Anesthetics. In Hardman J.G. & Limbird, L.E. **Goodman & Gilman The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 10 edition. McGraw-Hill, p. 367-384, 2001.

CESTELE, S.; CATTERALL, W.A. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. **Biochimie.**, v. 82, p. 883-892, 2000.

CEVIKBAS, A. Antibacterial activity in the skin secretion of the frog *Rana ridibunda*. **Toxicon.**, v. 16, p.195-197, 1978.

CINEL, I.; GUR, S. Direct inotropic effects of propofol and adenosine on rat atrial muscle: possible mechanisms. **Pharmacol. Res.**, v. 42, p. 123-128, 2000.

CLARKE, B.T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. **Biol. Rev.**, v. 72, p. 365-379, 1997.

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.

COHN, J.N. The management of chronic heart failure. **N. Engl. J. Med.**, v. 335, p. 490-498, 1996.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 5 edição. Ed. Unicamp, p. 279, 1993.

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

CONCEPCION, M.; COVINO, B.G. Rational use of local anaesthetics. **Drugs.**, v. 27, p. 256-270, 1984.

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

COX, B.; DURIEUX, M.E.; MARCUS, M.A. Toxicity of local anaesthetics. **Best. Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.**, v. 17, p. 111-136, 2003.

DALY, J.W. Alkaloids from frog skins: selective probes for ion channels and nicotinic receptors. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 28, p. 1033-1042, 1995.

DALY, J.W. The chemistry of poisons in amphibian skin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 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. **Toxicol.**, v. 25, p. 1023-1095, 1987.

DATTA, P.; DASGUPTA, A. Effect of Chinese medicines Chan Su and Danshen on EMIT 2000 and Randox digoxin immunoassays: wide variation in digoxin-like immunoreactivity and magnitude of interference in digoxin measurement by different brands of the same product. **Ther. Drug. Monit.**, v. 24, p.637-44, 2002.

DMITRIEVA, R.I.; BAGROV, A.Y.; LALLI, E.; SASSONE-CORSI, P.; STOCCO, D.M.; DORIS, P.A. Mammalian bufadienolide is synthesized from cholesterol in the adrenal cortex by a pathway that is independent of cholesterol side-chain cleavage. **Hypertension**, v.36, p. 442-448, 2000.

DMITRIEVA, R.I.; DORIS, P.A. Cardiotoxic steroids: potential endogenous sodium pump ligands with diverse function. **Exp. Biol. Med.**, v. 227, p. 561-569, 2002.

DUELLEMAN, W.E. Reproductive strategies of frogs. **Sci. Am.**, v. 267, p. 80-87, 1992.

ERDMANN, E. The effect of positive inotropes on the failing human myocardium. **Cardiology**, v. 88, p. 7-11, 1997.

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

FEDOROVA, O.V.; BAGROV, A.Y. Inhibition of Na/K ATPase from rat aorta by two Na/K pump inhibitors, ouabain and marinobufagenin: evidence of interaction with different alpha-subunit isoforms. **Am. J. Hypertens.**, v. 10, p.929-935, 1997.

FINK BR. Leaves and needles: the introduction of surgical local anesthesia. **Anesthesiology**, v. 63, p. 77-83, 1985.

FLUCHER, B.E.; LENGELACHNER-BACHINGER, C.; POHLHAMMER, K.; ADAM, H.; MOLLAY, C. Skin peptides in *Xenopus laevis*: morphological requirements for precursor processing in developing and regenerating granular skin glands. **J. Cell. Biol.**, v. 103, p. 2299-2309, 1986.

FRIDMAN, A.I.; MATVEEV, S.A.; AGALAKOVA, N.I.; FEDOROVA, O.V.; LAKATTA, E.G.; BAGROV, A.Y. Marinobufagenin, an endogenous ligand of alpha-1 sodium pump, is a marker of congestive heart failure severity. **J. Hypertens.**, v. 20, p. 1189-1194, 2002.

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

GILANI, A.H.; JANBAZ, K.H.; AZIZ, N.; HERZIG, M.J.; KAZMI, M.M.; CHOUDHARY, M.I.; HERZIG, J.W. Possible mechanism of selective

inotropic activity of the n-butanolic fraction from *Berberis aristata* fruit. **Gen. Pharmacol.**, v. 33, p. 407-414, 1999.

GIOVANNI, M.G.; POULTER, L.; GISSON, B.W.; WILLIAMS, D.H. Biosynthesis and degradation of peptides derived from *Xenopus laevis* prohormones. **Biochem. J.**, v. 243, p. 113-120, 1987.

GISSEN, A.J.; COVINO, B.G.; GREGUS, J. Differential sensitivities of mammalian nerve fibers to local anesthetic agents. **Anesthesiology**, v.53, p. 467-474, 1980.

GISSEN, A.J.; COVINO, B.G.; GREGUS, J. Differential sensitivity of fast and slow fibers in mammalian nerve. II. Margin of safety for nerve transmission. **Anesth. Analg.**, v. 61, p. 561-569, 1982.

GMACHL, M.; BERGER, H.; THALHAMMER, J.; KREIL, G. Dermal glands of *Xenopus laevis* contain a polypeptide with a highly repetitive amino acid sequence. **FEBS Lett.**, v. 260, p. 145-148, 1990.

GREENE, N.M. A consideration of factors in the discovery of anesthesia and their effects on its development. **Anesthesiology**, v.35, p.515-522, 1971.

GROBAN L. Central nervous system and cardiac effects from long-acting amide local anesthetic toxicity in the intact animal model. **Reg. Anesth. Pain. Med.**, v. 28, p. 3-11, 2003.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 10 edição, Ed. Guanabara Koogan, p. 973, 2002.

HEATH, M.L. Bupivacaine toxicity and Bier blocks. **Anesthesiology**, v. 59, p. 481-483, 1983.

HEAVNER, J.E. Cardiac toxicity of local anesthetics in the intact isolated heart model: a review. **Reg. Anesth. Pain. Med.**, v. 27, p. 545-555, 2002.

HERZIG, S.; RUHNKE, L.; WULF, H. Functional interaction between local anaesthetics and calcium antagonists in guineapig myocardium: 1. Cardiodepressant effects in isolated organs. **Br. J. Anaesth.**, v. 73, p. 357-363, 1994.

HIROTA, K.; BROWNE, T.; APPADU, B.L.; LAMBERT, D.G. Do local anaesthetics interact with dihydropyridine binding sites on neuronal L-type Ca<sup>2+</sup> channels? **Br. J. Anaesth.**, v.78, p.185-188, 1997.

HOLMDAHL, M.H. Xylocain (lidocaine, lignocaine), its discovery and Gordh's contribution to its clinical use. **Acta. Anaesthesiol. Scand.**, v. 113, p. 8-12, 1998.

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. 1023-1026, 1992.

KARALLIEDDE, L. Animal toxins. **Br. J. Anaesth.**, v. 74, p. 319-327, 1995.

KASHKIN, V.A.; BAGROV, A.Y.; FEDOROVA, O.V.; BAGROV, Y.Y.; AGALAKOVA, N.I.; PATKINA, N.A.; ZVARTAU, E.E. Marinobufagenin (MBG) suppression of ethanol-seeking behavior is associated with inhibition of brain cortex Na/K-ATPase in mice. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, v.12, p.217-223, 2002.

KELLY, R.A.; SMITH, T.W. Recognition and management of digitalis toxicity. **Am. J. Cardiol.**, v. 69, p. 108-118, 1992.

KHODOROV, B.I.; VORNOVITSKII, E.G.; IGNATEVA, V.B.; MUKUMOV, M.R.; KITAIGORODSKAIA, G.M. Mechanism of excitation and contraction uncoupling in frog and guinea pig myocardial fibers during block of slow sodium-calcium channels by compound D-600. **Biofizika**, v. 21, p. 1024-1030, 1976.

KINGSLEY, R.E. **Manual de neurociência**. 2 edição Ed. Guanabara Koogan, 496, 2001.

KOHANE, D.S.; LU, N.T.; GOKGOL-KLINE, A.C.; SHUBINA, M.; KUANG, Y.; HALL, S.; STRICHARTZ, G.R.; BERDE, C.B. The local anesthetic properties and toxicity of saxitoxin homologues for rat sciatic nerve block in vivo. **Reg. Anesth. Pain. Med.**, v.25, p. 52-59, 2000.

KOMAI, H.; RUSY, B.F. Effects of bupivacaine and lidocaine on AV conduction in the isolated rat heart: modification by hyperkalemia. **Anesthesiology**, v. 55, p. 281-285, 1981.

KORSTEN, H.H.; ACKERMAN, E.W.; GROULS, R.J.; VAN ZUNDERT, A.A.; BOON, W.F.; BAL, F.; CROMMELIN, M.A.; RIBOT, J.G.; HOEFSLOOT, F.; SLOOFF, J.L. Long-lasting epidural sensory blockade by n-butyl-p-aminobenzoate in the terminally ill intractable cancer pain patient. **Anesthesiology**, v. 75, p. 950-960, 1991.

KUROSAWA, M.; NUMAZAWA, S.; TANI, Y.; YOSHIDA, T. ERK signaling mediates the induction of inflammatory cytokines by bufalin in human monocytic cells. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v.278, p.500-508, 2000.

KUTCHAI, H.; GEDDIS, L.M.; FARLEY, R.A. Effects of local anaesthetics on the activity of the Na,K-ATPase of canine renal medulla. **Pharmacol. Res.**, v. 41, p. 1-7, 2000.

KYTTÄ, J; HEINONEN, E; ROSEMBERG, P.H; WAHLSTRÖM, T; GRIPENBERG, J; HUOPANIEMI, T. Effects of repeated bupivacaine administration on sciatic nerve and surrounding muscle tissue in rats. **Acta. Anaesthesiol. Scand.**, v. 30, p. 625-629, 1986.

LACOMBE, P.; BLAISE, G.; HOLLMANN, C.; TANGUAY, M.; LOULMET, D. Isoproterenol corrects the effects of bupivacaine on the electrophysiologic properties of the isolated rabbit heart. **Anesth. Analg.**, v. 72, p. 70-4, 1991.

LAMBERT, L.A.; LAMBERT, D.H.; STRICHARTZ, G.R. Irreversible conduction block in isolated nerve by high concentrations of local anesthetics. **Anesthesiology**, v.80, p.1082-1093, 1994.

LARSEN, J.; GASSER, K.; HAHIN, R. An analysis of dimethylsulfoxide-induced action potential block: a comparative study of DMSO and other aliphatic water soluble solutes. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 140, p. 296-314, 1996.

LAZARUS, L.H.; ATTILA, M. The toad, ugly and venomous, wears yet a precious jewel in his skin. **Prog. Neurobiol.**, v .41, p.473-507, 1993.

LAZARUS, L.H.; BRYANT, S.D.; ATTILA, M.; SALVADORI, S. Frog skin opioid peptides: a case for environmental mimicry. **Environ. Health. Perspect.**, v.102, p.648-654, 1994.

LEE, D.Y.; YASUDA, M.; YAMAMOTO, T.; YOSHIDA, T.; KUROIWA, Y. Bufalin inhibits endothelial cell proliferation and angiogenesis in vitro. **Life. Sci.**, v.60, p. 127-134, 1997.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios: Conceitos fundamentais de neurociência**. Ed. Atheneu, p. 698, 2001.

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

LIU, S.S.; HODGSON, P.S. Local Anesthetics. In Barash, P.G.; Cullen, B.F.; Stoelting, R.K. **Clinical Anesthesia**. 4 edition, Ed. Lippincott- Raven, p. 349-392, 2001.

LOPATIN, D.A.; AILAMAZIAN, E.K.; DMITRIEVA, R.I.; SHPEN, V.M.; FEDOROVA, O.V.; DORIS, P.A.; BAGROV, A.Y. Circulating bufodienolide and cardenolide sodium pump inhibitors in preeclampsia. **J. Hypertens.**, v.17, p.1179-1187, 1999.

LOPES, S.G.B.C. **Bio**. Ed. Saraiva, 4 edição, vol.2, p. 492, 1999.

LUNDGREN, O.; SVANVIK, J.; JIVEGARD, L. Enteric nervous system. I. Physiology and pathophysiology of the intestinal tract. **Dig. Dis. Sci.**, v. 34, p. 264-283, 1989.

MARCONDES, A.C.; LAMMOGLIA, D.A. **Zoologia e botânica**. Ed. Atual, São Paulo 1991.

MARSCHAL, P.; HERMANN, J.; LEFFLER, H.; BARONDES, S.H.; COOPER, D.N.W. Sequence and specificity of a soluble lactose-binding

lectin from *Xenopus laevis* skin. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 12942-12949, 1992.

MARX, G.F. Cardiotoxicity of local anesthetics--the plot thickens. **Anesthesiology**, v. 60, p. 3-5, 1984.

MASUDA, Y.; KAWAZOE, N.; NAKAJO, S.; YOSHIDA, T.; KUROIWA, Y.; NAKAYA, K. Bufalin induces apoptosis and influences the expression of apoptosis-related genes in human leukemia cells. **Leuk. Res.**, v. 19, p. 549-556, 1995.

MAZOIT, J.X.; ORHANT, E.E.; BOICO, O.; KANTELIP, J.P.; SAMII, K. Myocardial uptake of bupivacaine: I. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of lidocaine and bupivacaine in the isolated perfused rabbit heart. **Anesth. Analg.**, v. 77, p. 469-476, 1993.

McCARTHY, R.J.; KERNS, J.M.; Nath, H.A.; SHULMAN, M.; IVANKOVICK, A.D. The antinociceptive and histologic effects of sciatic nerve blocks with 5 % butamben suspension in rats. **Anesth. Analg.**, v. 94, p. 711-716, 2002.

MCCLURE, J.H. Ropivacaine. **Br. J. Anaesth.**, v. 76, p. 300-306, 1996.

MEUNIER, J.F.; GOUJARD, E.; DUBOUSSET, A.M.; SAMII, K.; MAZOIT, J.X. Pharmacokinetics of bupivacaine after continuous epidural infusion in infants with and without biliary atresia. **Anesthesiology**, v. 95, p. 87-95, 2001.

MILLER, R.D.; KATZUNG, B.G. Anestésicos Locais. In Katzung B.G. **Farmacologia Básica & Clínica**. 8 edição. Ed. Guanabara Koogan, p. 381-388, 2003.

MORGAN, G.E.; MIKHAIL, M.S.; MURRAY, M.J. **Clin. Anesthesiol.** 3 edition, Ed. Lange medical book. p. 993, 2001.

NARAHASHI, T.; FRAZIER, D.T. Site of action and active form of local anesthetics. **Neurosci. Res.**, v. 4, p. 65-99, 1971.

NAU, C.; SEAVER, M.; WANG, S-Y.; WANG, G.K. Block of human heart hH1 sodium channels by amitriptyline. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 292, p. 1015-1023, 2000.

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

NUMAZAWA, S.; SHINOKI MA ITO, H.; YOSHIDA, T.; KUROIWA, Y. Involvement of Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase inhibition in K562 cell differentiation induced by bufalin. **J. Cell. Physiol.**, v. 160, p. 113-120, 1994.

OBERFRANK, F.; VIZI, E.S.; BAKER, P.F.; SAMUELOV, S.; LICHTSTEIN, D. Comparison of the effects of a bufodienolide and ouabain on neuronal and smooth muscle preparations. **Neurosci. Res.**, v. 10, p. 235-244, 1991.

ODA, Y.; FURUICHI, K.; TANAKA, K.; HIROI, T.; IMAOKA, S.; ASADA, A.; FUJIMORI, M.; FUNAE, Y. Metabolism of a new local anesthetic,

ropivacaine, by human hepatic cytochrome P450. **Anesthesiology**, v. 82, p. 214-220, 1995.

OLSCHEWSKI, A.; HEMPELMANN, G.; VOGEL, W.; SAFRONOV, B.V. Blockade of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> currents by local anesthetics in the dorsal horn neurons of the spinal cord. **Anesthesiology**, v. 88, p. 172-179, 1998.

PATERSON, J.G.; HAMILTON, J.T. A nerve chamber bioassay of local anesthetic activity. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, v. 183, p. 360–390, 1970.

PATON, W.D.M. The action of morphine and related substances on contraction and on acetylcholine output of coaxially stimulated guinea-pig ileum. **Br. J. Pharmacol.**, v. 12, p. 119–127, 1957.

PATROCÍNIO, M.C.A. **Purificação e caracterização de uma nova substância com atividade anestésica local do veneno das glândulas parotóides do *Bufo paracnemis***. Fortaleza, 1997. Dissertação de mestrado em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará. p.98, 1997.

PEREIRA, R.I.C. Anestésicos Locais. In Ortenzi, A.V., Tadelli, M.A. (eds). **Anestesiologia**. São Paulo: Atheneu, p. 341-357, 1996.

POUGH, F.H.; HEISER, J.B.; MCFARLAND, W.N. **A vida dos vertebrados**. Ed. Atheneu, São Paulo, p.839, 1993.

PREUSSER, H.J.; HABERMEHL, G.; SABLOFSKI, M.; SCHMALL-HAURY, D. Antimicrobial activity of alkaloids from amphibian venoms and effects on the ultrastructure of yeast cells. **Toxicon**, v. 13, p. 285-289, 1975.

RAGSDALE, D.S.; MCPHEE, J.C.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W.A. Molecular determinants of state-dependent block of Na<sup>+</sup> channels by local anesthetics. **Science**, v. 265, p. 1724-1728, 1994.

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 edição. Ed. Guanabara Koogan, p. 198-210, 1987.

ROSEGHINI, M.; ERSPAMER, V.; FALCONIERI E.G.; CEI, J.M. Indole-, imidazole- and phenyl-alkylamines in the skin of one hundred and forty American amphibian species other than bufonids. **Comp. Biochem. Physiol. C**, v. 85, p. 139-47, 1986.

SAKURA, S.; BOLLEN, A.W.; CIRIALES, R.; DRASNER, K. Local anesthetic neurotoxicity does not result from blockade of voltage-gated sodium channels. **Anesth. Analg.**, v. 81, p. 338-346, 1995.

SARNA, S. Myoelectrical and Contractile Activities of the Gastrointestinal Tract. In **Schuster atlas of gastrointestinal motility in health and disease**. 2<sup>nd</sup> Edition, BC Decker Inc, Hamilton, London, 2002.

SAVARESE, J.; COVINO, B.G. Anestésicos Locais. In Miller, R.D. (ed). **Tratado de Anestesia**. Ed. Manole, São Paulo, p. 1007-1183, 1984.

SCHNEIDER, M.; DATTA, S.; STRICHARTZ, G. A preferential inhibition of impulses in C-fibers of the rabbit vagus nerve by veratridine, an activator of sodium channels. **Anesthesiology**, v. 74, p. 270-280, 1991.

SCHOLZ, A. Mechanisms of (local) anaesthetics on voltage-gated sodium and other ion channels. **Br. J. Anaesth.**, v. 89, p. 52-61, 2002.

SHIBUYA, N.; MOMOSE, Y.; ITO, Y. Effects of bupivacaine on contraction and membrane potential in isolated canine papillary muscles. **Pharmacology**, v. 47, p. 158-166, 1993.

SHULMAN, M. Treatment of cancer pain with epidural butyl-amino-benzoate suspension. **Reg. Anesth.**, v. 12, p. 1-4, 1987.

SHULMAN, M.; LUBENOW, T.R.; NATH, H.A.; BLAZEK, W.; MCCARTHY, R.J.; IVANKOVICH, A.D. Nerve blocks with 5% butamben suspension for the treatment of chronic pain syndromes. **Reg. Anesth. Pain. Med.**, v. 23, p. 395-401, 1998.

SILVA, P. **Farmacologia**. 6 edição, Ed. Guanabara Koogan, p. 1374, 2002.

SIMONETTI, M.P.B.; BATISTA, R.A.; FERREIRA, F.M.C. Estereoisomeria: A interface da tecnologia industrial de medicamentos e da racionalização terapêutica. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 48, p. 390-399, 1998.

SMITH, F.L.; DAVIS, R.W.; CARTER, R. Influence of Voltage-sensitive Ca(++) channel drugs on bupivacaine infiltration anesthesia in mice. **Anesthesiology**, v. 95, p. 1189-97, 2001.

SMITH, F.L.; LINDSAY, R.J. Paradoxical enhancement of bupivacaine anesthesia in mice by drugs that open sodium channels. **Pharmacology**, v. 67, p. 90-98, 2003.

SMITH, T.W. Digitalis. Mechanisms of action and clinical use. **N. Engl. J. Med.**, v. 318, p. 358-365, 1988.

SRINIVASA, V.; GERNER, P.; HADERER, A.; ABDI, S.; JAROLIM, P.; WANG, G.K. The relative toxicity of amitriptyline, bupivacaine, and levobupivacaine administered as rapid infusions in rats. **Anesth. Analg.**, v. 97, p. 91-95, 2003.

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

STEWART, J.; KELLETT, N.; CASTRO, D. The central nervous system and cardiovascular effects of levobupivacaine and ropivacaine in healthy volunteers. **Anesth. Analg.**, v. 97, p. 412-6, 2003.

STORER, T.I.; USINGER, R.L.; STEBBINS, R.C. **Zoologia Geral**. São Paulo. Ed. Companhia Nacional, 1985.

STRICHARTZ, G.R.; RITCHIE, J.M. The action of local anaesthetics on ion channels of excitable tissues. In Strinchartz G. R. (ed). **Local anaesthetics**. Handbook of experimental pharmacology. Springer-Verlag, Berlin, v. 81, p. 21-52, 1987.

STRICHARTZ, G.R.; SANCHEZ, V.; ARTHUR, G.R.; CHAFETZ, R.; MARTIN, D. Fundamental properties of local anesthetics. II. Measured

octanol:buffer partition coefficients and pKa values of clinically used drugs. **Anesth. Analg.**, v. 71, p.158-170, 1990.

SUGIYAMA, K.; MUTEKI, T. Local anesthetics depress the calcium current of rat sensory neurons in culture. **Anesthesiology**, v. 80, p. 1369-1378, 1994.

SUWALSKY, M.; SCHNEIDER, C.; VILLENA, F.; NORRIS, B.; CARDENAS, H.; CUEVAS, F.; SOTOMAYOR, C.P. Effects of the local anesthetic benzocaine on the human erythrocyte membrane and molecular models. **Biophys. Chem.**, v. 109, p. 189-99, 2004.

TANS, J.T.; POORTVLIET, D.C. Comparison of ventricular steady-state infusion with bolus infusion and pressure recording for differentiating between arrested and non-arrested hydrocephalus. **Acta Neurochir.**, v. 72, p. 15-29, 1984.

TETZLAFF, J.E. The pharmacology of local anesthetics. **Anesthesiol. Clin. North. America**, v. 18, p. 217-233, 2000.

THEOPHILIDIS, G.E.; PAVLIDOU, P. The vitality of the sciatic nerve of the frog and rat in a chamber which allows maintained in vitro recording of the compound nerve action potentials. **Muscle Nerve**, v. 16, p. 113-114, 1993.

TOLEDO, R.C.,; JARED, C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.111, p. 1-12, 1995.

TOLEDO, R.C. Breve apreciação sobre a secreção cutânea dos anfíbios. **Ciência e cultura**, v. 38, p. 279-284, 1986.

TOLEDO, R.C.; JARED, C. Histologic study of the lumbar glands of *Pleurodema thaul* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Rev. Bras. Biol.**, v. 49, p. 421-428, 1989.

TOLEDO, R.C.; VILA, N. Estudo histopatológico das glândulas tibiais (ou paracnêmicas) de *Bufo paracnemis* (Amphibia, Anura, Bufonidae). **Rev. Bras. Biol.**, v. 47, p. 257-264, 1987.

ULBRICHT, W. Kinetics of drug action and equilibrium results at the node of Ranvier. **Physiol. Rev.**, v. 61, p. 785-828, 1981.

VALE, N.B.; DELFINO, J. As nove premissas anestesiológicas da bíblia. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 53, p. 127-136, 2003.

VALE, N.B.; SIMONETTI, M.P.B. Farmacologia dos Anestésicos Locais. In Imbelloni, L.E. **Tratado de Anestesia Raquidiana**. p. 22-29, 2001.

VAUGHAN-WILLIAMS, E.M. Classification of antiarrhythmic drugs. In Sandøe, E.; Flensted-Jensen, E.; Olesen, K.H (eds). **Symposium on cardiac arrhythmias**. Elsinore, Denmark, April 23–25, 1970, Publ. by AB Astra, Södertälje, Sweden, p 449–472, 1970.

VLADIMIROV, M.; NAU, C.; MOK, W.M.; STRICHARTZ, G. Potency of bupivacaine stereoisomers tested in vitro and in vivo: biochemical, electrophysiological, and neurobehavioral studies. **Anesthesiology**, v. 93, p.744-755, 2000.

WALI, F.A.; SUER, A.H.; GREENIDGE, E.; TUGWELL, A.C.; HAYTER, A. Local anaesthetics inhibit influx of calcium, sodium and potassium into rat

ileum, diaphragm and human isolated saphenous vein. **Gen. Pharmacol.**, v. 18, p. 351-355, 1987.

WANG, G.K.; QUAN, C.; VLADIMIROV, M.; MOK, W.M.; THALHAMMER, J.G. Quaternary ammonium derivative of lidocaine as a long-acting local anesthetic. **Anesthesiology**, v. 83, p. 1293-1301, 1995.

WANG, G.K.; STRICHARTZ, G.R. Therapeutic Na<sup>+</sup> channel blockers beneficial for pain syndromes. **Drug. Dev. Res.**, v. 54, p. 154-158, 2002.

WANG, S.Y.; WANG, G.K. Voltage-gated sodium channels as primary targets of diverse lipid-soluble neurotoxins. **Cell. Signal.**, v. 15, p.151-159, 2003.

WATABE, M.; MASUDA, Y.; NAKAJO, S.; YOSHIDA, T.; KUROIWA, Y.; NAKAYA, K. The cooperative interaction of two different signaling pathways in response to bufalin induces apoptosis in human leukemia U937 cells. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 14067-1472, 1996.

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

WILSON, S.J.; BOLTER, C.P. Do cardiac neurons play a role in the intrinsic control of heart rate in the rat? **Exp. Physiol.**, v. 87, p. 675-682, 2002.

YENTIS, S.M.; VLASSAKOV, K.V. Vassily von Anrep, forgotten pioneer of regional anesthesia. **Anesthesiology**, v. 90, p. 890-895, 1999.

YOSHIDA, K.S. Studies on the surface anesthetic activity of bufadienolides isolated from Ch'an Su. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 24, p. 1714-1717, 1976.

ZAPATA-SUDO, G.; TRACHEZ, M.M.; SUDO, R.T.; NELSON, T.E. Is comparative cardiotoxicity of S(-) and R(+) bupivacaine related to enantiomer-selective inhibition of L-type Ca(2+) channels? **Anesth. Analg.**, v. 92, p. 496-501, 2001.

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 84, p. 5449-5453, 1987.

ZINK, W.; GRAF, B.M. Toxicology of local anesthetics. Clinical, therapeutic and pathological mechanisms. **Anaesthesist**, v. 52, p. 1102-1123, 2003.

ZIPF, H.F.; DITTMANN, E.C. General pharmacological effects of local anesthetics. In Local Anesthetics. Vo. 1. **International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics**. Sect 8 (Lechat P. edl), Pergamon Press, Oxford, p. 191-238, 1971.