

Universidade Federal do Ceará  
Faculdade de Medicina  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia  
Curso de Pós-Graduação em Farmacologia

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANESTÉSICA LOCAL DE UM  
FATOR ISOLADO DO VENENO DO *Bufo paracnemis* NA  
POLPA DENTÁRIA DE COELHO**

SOLANE FERNANDES FREITAS

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação  
em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará – UFC, para  
obtenção do título de Mestre em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho



Fortaleza – CE  
2001

OK

F938e

Freitas, Solane Fernandes.

Estudo da atividade anestésica local de um fator isolado do veneno do *Bufo paracnemis* na polpa dentária de coelho / Solane Fernandes Freitas. – Fortaleza, 2001.

95 f: il.

Orientador: Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho.

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará.

Curso de Pós-graduação em Farmacologia.

1. Sapo – veneno    2. Farmacologia    3. Coelho – polpa dentária    4. Anestesia    I. Título

CDD 615.942

ESTUDO DA ATIVIDADE ANESTÉSICA LOCAL DE UM FATOR  
ISOLADO DO VENENO DO *Bufo paracnemis* NA POLPA DENTÁRIA DE  
COELHO

SOLANE FERNANDES FREITAS

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Prof. Dr. Carlos Maurício de Castro Costa

---

Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa

“Põe tuas delícias no Senhor, e os desejos do teu coração ele atenderá.”

(Salmo 36:4)

**Àquele que sempre me carrega nos braços nos momentos mais difíceis.**

**Aos meus pais, José Valdo e Heloína, que são exemplos de vida.**

À Deus, por mais esta vitória;

Ao Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho, pela orientação segura e constante, pelo incentivo na arte de fazer ciência e, principalmente, por suas lições de vida.

Aos Ilustres Prof. Dr. Carlos Maurício de Castro Costa e Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa pela gentileza de aceitarem este convite e pelas contribuições que certamente surgirão neste momento.

Ao Prof. Bruno Cardi, pelo enriquecimento e correções deste trabalho.

Aos colegas da Disciplina de Dentística do Curso de Odontologia na UNIFOR, pela compreensão e colaboração durante minha ausência.

Ao Dr. Bill Rola por ser tão prestativo e compreensivo.

À Dra. Dóris Fernandes Carvalho pelo incentivo inicial para a realização dos experimentos.

Ao Manuel Cláudio e Inez Evangelista que dispuseram dedicação inenarrável durante todas as fases da realização deste trabalho.

Ao Luis Edson Sales, por estar ao meu lado em momentos importantes.

À Débora Freitas, pela disponibilidade de ajudar, quando necessário.

À Juliana Medeiros, Gisélia Feitosa e Fábio Moura, pela tão prestimosa amizade.

Aos colegas Amália, Reinaldo, Vilma, Elisete, Vasco, Henrique, Pajon, Mila, Ana Paula, Luilma, Werlames, Aronai, Iberê, Valéria, Andréa, Ana Luiza e Marcelo, pelo companheirismo durante toda a convivência do mestrado.

À Rosa Germana pela grande colaboração nos experimentos do laboratório.

A todos os demais que contribuíram gentilmente para a realização desse trabalho em qualquer uma de suas etapas.

# ÍNDICE

Lista de Figuras	VIII
Lista de abreviações	X
Resumo	XI
Abstract	XII

## 1-INTRODUÇÃO

### 1.1-ANESTÉSICOS LOCAIS

1.1.1 Histórico	01
1.1.2 Estrutura Química	04
1.1.3 Fisiologia da condução nervosa	07
1.1.4 Mecanismo de ação dos anestésicos locais	09
1.1.5 Outros agentes que afetam ao canais de sódio	12
1.1.6 Farmacocinética	13
1.1.7 Toxicidade	16
1.1.8 Anestésicos Locais em Odontologia	18

### 1.2-ANFÍBIOS

1.2.1 Evolução	23
1.2.2 Distribuição	25
1.2.3 Características Gerais	26
1.2.4 Pele e glândulas cutâneas	28
1.2.5 Bufadienolídeos	32

1.3-OBJETIVOS	36
---------------	----

## **2-MATERIAL**

2.1 Animais	37
2.2 Aparelhos	37
2.3 Drogas e reagentes	38

## **3-MÉTODOS**

3.1 Extração	40
3.2 Purificação	40
3.3 Determinação do grau de pureza	41
3.4 Determinação da estrutura química do fator	41
3.5 Diluição	42
3.6 Ensaio farmacológico para estudo da atividade anestésica local em polpa de coelho	42
3.6.1. Realização de cavidades	42
3.6.2. Teste de estimulação da polpa dentária	43
3.6.3 Análise comparativa de anestésicos	43
3.7 Métodos Estatísticos	44

## **4-RESULTADOS**

4.1 Purificação	48
4.2 Determinação do grau de pureza	48
4.3 Determinação da estrutura química	48
4.4 Análise comparativa da atividade anestésica da lidocaína, bupivacaína e fator através do teste de estimulação da polpa dentária	51

## **5-DISCUSSÃO** 70

## **6-CONCLUSÃO** 83

## **7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** 84

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Fórmulas estruturais dos anestésicos locais clássicos.

FIGURA 2. Desenho esquemático do canal de sódio sensível a voltagem, presente na membrana celular neuronal

FIGURA 3. Sapo *Bufo paracnemis*.

FIGURA 4. HPLC.

FIGURA 5. Anestesia infiltrativa na região vestibular do incisivo do coelho

FIGURA 6. Coelho ligado ao eletroestimulador.

FIGURA 7. Cromatografia em HPLC.

FIGURA 8. Proposição estrutural do fator.

FIGURA 9. Avaliação da atividade anestésica local da lidocaína a 2% através do teste de estimulação da polpa dentária.

FIGURA 10. Avaliação da atividade anestésica local da lidocaína 1% através do teste de estimulação da polpa dentária.

FIGURA 11. Avaliação da atividade anestésica local da lidocaína a 0,5% através do teste de estimulação da polpa dentária.

FIGURA 12. Avaliação das atividades anestésicas locais da lidocaína a 2%, 1% e 0.5% através do teste de estimulação da polpa dentária

FIGURA 13. Avaliação da atividade anestésica local da bupivacaína a 0,5% através do teste de estimulação da polpa dentária.

FIGURA 14. Avaliação da atividade anestésica local da bupivacaína a 0,25% através do teste de estimulação da polpa dentária.

FIGURA 15. Avaliação da atividade anestésica local da bupivacaína a 0,125% através do teste de estimulação da polpa dentária.

FIGURA 16. Avaliação das atividades anestésicas locais da bupivacaína a 0,5%, 0,25% e 0,125% através do teste de estimulação da polpa dentária.

FIGURA 17. Avaliação da atividade anestésica local do fator a 0,5% através do teste de estimulação da polpa dentária.

FIGURA 18. Avaliação da atividade anestésica local do fator a 0,25% através do teste de estimulação da polpa dentária.

FIGURA 19. Avaliação da atividade anestésica local do fator a 0,125% através do teste de estimulação da polpa dentária.

FIGURA 20. Avaliação das atividades anestésicas locais do fator a 0,5%, 0,25% e 0,125% através do teste de estimulação da polpa dentária.

FIGURA 21. Comparação da atividade anestésica local do fator a 0,5% com a da lidocaína a 2% através do teste de estimulação da polpa dentária.

FIGURA 22. Comparação da atividade anestésica do fator a 0,5% e da bupivacaína a 0,5% utilizando o teste de estimulação da polpa dentária.

FIGURA 23. Comparação da atividade anestésica local do fator a 0,25% e da lidocaína a 1% utilizando o teste de estimulação da polpa dentária.

FIGURA 24. Comparação da atividade anestésica local do fator a 0,25% e da bupivacaína a 0,25% utilizando o teste de estimulação da polpa dentária.

FIGURA 25. Comparação da atividade anestésica local máxima do fator a 0,125%, 0,25% e 0,5% com a bupivacaína a 0,125%, 0,25% e 0,5% e com a lidocaína a 2%, 1% e 0,5% utilizando o teste de estimulação da polpa dentária.

## LISTA DE ABREVIACÕES

°C - graus Célsius

cm – centímetro

Da – daltons

DL<sub>50</sub> – dose letal para 50% da população em estudo

g – grama

h – hora

hs – horas

kg – quilograma

mg – miligramas

min – minutos

ml – mililitros

mm – milímetro

nm – nanômetro

µl – microlitros

µl – microgramas

p:v – peso por volume

v:v – volume por volume

# ESTUDO DA ATIVIDADE ANESTÉSICA LOCAL DE UM FATOR ISOLADO DO VENENO DO *Bufo paracnemis* NA POLPA DENTÁRIA DE COELHO

SOLANE FERNANDES FREITAS. Orientador: Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2001.

## RESUMO

A pele dos anfíbios é responsável por várias funções vitais. Ela é responsável pela produção de uma diversidade de substâncias com vários efeitos farmacológicos tais como, amins biogênicas, alcalóides, esteróides, proteínas e peptídios. Neste estudo foi isolado do veneno das glândulas parotóides do *Bufo paracnemis* um fator com potente atividade anestésica local. O veneno extraído foi dissolvido em etanol (100%) e mantido a 4°C durante toda a noite. A mistura foi centrifugada a 5000 g e o precipitado foi descartado. O sobrenadante foi fracionado em cromatografia líquida de alta performance (HPLC), utilizando um sistema isocrático de eluição com acetonitrila a 40%. O pico que apresentou atividade anestésica local foi utilizado nos ensaios farmacológicos de estimulação da polpa dentária. O peso molecular do fator utilizado é 402 Da. Sua estrutura parcial indica pertencer ao grupo dos esteróides, da família das bufogeninas. A DL<sub>50</sub> pela injeção intravenosa do fator purificado em camundongos (30 mg/kg) é maior que a da lidocaína (18.8 mg/kg) e bupivacaína (7.9 mg/kg), demonstrando a menor toxicidade aguda deste fator.

No teste de estimulação da polpa dentária o fator nas concentrações de 0,25% e 0,5% apresentou maior potência no entanto, duração anestésica semelhante a bupivacaína nas mesmas concentrações, respectivamente. O fator nas concentrações de 0,25% e 0,5% apresentou maior potência e duração de ação que a lidocaína nas concentrações de 1% e 2%, respectivamente. Essa substância torna-se, então, promissora como instrumento de pesquisa de uma nova classe de anestésicos locais para o uso clínico em odontologia.

# A STUDY OF THE LOCAL ANESTHETIC ACTIVITY OF A FACTOR ISOLATED FROM A *Bufo paracnemis* VENOM ON RABBIT'S TOOTH PULP

SOLANE FERNANDES FREITAS. Supervisor: Krishnamurti de Moraes Carvalho. Master's Dissertation. Course of Post-graduation in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, UFC, 2001.

## ABSTRACT

Amphibian skin has a lot of vital functions. It is responsible for the production of a lot of substances, with several pharmacological effects, such as biogenic amines, alkaloids, steroids, proteins and peptides. In this study, it was isolated from the parotoid glands of *Bufo paracnemis* a factor with potent local anesthetic activity. The venom extract was dissolved in ethanol (100%) and it was kept overnight at 4°C overnight. The mixture was centrifugated at 5000 g and the pellet was discarded. The supernatant was fractionated by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using a isocratic sistem with acetonitrile at 40%. The peak that presented local anesthetic activity was used in pharmacological studies of tooth pulp stimulation. The molecular weight of the factor is 402 Da. Its parcial structure seems at steroids group of the bufogenin family. DL<sub>50</sub> by intravenous administration in mice of the factor (30 mg/kg) is greater than that of lidocaine (18.8 mg/ kg) and that of bupivacaine (7.9 mg/kg), showing smaller agude toxicity.

In tooth pulp stimulation test, the factor in the concentration of 0.25% and 0.5% presented greater potency than bupivacaine. Furthermore, it also presented the same anesthetic durabiliy than that of bupivacaine in same concentrations. The factor in concentrations of 0.25% and 0.5% showed greater potency and durability of action than lidocaine in concentrations of 1% and 2%, respectively. This substance may represent act as an important scientific tool to research a new local anesthetic class for clinical use in dentistry.

# 1-INTRODUÇÃO

## 1.1.ANESTÉSICOS LOCAIS

### 1.1.1.Histórico

Durante séculos, os nativos dos Andes mascaram um extrato alcalino das folhas de *Erythroxylon coca* devido suas ações estimulatórias e euforizantes, mas apenas no final do século XIX foram descobertas acidentalmente as propriedades anestésicas da cocaína, o primeiro anestésico local, que existe em grandes quantidades em suas folhas (Carvalho, 1994; Catterall & Mackie 1996).

Em 1860 a coca foi isolada pela primeira vez por Albert Niemann das folhas da coca (Carpenter & Mackey 1996). Seu uso como anestésico local, no entanto, foi primeiramente descrito por Moreno y Maiz, cirurgião das Forças Armadas, em 1868 em uma monografia (Covino & Vassalo, 1985; Carvalho, 1994). Em 1851, Charles Gabriel Pravaz, cientista francês, inventou a seringa hipodérmica, instrumento destinado a ter um papel importantíssimo em anestesia regional, aperfeiçoada por Alexander Wood, em 1854 (Collins, 1978; Fink, 1985).

Sigmund Freud estudou as ações fisiológicas da cocaína, e, em 1884, Carl Koller introduziu a cocaína na prática clínica como anestésico tópico para

cirurgia oftalmológica (Tortamano, 1988; Carpenter e Mackey 1996; Catterall & Mackie em 1996).

Já naquela época esta droga podia apenas ser aplicada topicamente em pequenas cirurgias e dentre elas as exodontias, fatos estes difundidos rapidamente no mundo todo (Tortamano, 1988).

Halstead popularizou seu uso na anestesia com bloqueio de condução e infiltração (Collins, 1978; Catterall & Mackie 1996). Em novembro de 1884, ele realizou o primeiro bloqueio do nervo mandibular através da injeção intrabucal de cocaína a 4%. Seu paciente foi seu primeiro assistente, Dr Richard John Hal. Pouco tempo depois, Dr. Hal declarou em uma carta publicada pelo New York Medical Journal de 6 de dezembro de 1884, que ele obteve também tratamento do dente incisivo superior esquerdo sem dor, após o bloqueio do nervo infraorbital de um paciente (Roberts & Sowray, 1995).

Estes experimentos precursores representaram um imenso avanço para a cirurgia, mas alguns efeitos colaterais, sejam agudos ou crônicos, vieram junto com o uso clínico da cocaína. Os efeitos agudos provinham da toxicidade sistêmica, e os crônicos, da propriedade da cocaína de produzir dependência (Covino & Vassalo, 1985).

A identificação química da cocaína como um éster do ácido benzóico conduziu à síntese de numerosos compostos, que são basicamente ésteres derivados do ácido benzóico. A benzocaína, anestésico local de baixa solubilidade em água foi identificada por Ritsert em 1890. Devido a sua baixa solubilidade em água, este composto permaneceu esquecido durante anos. No

entanto, foi reconhecido como anestésico tópico eficaz, permanecendo atualmente como droga valiosa para a obtenção da anestesia de superfície (Covino & Vassalo, 1985).

Pesquisas em busca de um anestésico mais apropriado culminaram com a síntese da procaína, em 1904, por Einhorn. A procaína, o protótipo dos anestésicos locais aminoester, foi utilizada pela primeira vez clinicamente, em 1905. Era significativamente hidrossolúvel e possuía uma margem de segurança local e sistêmica aceitável para uso clínico com agente injetável em anestesia regional (Covino & Vassalo, 1985).

Vários outros anestésicos locais do tipo aminoester foram introduzidos subsequentemente, incluindo a tetracaína em 1930 e a cloroprocaína em 1950 (Covino & Vassalo, 1985; Roberts & Sowray, 1995).

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

Em 1943, a lidocaína foi sintetizada por Lofgren, sua introdução clínica um ano depois foi o marco do uso de uma nova classe de anestésicos locais, as aminoamidas (Carpenter & Mackey, 1996). Os compostos do tipo amida são relativamente livres de reação de sensibilização (Hondegheem & Miller, 1998; Carpenter & Mackey, 1996).

Vários anestésicos locais do tipo aminoamidas foram desenvolvidos, incluindo mepivacaína(1956), bupivacaína(1957), prilocaína (1959), e etidocaina (1971) e foram subsequentemente utilizadas clinicamente.(Carpenter & Machey 1996)

A ropivacaína é um novo anestésico local , aminoamida de longa duração, que possui menor toxicidade cardiovascular que a bupivacaína, como mostram evidências laboratoriais e clínicas.(Carpenter & Mackey, 1996; Catterall & Mackie,1996)

### **1.1.2.Estrutura Química**

A estrutura da maioria dos anestésicos locais empregados clinicamente é constituída por uma região hidrofílica e outra hidrófoba, unidas por uma cadeia intermediária (Borba, 1992; Carpenter & Mackey, 1996; Catterall & Mackie, 1996; Ferreira, 1999).(Figura 1)

O grupo hidrofílico é, em geral, uma amina terciária, mas também pode ser uma amina secundária (Catterall & Mackie, 1996; Ferreira, 1999). Esta é a porção ionizável da molécula que sofre influencia do pH do meio (Pereira, 1996).

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

A cadeia intermediária que conecta a porção hidrofílica e a lipofílica é constituída por um grupo éster ou amida, o que subdivide os anestésicos locais em dois principais subgrupos: aminoésteres, que são metabolizados pela colinesterase plasmática, e os do tipo aminoamidas, que são metabolizados no fígado.(Carpenter & Mackey,1996)

As principais diferenças entre o grupo éster e o grupo amida relacionam-se ao local e tipo de metabolização, bem como o potencial para produzir reações alérgicas (Covino & Vassalo, 1985; Pereira, 1996).

A potência e duração da ação dos anestésicos locais são claramente dependentes de certos aspectos da molécula (Berde & Strichartz 2000). Um aumento da cadeia intermediária causa aumento da potência anestésica mas, causa também aumento da toxicidade (Carpenter & Mackey, 1996). A hidrofobicidade aumenta a potência e a duração da ação dos anestésicos locais. Isto ocorre porque a associação do agente em locais hidrofóbicos aumenta a sua distribuição para seus locais de ação e reduz a taxa do metabolismo pelas esterases plasmáticas e pelas enzimas hepáticas (Catterall & Mackie, 1996).

Além disso, acredita-se que o receptor para esses agentes nos canais de sódio seja hidrofóbico, de forma que a afinidade dos receptores por agentes anestésicos é aumentada para agentes mais hidrofóbicos. A hidrofobicidade também aumenta a toxicidade, de forma que na realidade o índice terapêutico está reduzido para agentes mais hidrofóbicos (Catterall & Mackie 1996).

A atividade anestésica ótima necessita de um equilíbrio ótimo entre as forças lipofílicas e hidrofílicas destes grupos (Hondegheem & Miller, 1998).

Os anestésicos locais são bases fracas. Assim, para aplicação terapêutica, normalmente estão disponíveis como sais, por motivos de solubilidade e estabilidade (Cattlove, 1972; Bokesch et al, 1987; Hondegheem & Miller, 1998; Carpenter & Mackey, 1996; Berde & Strichartz, 2000).

Os anestésicos locais em solução existem em equilíbrio químico entre forma neutra e forma catiônica. Em uma certa concentração iônica de hidrogênio específica para cada droga, a concentração de anestésicos locais não-carregados é igual a concentração de cátions carregados. Esta concentração iônica de hidrogênio é denominada pKa (Wildsmith et al, 1987; Eckenstam, 1996; Berde & Strichartz, 2000).

O pH do meio no qual o anestésico local é injetado influencia a atividade da droga alterando a percentagem dos agentes presentes nas formas básicas e protonadas. (Berde & Strichartz 2000).

### 1.1.3. Fisiologia da condução nervosa

O axolema é ativo metabolicamente, controlando o potencial eletroquímico transmembranar por um transporte ativo em ambas as direções e controlando sua própria permeabilidade relativa a vários íons. O transporte ativo resulta em um fluido intracelular contendo altas concentrações de íons potássio a baixas concentrações de íons sódio relativo ao fluido extracelular (Carpenter & Mackey, 1996; Guyton & Hall, 1997; Berde & Strichartz, 2000). Além do transporte ativo, a membrana é especificamente permeável aos íons potássio e praticamente impermeável aos íons sódio. A diferença na concentração iônica através da membrana resulta em um potencial elétrico do interior da célula negativo em relação ao exterior (Rang et al., 1995; Carpenter & Mackey, 1996).

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

Durante o potencial de ação, a membrana celular transitoriamente interrompe sua permeabilidade ao potássio e passa a ter permeabilidade ao sódio. Como consequência desta grande entrada de carga positiva para o meio intracelular, inverte-se a polaridade da célula, que agora contém mais cargas positivas dentro que fora da célula (Carvalho, 1994; Guyton & Hall, 1997; Berde & Strichard, 2000).

positivas dentro que fora da célula (Carvalho, 1994; Guyton & Hall, 1997; Berde & Strichard, 2000).

Ao final da fase de despolarização, a permeabilidade da membrana celular aos íons sódio diminui e a permeabilidade ao potássio é bastante aumentada. O potássio se move para fora da célula, o que produz repolarização da membrana, até que o equilíbrio eletroquímico e o potencial de repouso sejam atingidos. O fluxo de sódio para o interior da célula durante a despolarização, e de íons de potássio para fora durante a repolarização são fenômenos passivos, pois cada íon está se movendo no sentido do gradiente de concentração (Covino & Vassalo, 1985). Depois do potencial de ação, a concentração de sódio e potássio muda muito pouco (Carpenter & Mackey, 1996; Berde & Strichartz, 2000). A pequena quantidade de sódio entrando e potássio saindo da célula como resultado deste processo é restaurado pela bomba de  $\text{Na}^+\text{K}^+$  (Carpenter & Mackey, 1996; Guyton & Hall, 1997; Berde & Strichartz, 2000).

Despolarizações muito fracas incapazes de ativar quantidades suficientes de canais de sódio para produzir corrente no interior da rede são inferiores ao limiar de excitabilidade da membrana (Berde & Strichart, 2000). Isto é chamado fenômeno “tudo ou nada” já que ou a despolarização local atinge o potencial limiar inicial e propaga o estímulo por todo o axolema ou não atinge a potencial de voltagem limiar e não há despolarização (Carpenter & Mackey, 1996).

#### **1.1.4. Mecanismo de ação dos anestésicos locais**

Embora os anestésicos locais alterem a condutância aos íons potássio e cálcio através das membranas excitáveis, a inibição do influxo dos íons sódio através da membrana celular neuronal é o mecanismo de ação pelo qual todos os anestésicos locais produzem bloqueio do impulso nervoso (Courtney, 1987; Carpenter & Mackey, 1996; Berde & Strichartz, 2000).

Os anestésicos locais interrompem a condução do estímulo nervoso por bloquear a condutância dos canais de sódio e, conseqüentemente, impedir a deflagração do potencial de ação (Carvalho, 1994; Cattarral & Mackie, 1996). As correntes de sódio são reduzidas por doses subclínicas de anestésicos locais e são totalmente abolidas por doses clínicas (Berde & Strichartz, 2000).

Por haver uma ampla variedade de componentes químicos que apresentam atividade anestésica local, é improvável que todos atuem bloqueando a condutância do sódio da mesma maneira (Carpenter & Mackey, 1996).

Várias teorias tentam explicar o mecanismo de ação de vários agentes anestésicos locais. São elas: inibição do influxo de sódio mediada pelo cálcio, interferência na permeabilidade da membrana pela expansão de volume da mesma, indução de mudança na carga de superfície do axolema e interação com um receptor específico na membrana neuronal (Carpenter & Mackey, 1996).

O deslocamento do cálcio do sítio da membrana que controla a permeabilidade ao sódio tem sido advogado como mecanismo de atividade anestésica local (Carpenter & Mackey, 1996). O cálcio extracelular elevado

antagoniza parcialmente a ação dos anestésicos locais (Carpenter & Mackey, 1996; Honderghem & Miller, 1998), sugerindo uma competição entre o anestésico local e o cálcio ligado à membrana (Pereira, 1996). No entanto, a ação direta do cálcio e dos anestésicos locais parece ser independente uma da outra. Então é improvável que o cálcio interfira diretamente na atividade dos agentes anestésicos locais (Carpenter & Mackey 1996).

A teoria de expansão da membrana propõe que a interação de molécula do anestésico local relativamente hidrófoba com lipídios de membrana cause uma alteração conformacional na organização dos lipídios da membrana, resultando em expansão da membrana. A permeabilidade diminuída ao sódio poderia ocorrer por um aumento da pressão lateral na membrana, que comprimiria diretamente os canais de sódio, ou por mudança conformacional nas proteínas dos canais de sódio causado por um aumento no grau de desordem das moléculas lipídicas da membrana. Este tipo de efeito inespecífico é provavelmente significativo para alguns anestésicos locais, especialmente a benzocaína (Covino 1986; Savarase & Covino, 1984; Carpenter & Mackey, 1996).

A terceira teoria que diz respeito ao mecanismo de ação dos anestésicos locais envolve a indução de alterações na carga da superfície da membrana. As moléculas da membrana neuronal contém extremidades hidrofílicas, aniônicas que estão dispostas nas superfícies externa (extracelular) e interna (axoplasmática) da membrana, ambas as superfícies do axolema são negativamente carregadas em relação ao interior da membrana. Essas cargas negativas podem atrair as moléculas anestésicas locais, alinhando a molécula anestésica local carregada, hidrofílica na interface água-membrana e a porção aromática, não polar na membrana lipídica. Embora a hipótese da superfície

carregada possa ser levada em consideração para a ação dos anestésicos locais carregados, isto não explica a habilidade dos anestésicos locais neutros, como a benzocaína, de bloquear os impulsos nervosos (Carpenter & Mackey, 1996).

A falha de uma teoria comum para explicar as ações de todos os tipos de anestésicos locais necessariamente não a invalida. Moléculas diferentes que possuem atividade anestésica local podem apresentar diferentes mecanismos de ação (Gissen et al, 1980; Carpenter & Mackey, 1996).

A quarta teoria e mecanismo de ação mais aceito para os agentes anestésicos mais utilizados clinicamente é a inibição direta dos canais de sódio, iniciado pela ligação da molécula anestésica local com um ou mais receptores localizados no canal de sódio, prevenindo o influxo de íons sódio para a iniciação do potencial de ação (Butterworth & Strichartz, 1990; Catterall & Mackie, 1996; Carpenter & Mackey, 1996; Berde & Strichartz, 2000). Em favor da hipótese dos canais de sódio há um número considerável de dados de clampeamento de voltagem em nervos de vertebrados e de lulas (Rang et al., 1995).(Figura 2)

As investigações bioquímicas, biofísicas e biológicas moleculares realizadas durante a última década levaram a rápida expansão do conhecimento sobre a estrutura e a função do canal de sódio. Este canal é formado pelas subunidades alfa, beta<sub>1</sub> e beta<sub>2</sub>. A subunidade alfa contém quatro domínios homólogos (I a IV). Acredita-se que cada domínio consista em seis regiões transmembranais em configuração alfa-helicoidal (S1 a S6). Cada domínio apresenta 300 a 400 aminoácido, com 50% de conservação na sequência de aminoácidos (Garret & Grisham, 1995; Hille e Catterall, 1995, Catterall & Mackie, 1996). Os resíduos de

aminoácidos importantes para a ligação dos anestésicos locais são encontrados no segmento S6 no domínio IV (Catterall & Mackie, 1996).

### **1.1.5. Outros agentes que afetam o controle dos canais de sódio**

Algumas toxinas como tetrodotoxina (TTX) e saxitoxina (STX) atuam de uma forma potente e seletiva nos canais de sódio, ligando-se a estes canais e interagindo diretamente com o lado exterior dos canais de sódio para bloquear a condutância aos íons sódio. São, no entanto, inadequadas para uso clínico, sendo dispendiosa a sua obtenção em fontes exóticas e muito difícil sua penetração nos tecidos por causa de sua lipossolubilidade muito pequena. Entretanto, foram muito importantes como instrumentos experimentais para o estudo de canais de sódio. O uso da tetrodotoxina e saxitoxina marcadas possibilitou o isolamento e purificação da proteína do canal de sódio e o sequenciamento por clonagem genética (Rang et al., 1995).

Substâncias altamente lipossolúveis como a veratridina, batracotoxina e aconitina modificam o controle dos canais de sódio de forma a aumentar a probabilidade de abertura dos canais de sódio, tornando as células hiperexcitáveis e causando um aumento do potencial de ação (Rang et al, 1995).

### **1.1.6. Farmacocinética**

Os anestésicos locais normalmente são administrados através de injeção diretamente na área das fibras nervosas a serem bloqueadas. Assim, apenas o término de seu efeito está relacionado a fenômenos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (Tucker et al, 1972; Pereira, 1996). A aplicação tópica dos anestésicos locais, no entanto necessita da difusão da droga tanto para o início como para a evolução do efeito anestésico (Hondegghem & Miller, 1998).

A meta da anestesia local é usar apenas uma pequena quantidade de anestésico local suficiente para promover anestesia adequada porém com menor toxicidade. Idealmente, a dose mínima requerida pode ser determinada pela concentração mínima de anestésicos locais no nervo necessária para produzir o bloqueio nervoso desejado (Carpenter & Mackey, 1996).

A absorção sistêmica de um anestésico injetado do sítio de administração é modificado por inúmeros fatores, incluindo a dose, o sítio de injeção, a presença de substâncias vasoconstritoras, e as propriedades físico-químicas e farmacológicas da droga (Carvalho, 1994; Hondegghem & Miller, 1998; Carpenter & Mackey, 1996; Pereira, 1996).

O nível sanguíneo máximo de drogas anestésicas locais está relacionado com a dose total de drogas administradas para qualquer sítio particular de administração. Para a maioria das drogas há uma relação linear entre a quantidade de drogas administradas e o pico resultante de anestésico no sangue (Berde & Strichartz, 2000).

Quando uma solução anestésica é exposta a uma área de grande vascularização, um maior grau de absorção ocorre. Esta relação é importante clinicamente porque o uso de doses fixas de anestésicos locais podem ser potencialmente tóxicos em uma área de administração mas não em outras (Carpenter & Mackey, 1996; Berde & Strichartz, 2000).

As substâncias vasoconstritoras, como a epinefrina, reduzem a absorção sistêmica dos anestésicos locais a partir do sítio de depósito. Isto é especialmente verdadeiro para drogas de duração de ação intermediária ou curtas como a procaína, lidocaína e a mepivacaína. A captação neuronal da droga é aumentada através da concentração local da droga mais alta, e os efeitos sistêmicos tóxicos da droga são reduzidos. A combinação de absorção sistêmica reduzida e captação aumentada pelo nervo é responsável pelo prolongamento do efeito anestésico local em cerca de 50%. Os vasoconstritores são menos eficazes no prolongamento das propriedades anestésicas das drogas mais lipossolúveis e de ação prolongada (bupivacaína e etidocaína), possivelmente porque estas moléculas se ligam fortemente ao tecido (Hondegheem & Miller, 1998).

O conhecimento sobre farmacocinética nos ajuda a prever o nível do pico sanguíneo resultante de uma determinada dose da droga e isto ajuda a definir a dose máxima que pode ser administrada e também evita a toxicidade sistêmica (Carpenter & Mackey, 1996).

As propriedades químicas farmacológicas das drogas alteram o grau de absorção dos anestésicos locais já que a maior parte dos anestésicos locais apresentam uma ação vasodilatadora. A prilocaína, por possuir ação vasodilatadora menos potente, apresenta níveis sanguíneos menores que a

lidocaína e a mepivacaína cuja ação vasodilatadora é maior (Covino & Vassalo, 1985; Carvalho, 1994; Pereira, 1996).

A partir do momento que os anestésicos locais são absorvidos, dois fenômenos acontecem: ligação com proteínas plasmáticas e distribuição para os tecidos (Carvalho, 1994)

Quantidades significativas dessas drogas ligam-se às proteínas plasmáticas, entre elas a específica  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida, ligante de amidas, e a menos específica e mais importante quantitativamente, albumina (Denson et al, 1984)

Drogas anestésicas locais são distribuídas por todos os tecidos do corpo, mas a concentração relativa nos diferentes tecidos varia. Em geral, órgãos mais perfundidos mostram concentrações mais altas de drogas anestésicas que órgãos menos perfundidos (Berde & Strichartz, 2000; Hondeghem & Miller, 1998).

O tipo de metabolismo de agentes anestésicos locais varia de acordo com a classificação química (Berde & Strichartz, 2000). Os anestésicos locais do tipo éster são hidrolizados muito rapidamente no sangue pela butirilcolinesterase (pseudo colinesterase). Consequentemente, apresentam meias-vidas plasmáticas tipicamente curtas (Hondeghem & Miller; 1998; Berde & Strichartz, 2000).

A ligação amídica dos anestésicos locais é hidrolisada pelas enzimas hepáticas microsomais. Existe considerável variação da taxa do metabolismo hepático dos compostos amídicos em particular, a ordem aproximada sendo prilocaína(mais rápida), etidocaína, lidocaína, mepivacaína, bupivacaína (menos rápida). Como resultado a toxicidade dos anestésicos locais do tipo amídico tem

maior probabilidade de ocorrer nos pacientes com doença hepática. (Hondegem & Miller, 1995; Berde & Strichartz, 2000).

### **1.1.7. Toxicidade**

Drogas anestésicas locais são relativamente livres de efeitos colaterais se estes agentes são administrados em uma dosagem apropriada e em sua localização anatômica correta. No entanto, reações tóxicas sistêmicas e locais podem ocorrer, especialmente seguindo-se de um acidente intravascular ou intratecal ou a uma administração de uma dose excessiva. Em adição, efeitos adversos excessivos são associados com o uso de certas drogas, como reações alérgicas a drogas do tipo aminoéster e metemoglobinemia seguindo o uso de prilocaína (Berde e Strichartz, 2000).

Reações sistêmicas aos anestésicos locais envolvem, primeiramente, o sistema nervoso central (SNC) e sistema cardiovascular. Em geral, o SNC é mais susceptível a ação dos anestésicos locais sistêmicos que o sistema cardiovascular, e assim a dose e nível sanguíneo do requerido anestésico local para produzir toxicidade no de SNC são usualmente mais baixos que aqueles que resultam em colapso circulatório (Carpenter e Mackey, 1996; Berde e Strichartz, 2000).

Os anestésicos locais aparentemente levam à depressão das vias corticais inibitórias, assim permitindo a atividade dos componentes excitatórios, sem oposição. Este estágio de transição da excitação não equilibrada pode ser seguido por depressão generalizada do SNC se forem alcançados níveis sanguíneos mais elevados de anestésicos (Wangman et al, 1967; Liu et al., 1983; Hondegem e Miller, 1998; Berde e Strichartz, 2000).

Concentrações extremamente elevadas de anestésicos locais deprimem a atividade de marcapasso do nó sinoatrial, resultando em bradicardia e até parada cardíaca. Eles também exercem profundo efeito depressor sobre a mecânica do miocárdio e vasodilatação. Colapso cardiovascular súbito pode ocorrer quase que imediatamente após a injeção de um anestésico local. A ressuscitação é geralmente difícil e demorada (Kasten e Martin, 1985; Thomas et al., 1986; Clarkson e Hondeghem, 1985).

As reações alérgicas são raras, especialmente, com os amídicos, mas quando ocorrem colocam a vida do paciente em risco. Os aminoésteres são mais alergênicos do que os aminoamidas, porque suas moléculas tem relação com o ácido para-aminobenzóico (Nagel et al, 1977; Hutter, 1990; Ferreira, 1999; Berde & Strichartz, 2000). Embora os anestésicos do tipo aminoamida pareçam ser relativamente livres de reações de hipersensibilidade, soluções desta droga podem conter preservativos, metilparabeno, que tem estrutura química similar ao ácido p-aminobenzóico.(Berde e Strchartz, 2000; Hondeghem e Miller, 1995).

O único efeito colateral associado com um anestésico local específico é o desenvolvimento de metemoglobinemia seguindo a administração de altas doses de prilocaína (Berde e Strichartz, 2000).

### **1.1.8. Anestésicos Locais em Odontologia**

Anestesia local corresponde ao bloqueio reversível da condução nervosa, determinando perda das sensações sem alteração nos níveis de consciência (Ferreira, 1999). Com a infiltração anestésica pode-se promover o bloqueio da condução nervosa em grandes ou pequenas áreas, na dependência do local que se elege para a deposição do anestésico (Bombana, 1985).

Os anestésicos locais são classificados em agentes de duração de efeito intermediária como lidocaína, prilocaína e mepivacaína; e de longa duração, em que se situam tetracaína, ropivacaína, bupivacaína e etidocaína. (Ferreira, 1999).

As anestésias locais mais comumente utilizadas em odontologia são as terminais e as por bloqueio. As anestésias terminais são aquelas em que o agente anestésico atua nas terminações nervosas, podendo ser superficiais (quando a ação do agente anestésico acontece através do contato superficial) ou infiltrativas (quando a ação do anestésico acontece pela sua infiltração nos tecidos). As anestésias por bloqueio podem ser subdivididas de acordo com o local de deposição da solução anestésica em regionais ou tronculares. Nas anestésias regionais o ramo nervoso é insensibilizado, promovendo anestesia das regiões por ele inervadas. Nas anestésias tronculares o agente anestésico é depositado ao nível do tronco nervoso, insensibilizando várias áreas por ele inervadas (Bombana, 1985; Marzola, 1989).

Quando deseja-se anestesia de apenas um dente ou pequena área, seria desnecessário, e até mesmo inconveniente, recorrer-se a uma complicada técnica extra-oral ou a profunda anestesia por bloqueio regional, quando uma técnica infiltrativa seria suficiente. Entretanto, quando a duração é desejada, a anestesia

por bloqueio pode ser o método de escolha; também, quando na presença de infecção, este tipo de anestesia é mais aconselhado. (Marzola, 1989)

A seleção de um anestésico local para aplicação dentária deve incluir considerações de eficiência, segurança e necessidades do paciente e cirúrgicas. (Yagiela, 1991)

A introdução da amida lidocaína, em 1941, marcou significativo avanço sobre as preparações do tipo éster até então disponíveis. O cloridrato de lidocaína a 2% com adrenalina permanece insuperável como anestésico dentário de uso rotineiro. Além da lidocaína foram desenvolvidas e largamente comercializadas outras amidas que possuem vantagens semelhantes na estabilidade, não alergenicidade e eficácia sobre os fármacos do tipo éster (Yagiela, 1991).

A mepivacaína, introduzida em 1957, é geralmente equivalente à lidocaína em seu perfil farmacológico. A prilocaína é a alternativa menos potente e menos tóxica que a lidocaína. Os anestésicos locais para odontologia introduzidos mais recentemente são as drogas altamente lipofílicas como a bupivacaína e etidocaína. (Yagiela, 1991)

A bupivacaína usada inicialmente em 1963, mas só comercializada em cartucho dentário em 1983, tem início de ação um pouco mais lento do que as amidas, mas é igualmente eficaz e possui duração muito maior, tornando-a adequada para alívio da dor pós-operatória em cirurgia oral. (Yagiela, 1991, Ferreira, 1999). Sua latência é mais vagarosa do que aquela obtida com lidocaína e com mepivacaína, mas difere dessas drogas por produzir um tempo de duração de analgesia muito maior. Esse tempo chega a ser quase o dobro

daquele obtido com a lidocaína; assim, se uma cirurgia de grande porte sob analgesia local for considerada, a bupivacaína deverá ser a droga de escolha (Roberts e Sowray, 1995).

A benzocaína, pouco solúvel em água, tende a permanecer no local da aplicação e não é facilmente absorvida pela circulação sistêmica. É disponível em várias preparações; uma concentração a 20% na forma de gel, pomada, pasta e solução e, é bastante utilizada em odontologia para proporcionar anestesia tópica e diminuir a dor da penetração da agulha das anestésias intra-orais (Yagiela, 1991).

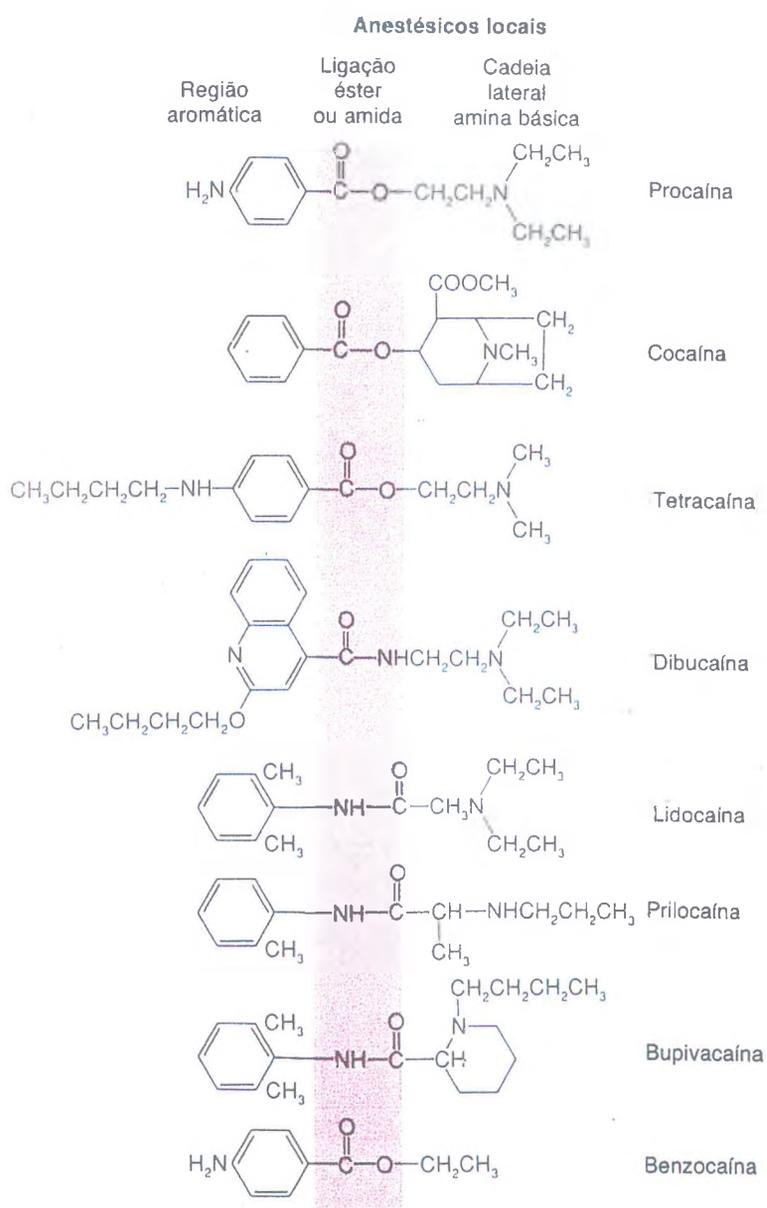


Figura 1. Fórmulas estruturais dos anestésicos locais clássicos.

Fonte: Rang et al, 1995.

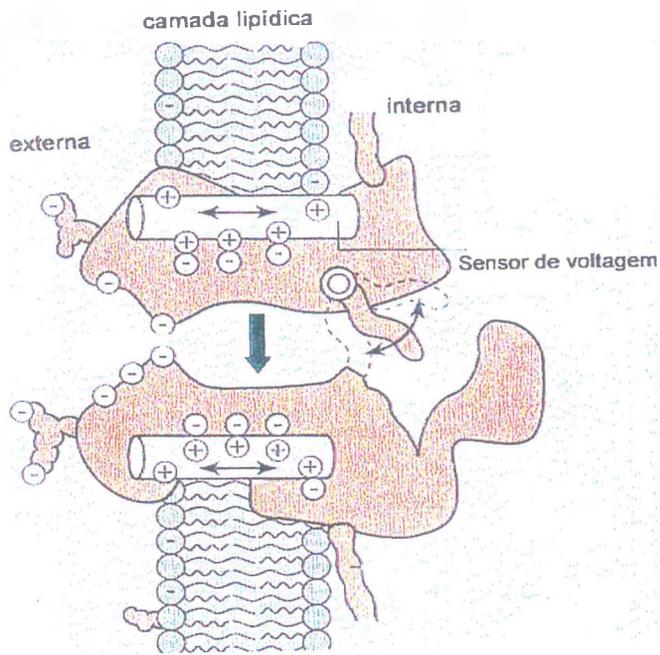


Figura 2. Desenho esquemático do canal de sódio sensível à voltagem, presente na membrana celular neuronal. A seta (↓) indica a posição do receptor no canal, específico para os anestésicos locais.

Fonte: Hille & Catterall, 1994.

## 1.2. ANFÍBIOS

### 1.2.1. Evolução

O termo anfíbio é oriundo do grego *amphibios* (*amphi*, dual + *bios*, vida) indica que a maioria das espécies vive tanto na água quanto na terra (Storer & Singer, 1985; Duellman, 1992; Lazarus & Attila, 1993).

Os anfíbios são membros da Classe Amphibia, Subfilo Vertebrata, Filo Chordata e Reino Animalia e se subdividem nas seguintes ordens: Anura ou Salientia (sapos, rãs e pererecas), Urodela ou Caudata (salamandras e tritões) e Apoda ou Gymnophiona (cobras-cegas ou cecílias). (Storer & Singer, 1985; Duellman & Trueb, 1986; Sebben et al, 1993).

Os Amphibia situam-se filogeneticamente entre os peixes e os répteis sendo os primeiros Tetrápoda (gr. Tetra = quatro; podos = pé) vertebrados terrestres ou seja, foi o primeiro grupo de Cordata a viver fora da água (Storer & Singer, 1985; Duellman, 1992; Lazarus & Attila, 1993). Os primeiros anfíbios reconhecidos (*Ichthyostega* - extinto) estão em rochas do Devoniano na Groelândia e tinham tamanho considerável, pois seus crânios medem 15 cm de comprimento. Descendiam provavelmente de peixes crossopterígeos, tinham tanto respiração aquática como aérea e possuíam nadadeiras como suportes esqueléticos dos quais as pernas dos tetrápodes poderiam ter-se originado (Storer & Singer, 1985). A mudança do ambiente aquático para o terrestre aconteceu em função da gradual aquisição de um grupo de adaptações morfofuncionais e comportamentais (Toledo & Jared, 1995).

A transição da água para a terra envolveu: modificação do corpo para andar em terra firme retendo ainda a capacidade de nadar, desenvolvimento de pernas em lugar de nadadeiras pares, modificações na pele para facilitar a respiração, maior ênfase na respiração pulmonar, geralmente com perda das brânquias nos adultos, modificações no aparelho circulatório para permitir a respiração pelos pulmões e pele, modificações no metabolismo e na excreção para formar menos produtos nitrogenados tóxicos de excreção e aquisição de órgãos dos sentido que funcionam tanto no ar como na água (Storer & Singer, 1985).

A maioria desses animais, no entanto, apresenta um tegumento pouco adaptado à vida estritamente terrestre, uma vez que não serve, em geral de barreira à troca de água entre o corpo e o ambiente. Conhecem-se, todavia, adaptações em várias espécies de anfíbios, que tendem a evitar a perda de água através da pele (Toledo,1984; Storer & Singer, 1985; Monti & Cardelo,1994). Como não são protegidos estruturas como espinhos, garras e dentes afiados, desenvolveram um elaborado sistema de glândulas cutâneas que secretam veneno como proteção contra os predadores (Storer & Singer, 1985; Monti & Cardello, 1994). A retenção de mecanismos secretórios na pele de anfíbios durante sua evolução foi a maior contribuição para a sobrevivência em um novo habitat. (Lazarus & Atilla, 1993).

Embora algumas espécies contenham toxinas extremamente potentes, esses animais são inofensivos ao homem por não possuem mecanismos para inocular o veneno ou por sua natureza pacífica (Sebben et al., 1993). Os anuros tóxicos mais importantes são os sapos da família Bufonidae; rãs das famílias

Atelopodidade, Dendrobatidae, Discoglossidae, Hylidae, Pipidae, Ranidae e certas salamandras do gênero *Salamandra* (Barravieira, 1994).

Assim, os anfíbios não trazem prejuízos ao homem pois não se alimentam de frutas ou grãos (como muitas aves, roedores, insetos), não são agressivos (como certos carnívoros), não transmitem enfermidades graves ( como muitos insetos e mamíferos), nem possuem mecanismos para inoculação de veneno (como as serpentes, certos peixes, os aracnídeos e alguns insetos). Além disso cumprem importante papel no controle das populações de insetos e outros invertebrados, o ítem principal de sua dieta alimentar ( Sebben et al., 1993).

### **1.2.2. Distribuição**

Os anfíbios são os vertebrados terrestres mais abundantes em muitas florestas tropicais e ocupam uma grande extensão de ambientes, de desertos áridos a águas profundas. Alguns sapos, pererecas e outros anfíbios vivem nos desertos, como no deserto do sudoeste da América do Norte e na Austrália, onde se escondem em buracos na terra durante os períodos secos, são noturnos e tem desenvolvido uma série de adaptações para fugir da desidratação em algumas das áreas mais quentes do mundo (Storer e Singer, 1985). Outros são encontrados no norte do Círculo Polar Ártico e podem tolerar temperaturas muito baixas. A capacidade dos anfíbios de sobreviver em vários tipos de habitats pode ser atribuído a evolução de muitos diferentes adaptações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e comportamentais (Clarke, 1996).

Os Bufonídeos pertencem a família mais amplamente distribuída por todos os continentes exceto na Austrália, Madagascar e regiões oceânicas. Por outro lado, é uma das mais numerosas famílias em espécies da classe Amphibia (Rossi et al, 1997).

As descrições de declínio das populações de anfíbios em várias partes do mundo são numerosas. A redução do número de anfíbios preocupa os especialistas pelo fato de serem consideradas excelentes indicadores ecológicos da saúde do ambiente (Pechmann et al., 1991).

### **1.2.3- Características Gerais**

Todos os anfíbios precisam evitar temperaturas extremas e a seca, pois não resistem bem à desidratação. Durante o inverno sapos enterram-se ou vão até abaixo da linha de congelação e salamandras terrestres entram em fendas ou buracos de outros animais, rãs e salamandras aquáticas hibernam no fundo de lagos e rios que não congelam (Storer & Singer, 1985). Durante a hibernação todos os processos vitais são reduzidos, o batimento cardíaco é lento e o animal subsiste de material armazenado no corpo, incluindo o glicogênio do fígado. A maioria das espécies de zonas temperadas tem uma época definida para sair da quiescência devendo ser durante a primavera ou outono sendo a saída desencadeada por oscilações de temperatura e/ou chuva (Storer & Singer, 1985).

Os anfíbios resistem à dessecação por meios comportamentais, estruturais e fisiológicos. (Storer & Singer, 1985).

A respiração cutânea limita a extensão pela qual a pele pode tornar-se impermeável já que a água geralmente é absorvida e perdida rapidamente através da pele. Entretanto, alguns anfíbios, especialmente as espécies terrestres, têm uma camada gelatinosa de um mucopolissacarídeo ácido na derme, que resiste fortemente à perda de água sendo capaz de manter a água absorvida pela pele e de libertá-la aos tecidos quando necessário. A maioria dos anfíbios, mesmo quando fortemente desidratada, pode restaurar a água do corpo dentro de poucas horas por meio de contato com uma superfície úmida. Em superfícies úmidas algumas espécies movimentam rapidamente a água para cima por meio de capilaridade para absorção e respiração ao longo de sulcos cutâneos (sulcos costais de salamandras e rugas na pele dos sapos). (Storer & Singer, 1985).

Alguns mecanismos fisiológicos são: liberação de secreção da hipófise (arginina-vasotensina) que reduz a quantidade de água que sai pelos rins (efeito antidiurético) promovendo a absorção de água pela pele e a reabsorção de água armazenada na bexiga; aumento de retenção de uréia, elevando a osmolaridade dos tecidos e promove a absorção de água e reduz a perda de água para o solo e aumento da tolerância dos tecidos à perda de água (Storer & Singer, 1985).

Os ajustamentos comportamentais incluem: redução da superfície externa do corpo-dobrando as pernas, fechando os olhos, achatando o corpo, enrolando o corpo e a cauda; retirada para lugares úmidos como fendas, madeira em decomposição ou tocas de animais; cavar e permanecer inativos durante o tempo seco (Storer & Singer, 1985).

Os anuros possuem a pele mole, lisa e úmida. A cabeça apresenta uma ampla boca, pequenas narinas valvuladas, grandes olhos esféricos e, atrás de cada olho,

um tímpano achatado ou membrana timpânica. Cada olho possui uma pálpebra superior carnosa e opaca e uma inferior menor. Internamente a elas existe uma terceira pálpebra transparente que se assemelha funcionalmente a membrana nictitante dos vertebrados superiores. Ela move-se para cima sobre o globo ocular para conservá-lo úmido no ar e para protegê-lo dentro da água (Storer & Singer, 1985).

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

Os pulmões, nesse grupo de vertebrados, são considerados estruturas pouco eficientes, possuem uma superfície interna limitada com alvéolos simples. Desta forma, a pele dos anfíbios, permeável, úmida sem escamas e bem irrigada por vasos sanguíneos assume importância especial nas trocas gasosas (Storer & Singer, 1985).

#### **1.2.4. A pele e glândulas cutâneas**

A pele dos anfíbios é um complexo órgão morfológico, bioquímico e fisiológico que desempenha uma série de funções vitais, destacando-se a respiração, o transporte de água e solutos, a regulação da temperatura corpórea e defesa contra microorganismos e predadores (Habermehl, 1981; Sebben et al., 1993; Clarke, 1996). Sua tonalidade escura como sombras do castanho ao negro é

produzida pela melanina, um pigmento escuro, usualmente encontrado nos melanócitos nos quais o pigmento pode encontrar-se disperso ou concentrado sob ação hormonal (Stebbins e Cohen, 1995).

Nos anfíbios as secreções cutâneas são geralmente, produto de dois tipos de glândulas identificadas na derme desses vertebrados: as glândulas mucosas e as granulosas. Outros tipos glandulares têm sido descritos na pele de anfíbios mas restringem-se a determinadas espécies (Toledo, 1984).

As glândulas mucosas são usualmete menores e mais numerosas que as glândulas granulosas e eliminam um muco altamente hidrofílico (Toledo e Jared, 1995). 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 e, em algumas dessas secreções verifica-se certa toxicidade (Habermehl, 1981, Toledo, 1984; Storer & Singer, 1985; Monti & Cardelo, 1994). Além disso, ele é responsável pelo controle do pH e grau de umidade da pele proporcionando condições adequadas para a respiração cutânea (Toledo e Jared, 1995).

A secreção mucosa é importante durante o periodo de mudança da pele que ocorre periodicamente nos anfíbios. Nessa época uma secreção mucosa pode ser observada entre camadas córneas que se destacam e as camadas epidérmicas subjacentes. O muco deve facilitar o desprendimento de camadas celulares da epiderme durante a muda talvez exercendo pressão sob essas camadas. Ele também é responsável pela lubrificação da pele de anfíbios que submergem por um certo período (Toledo, 1984).

As glândulas nupciais de alguns anuros, que atingem seu desenvolvimento máximo durante o período de reprodução são, provavelmente, homólogas às glândulas mucosas, o mesmo ocorrendo com as glândulas de reprodução ou esternais de pererecas do gênero *Gastrophryne* (Toledo, 1984).

Muito embora a secreção mucosa possa exercer um papel defensivo, é a secreção granulosa a principal responsável pela defesa passiva dos anfíbios devido ao fato de ser tóxica para as diversas espécies de vertebrados (Toledo, 1984).

A localização das glândulas granulares varia entre as diferentes espécies de anfíbios, podendo estar dispersas ou concentradas em uma determinada região da pele do animal (Whitewar, 1977; Toledo & Villa, 1987; Reilly et al., 1994). Nos sapos comuns como o *Bufo paracnemis* é evidente a presença, atrás dos olhos, das glândulas parotóides, um acúmulo de glândulas granulosas capazes de estocar grande quantidade de secreção (Figura 3). A estas glândulas se atribuem as funções de produção e armazenamento de substâncias bioativas, que algumas espécies liberam sobre a pele do animal em situação de estresse (Sebben et al., 1993).

O conteúdo glandular é secretado sob regulação hormonal, presumivelmente mediado por neuropeptídeos e ocorre sob resposta a uma posição de defesa comportamental contra predadores. As glândulas depletam rapidamente 80-90% de seus conteúdos (Iwamuro et al, 1991; Giovannini et al, 1987). A sua regeneração consiste em um rearranjo em monocamadas de células secretórias intactas sobre a superfície luminal, dentro das quais são formadas de modo

contínuo os grânulos de estocagem. Três a quatro semanas são necessárias para a regeneração completa da glândula (Camarão, 1995).

As glândulas granulares sintetizam e estocam produtos para a secreção, que incluem cinco grandes grupos; peptídios, sendo um grupo com atividade antimicrobiana e outro com princípio bioativo; proteínas, substâncias proteináceas e enzimas; esteróides; alcalóides e aminas biogênicas (Erspamer, 1984; Roseghini et al., 1986; Lazarus & Attila, 1993; Carvalho, 1995).

Há uma grande variedade de peptídios na secreção cutânea dos anfíbios; a maioria exibe uma potente atividade biológica em mamíferos, incluindo taquicininas, bradicininas, ceruleínas, bombesinas, opióides, xenopsinas, hormônio liberador de tireotropina, angiotensina; um outro grupo apresenta atividade antimicrobiana, tais como as magaininas, PGLa, XPF, LPF e CPF (Carvalho, 1995).

As proteínas secretadas da pele dos anfíbios são várias, algumas das quais já foram isoladas e clonadas (Berger & Kreil, 1989; Gmachl et al., 1990). São elas responsáveis por vários efeitos farmacológicos e servem muitas vezes de modelo para a descoberta de novas funções fisiológicas de mamíferos (Carvalho et al., 1992).

Os esteróides identificados no veneno de sapos classificam-se em cardiotônicos e não-cardiotônicos. As bufogeninas, também denominadas bufaginas ou bufadienolídeos, e as bufotoxinas são os esteróides cardiotônicos encontrados em maior concentração no veneno dos sapos e são produzidas através do metabolismo do colesterol (Toledo & Jared, 1995).

Os esteróides não-cardiotóxicos no veneno de sapos são ergosterol, colesterol e  $\alpha$ -sisterol (Zelnik et al.,1964; Chen & Kovarikova,1967;Toledo & Jared,1995).

Os alcalóides, na sua maioria, vêm de rãs neotropicais do gênero *Dendrobates* e *Phyllobates*, família Dendrobatidae (Daly et al, 1987). Incluem batracotoxinas, histrionicotoxinas, indolizidinas, pumiliotoxinas-A, decahidroquinilonas e numerosas classes menores, como gefirotóxicas, alcalóides pirrolidínicos, piridil-piperidinas, indolalcalóides, azatriciclododecenos, alcalóides amidínicos, morfina e tetrodotóxicas (Daly et al, 1987; Lazarus et al, 1994; Daly,1995). Há indicativos que muitos dos alcalóides de anfíbios derivam de insetos que formam a maior parte da dieta de rãs dendrobatídes (Clarke, 1996).

A classe das aminas biogênicas consiste de três grupos distintos, as indoalquilaminas, imidazolalquilaminas e fenilalquilaminas (Erspamer, 1984; Lazarus et al., 1994; Clarke, 1996). Destacam-se entre outras aminas biogênicas os derivados feniletilamínicos, que incluem adrenalina, noradrenalina e dopamina (Lazarus et al., 1994) e derivados triptamínicos como a 5-hidroxitriptamina ou serotonina (Erspamer, 1984; Lazarus & Attila, 1993).

### **1.2.5.Bufadienólídeos**

Os bufadienólídeos pertencem a classe de esteróides que ocorre no veneno e na pele dos anfíbios, e em alguns extratos teciduais de plantas. Também tem sido isolados de vegetais, frutas e serpentes. (Rossi et al. 1997). O plasma de

mamíferos contém material imunorreativo semelhante ao bufadienolídeo marinobufagina. Em humanos é observado fatores tipo digitálico, estruturalmente semelhante ao marinobufagina ou ao seu isômero, inibidor endógeno da  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase (Bagrov et al, 1998; Steyn & Van Heerden, 1998; Krenn & Kopp, 1998).

No reino animal, os bufadienolídeos estão amplamente difundidos na família Bufonidae e vários deles já foram isolados do gênero *Bufo*, sendo na sua grande maioria derivados de esteróides (Porto e Gross, 1971; Rossi et al, 1997). Estudo do veneno das glândulas parotóides do *Bufo paracnemis* identificaram os seguintes compostos: sistoterol, argentinogenina, bufalina, bufotalinina, gamabufotalina, helebrigenina, helebrigenol, marinobufogenina, resinobufogenina e telecinobufagina (Rossi et al, 1997).

Bufadienolídeos consistem de um anel esteróide ligado ao grupo lactona (Meyer, 1996). A estrutura dos bufadienolídeos no sapo é semelhante a esteróides cardioativos de plantas, exceto que no sapo, os bufadienolídeos não possuem açúcares ligados ao C-3 no anel. Eles têm um anel lactônico de seis membros, no lugar do anel de cinco membros, duplamente insaturados no anel na posição do C-17 (Browlee et al, 1990).

O potencial médico-farmacêutico dos produtos derivados das secreções tóxicas de *Bufo* é bastante conhecido. Relatos históricos revelam o uso de uma preparação comercial obtida a partir do veneno seco do sapo *Bufo bufo gargarizans*, o secular Ch'an Su (ou Senso). Trata-se provavelmente do primeiro e mais antigo uso de um veneno de origem animal em terapêutica. Seus empregos, bastante diversificados, envolvem desde a cicatrização de feridas da pele, controle de hemorragias de mucosas, até alívio de dor de dente e resfriados.

Foi também utilizado no tratamento de doenças cardíacas sendo abolido por não apresentar vantagens em relação aos digitálicos (Toledo & Jared, 1989; Hong et al, 1992).

Bufogeninas e bufotoxinas agem de maneira similar aos extratos digitálicos e, na concentração que eles ocorrem no veneno são cardiotoxícos para os mamíferos. Bufogeninas são inibidoras da enzima  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  e são provavelmente envolvidas na homeostase de água e sal dos sapos. Estes esteróides aumentam a pressão arterial e são, em geral, mais ativos que as bufotoxinas, e ambas, mesmo em concentrações diluídas estimulam a musculatura uterina e intestinal de alguns mamíferos (Toledo & Jared, 1995).

Muitos desses esteróides têm propriedades anestésicas superficiais. Uma atividade anestésica local, superficial foi identificada em 1976, de um bufodienolídeo, a bufalina, isolado do *Ch'na Su*, sem outras citações na literatura de demais bufogeninas com essa atividade. Sua atividade anestésica local na córnea de cobaias é mais intensa que a da cocaína (Toledo & Jared, 1989).



**Figura 3.** Sapo *Bufo paracnemis* da região de São Gonçalo do Amarante - Ceará

## 1.3 OBJETIVOS

### 1.3.1.Gerais

Isolar e estudar o efeito anestésico local de uma nova substância extraída do veneno do *Bufo paracnemis*.

### 1.3.2.Específicos

1-Purificar totalmente uma nova substância anestésica local do veneno do Bufo paracnemis.

2- Avaliar a ação anestésica local da nova substância através do método de estimulação da polpa dentária do coelho.

3- Comparar a potência e duração da ação anestésica local dessa substância, com os anestésicos locais clássicos: lidocaína e bupivacaína.

## 2-MATERIAL

### 2.1-Animais

Para a realização deste trabalho foram utilizados coelhos (machos e fêmeas), adultos , pesando entre 2 e 3 kg, oriundos do Biotério Central da Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará e mantidos no Laboratório de Neurofarmacologia da Universidade Estadual do Ceará durante todo o experimento. Os animais foram alojados em gaiolas apropriadas onde tiveram livre acesso a água e ração.

Também foram utilizados sapos *Bufo paracnemis* coletados em diferentes épocas do ano,provenientes da região de São Gonçalo do Amarante, Ceará. Após extração do veneno os animais foram devolvidos a seu habitat.

### 2.2-Aparelhos

Centrifuga Excelsa Baby, modelo 206 –FANAEM

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

Coluna C-18 LC Shim-pack CLC-ODS

Coluna Shim-pack preparativa ODS (H) 2,5 x 30 cm

Chromatopac C-R6A, Shimadzu, Japão

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

HPLC – modelo SPD – 10 A, lc-10AS, Shimadzu-Japão.

Liofilizador Metal Lux

Luvas cirurgicas

Seringas de 500 ml com agulha

Papel de registro

Papel imperfax

Pena de quimiógrafo

Pipetas – Gibson França

Ponteiras Gibson França

Registrador EGB-SP, Brasil

Tubos de ensaios

Tubos Eppendorf – Gilson França

Agitador de tubos – modelo AP 56, marca PHOENIX

Balança Analítica – Marte AM/550 – marca AUTOMARTE

Liofilizador – modelo Modulyo, marca Edwards.

Polígrafo – Berger, modelo TP119

Eetroestimulador

Eletrodo

Caixa imobilizadora

Micromotor elétrico DENTEC 410P

Brocas esféricas de aço (1/4, 1/2 e 1)

### **2.3- Drogas e Reagentes**

Acetonitrila – Carlo Erba

Ácido trifluoroacético P.A, Merck, Brasil

Álcool etílico P.A; Merck, Brasil

Cloreto de sódio P.A; Reagem, Brasil

Cloridrato de Bupivacaína, Allergan Frumost

Cloridrato de Lidocaína, Allergan Frumost

DMSO – Dimetil sulfoxido P.A, Nuclear, Brasil

## 3-MÉTODOS

### 3.1-Extração

O veneno foi extraído por compressão das glândulas parotóides dos sapos.

O material coletado foi colocado em garrafa, macerado com pistilo com adição de etanol (1:3; p:v), até que toda a secreção glandular fosse dissolvida e se tornasse homogênea sendo mantida a 4° C durante 24 horas. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 5000 g por 20 minutos, o sobrenadante foi coletado e o material precipitado descartado.

### 3.2-Purificação

O sobrenadante foi fracionado em HPLC (sistema de cromatografia líquida de alta performance) acoplado a uma coluna preparativa C-18 de fase reversa (shim pack prep. ODS 2,5 x 30 cm), eluído com fluxo de 5ml/min com gradiente isocrático de acetonitrila a 40% (Figura 4). O material passou por um detector que usou uma absorção de luz ultravioleta com um comprimento de onda de 214 nm. O sistema é acoplado a um registrador e os picos, à medida que eluíam, eram coletados e liofilizados. Alíquotas de 200 µl dos picos ressuspendidos em DMSO (10% em água) foram aplicados na córnea de coelhos para a evidenciação da atividade anestésica local.

### **3.3- Determinação do grau de pureza**

Uma fração do pico ativo (20µl de solução a 0,5 mg/ml, com etanol e água bidestilada; 1:1; v:v) foi injetado em HPLC em uma coluna fina, analítica, específica, eluída em fluxo de 1 ml/min com um gradiente de 20 a 40 % de acetonitrila durante 35 min para a determinação do grau de pureza.

### **3.4- Determinação parcial da estrutura química do fator**

A determinação de estrutura química foi elucidada através de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), realizada no Centro Nordestino de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN), em colaboração com o Prof. Dr. Edilberto Rocha e Silveira.

A análise da RMN de alta resolução do fator purificado foi realizada através de seqüências modernas de pulsos tais como <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-COSY e NOESY, correlação heteronuclear (inversa) de carbono e hidrogênio do carbono-hidrogênio acoplados (Hector e HMQC), assim como as seqüências equivalentes de longa extensão (COLOC e HMBC). Foram assim, evidenciados peso molecular e a proposta química para o fator (Carvalho et al, 1999).

### **3.5-Diluição**

Para a realização dos testes farmacológicos, o pó foi ressuspenso em água bidestilada e DMSO.

### **3.6 -Ensaio farmacológico para estudo da atividade anestésica local em polpa de coelho**

A partir da fração com atividade anestésica local (pico 2), purificada do veneno do *Bufo paracnemis*, foram realizados testes farmacológicos para obtenção da potência e duração da anestesia. O pó liofilizado foi ressuspenso em DMSO 10% (v:v) e água bidestilada, e testado nas concentrações de 0,5%, 0,25%, 0,125% (p:v). No teste de estimulação da polpa dentária fez-se comparação com bupivacaína (0,5%, 0,25%, 0,125%) e lidocaína (2%, 1%, 0,5%), ambos sem adição de vasoconstrictor. Em todos os ensaios foram utilizados seis animais para cada dose das soluções anestésicas e do fator. Foi realizado o controle com veículo (DMSO a 10% em água bidestilada).

#### **3.6.1-Realização de cavidades**

Os animais foram imobilizados em caixas especiais onde foram realizadas cavidades nas superfícies distais dos incisivos superiores próximas a região gengival com brocas esféricas de aço e motor elétrico de baixa rotação, onde havia exposição dentinária. Mesmo que o animal já tivesse sido utilizado em um experimento anterior, novas cavidades foram realizadas já que a dentição permanente do coelho apresenta crescimento constante. (Michaeli et al., 1980;

Komatsu et al., 1998). Os animais somente eram utilizados novamente com período mínimo de 15 dias.

### **3.6.2-Teste de estimulação da polpa dentária.**

Um dia depois da realização das cavidades, um eletrodo ligado a um eletroestimulador foi inserido nas respectivas cavidades. Após um período de acomodação de 30 minutos, iniciou-se a estimulação elétrica para determinação do limiar de dor inicial (controle), antes da aplicação do anestésico local (Vogel e Vogel, 1997).

O estímulo foi determinado por pulsos isolados de 7.5 ms e altura do pulso correspondente ao limiar de dor (volts). Este limiar foi determinado por aumento e diminuição da altura de pulsos até que o animal apresentasse uma resposta padrão reflexa de lambida e mordida, resposta de movimentar a cabeça ou simples reflexo de contração muscular (Piercey e Schroeder, 1980; Vogel e Vogel, 1997). Duas leituras de dois pulsos a cada 10 segundos foram requeridas para a determinação de cada limiar de dor. Os animais que apresentaram limiar de dor (controle) menor que 6V ou maior que 9V foram excluídos do teste.

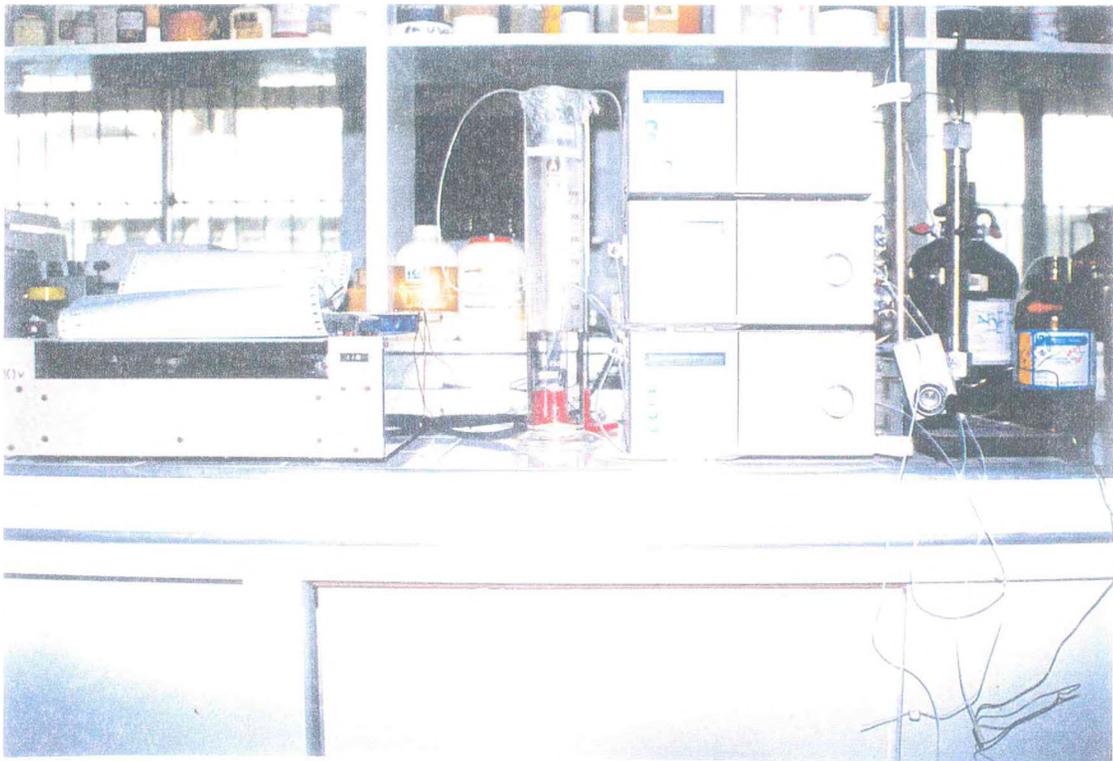
### **3.6.3-Analise comparativa de anestésicos**

Para comparação do efeito anestésico os incisivos foram anestesiados com lidocaína (2%, 1%, 0,5%), bupivacaína (0,5%, 0,25%, 0,125%) e fator (0,5%, 0,25%, 0,125%)

Os testes anestésicos foram feitos em grupos de seis coelhos machos e fêmeas, indistintamente. A anestesia dos incisivos se dava por infiltrações nas regiões vestibular e lingual de 0,6 ml de anestésico em cada animal, sendo 0,3 ml em cada dente (Figura 5). Após a anestesia, o limiar de dor (como indicador do efeito antinociceptor) foi testado a cada 10 minutos através de estímulos elétricos crescentes e decrescentes até 60 minutos. Após este período, a determinação deste limiar se deu a cada 15 minutos, até o final do efeito anestésico. (Figura 6).

### **3.7 – Métodos estatísticos**

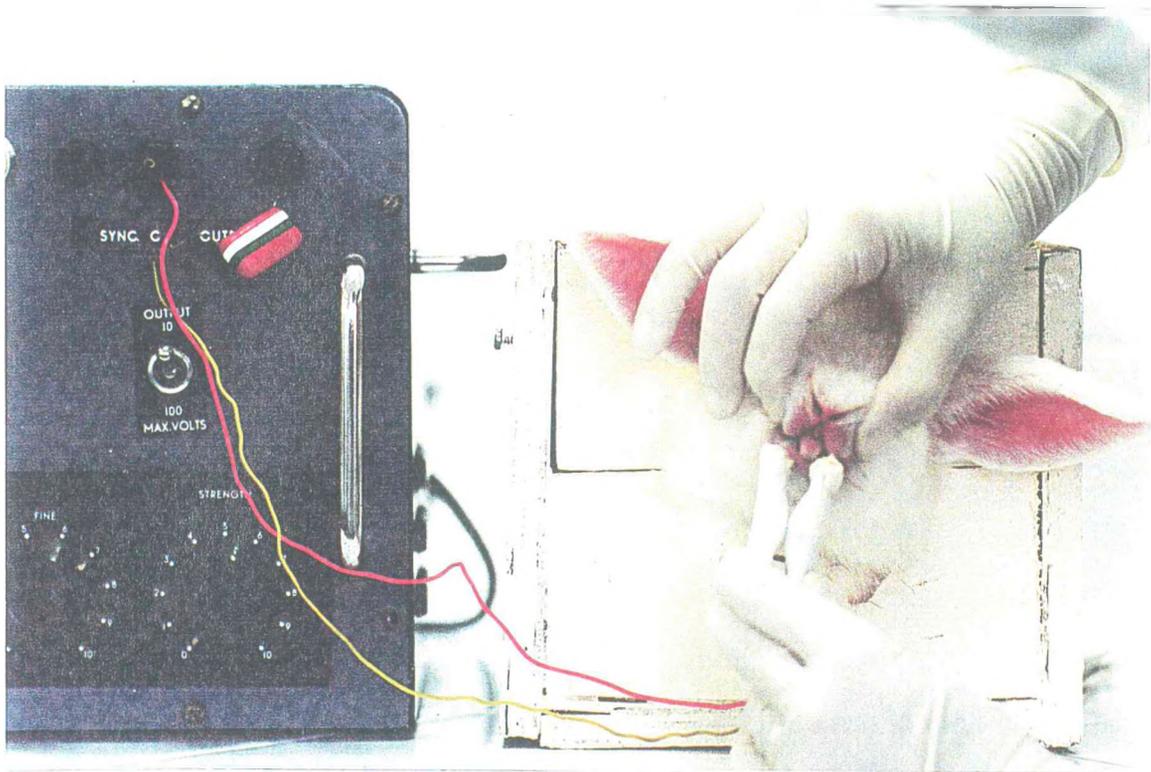
O teste de Turkey-Kramer foi usado para a determinação dos valores de significância estatística nos testes realizados para a avaliação da atividade anestésica local.



**Figura 4.** HPLC (High Performance Liquid Chromatography).



**Figura 5.** Anestesia infiltrativa na região vestibular do incisivo de coelho.



A



B

**Figura 6.** Coelho ligado ao eletroestimulador através de um eletrodo adaptado às cavidades realizadas nas superfícies distais dos incisivos do coelho para a realização do teste de estimulação da polpa dentária.

A- Coelho ligado ao eletroestimulador através do eletrodo

B- Detalhe da localização do eletrodo no dente do coelho

## **4-RESULTADOS**

### **4.1-Purificação**

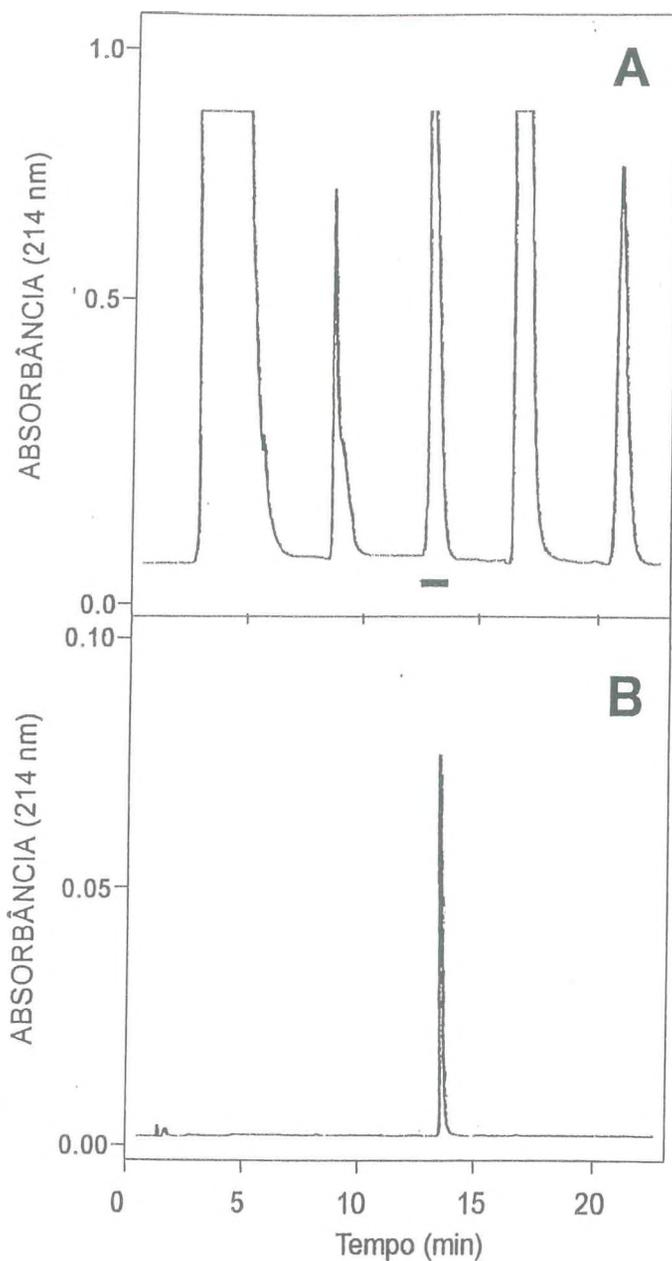
O veneno, obtido por compressão das glândulas parotóides de sapo foi fracionado em HPLC com coluna preparativa de fase reversa C18. Em cada cromatografia foram utilizados 1,7 ml do veneno dissolvido previamente em etanol (100%). Ao final, após liofilização do pico com atividade anestésica local, foram obtidos cerca de 5 mg do fator puro.

### **4.2-Determinação do grau de pureza**

O pico 2 foi injetado em HPLC com coluna analítica de fase reversa C18 e evidenciou-se a inexistência de outros picos, demonstrando o alto grau de purificação do material (Figura 7)

### **4.3-Determinação parcial da estrutura química**

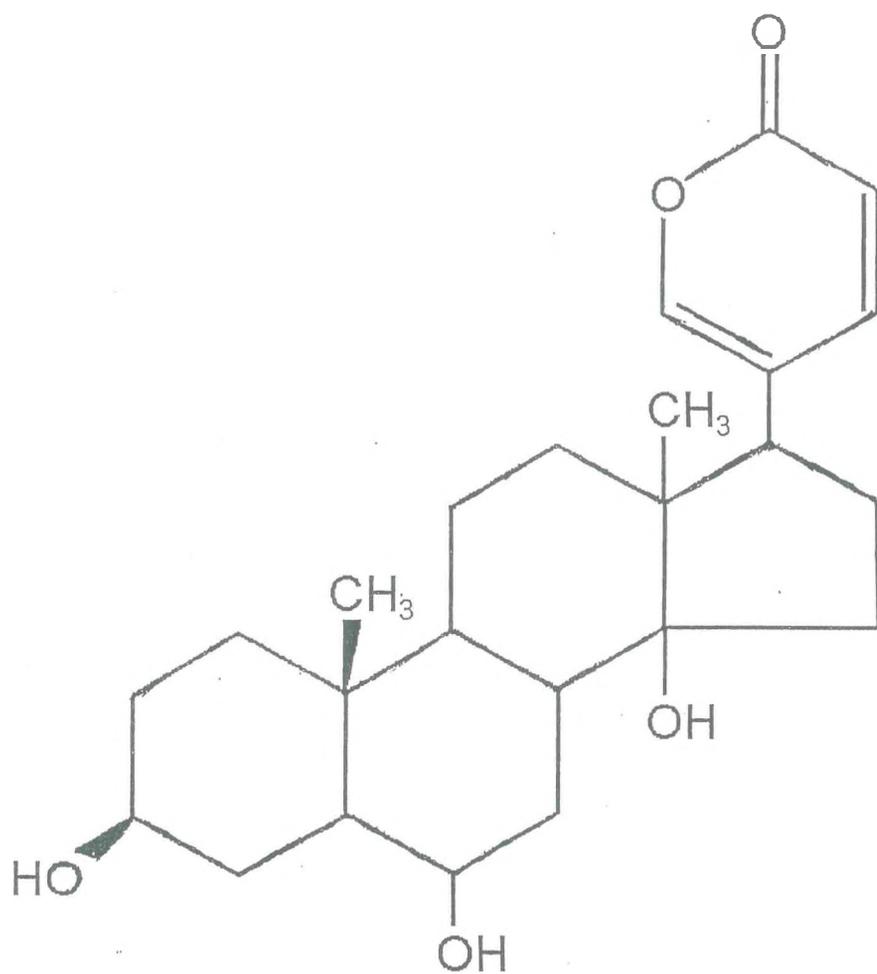
Os experimentos realizados (Centro Nordestino de Aplicação de Ressonância Magnética Nuclear, em colaboração com o Prof. Dr. Edilberto Rocha e Silveira) revelaram uma proposição estrutural parcial para o fator. Possui fórmula  $C_{24}H_{34}O_5$ , composta de um anel esteroidal e um grupamento lactona, e peso molecular de 402 Da. Essa estrutura parcial mostrou que o fator pertence ao grupo dos esteróides, da família das bufogeninas (Figura 8).



**Figura 7.** Cromatografia em HPLC.

A- Perfil de eluição do veneno das glândulas do *Bufo paracnemis*. O traço ( — ) indica o pico 2 (dois). O veneno foi solubilizado com etanol. Foram aplicados 1.7 ml do veneno bruto em coluna de HPLC e eluídos com gradiente isocrático de 40% de acetonitrila, contendo 0,05% de ácido trifluoroacético, com fluxo de 5 ml/min, monitorizada a 214nm.

B- Determinação do grau de pureza do pico 2. O pico 2 (dois) foi liofilizado. Foram injetados 20 µl do material ressuspendido em etanol, em coluna analítica, específica, eluídos com gradiente de 20 a 40% de acetonitrila, em 35 minutos e com fluxo de 1 ml/min, detectado a 214 nm.



**Figura 8.** Proposição estrutural do fator purificado do veneno das glândulas parotóides do *Bufo paracnemis*.

#### **4.4-Análise comparativa da atividade anestésica da lidocaína, bupivacaína e fator através do teste de estimulação da polpa dentária.**

A lidocaína a 2% apresentou um aumento significativo do limiar de dor em relação ao controle com nível de significância de  $p < 0,001$  até 40 minutos. O efeito máximo foi verificado aos 10 minutos ( $30 \pm 1,82$ ) após a injeção da lidocaína (figura 9).

Na dose de 1% a lidocaína apresentou aumento do limiar de dor em relação ao controle nos primeiros 30 minutos, com níveis de significância de  $p < 0,001$  e de  $p < 0,01$ . O máximo limiar de dor também foi verificado com 10 minutos ( $23,6 \pm 0,8$ ) após a injeção. (Figura 10).

A lidocaína a 0,5% não apresentou efeito estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ) em relação ao controle (Figura 11).

Na figura 12 foi feita a avaliação das atividades anestésicas da lidocaína a 2%, 1% e 0,5% através do teste de estimulação da polpa dentária. Nas concentrações de 1% e 2% foi observado que entre os tempos de 5 e 50 minutos houve diferença significativa entre todas as medidas do limiar de dor. Foi também observado que com as doses de 0,5% e 1% entre os tempos de 5 e 20 minutos houve diferença significativa entre todas as medidas do limiar de dor.

A bupivacaína a 0,5% apresentou um aumento significativo do limiar de dor em relação ao controle com nível de significância de  $p < 0,01$  aos 5 minutos e  $p < 0,001$  de 10 a 120 minutos. O efeito máximo foi verificado aos 50 minutos ( $32,16 \pm 1,64$ ) após a injeção da bupivacaína (figura 13).

Na dose de 0,25% a bupivacaína apresentou aumento do limiar de dor em relação ao controle nos primeiros 60 minutos, com níveis de significância de  $p < 0,001$  e de  $p < 0,01$ . O máximo limiar de dor foi verificado com 20 minutos ( $24,5 \pm 0,99$ ) após a injeção. (Figura 14).

A bupivacaína a 0,125% não apresentou efeito estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ) em relação ao controle (Figura 15).

A avaliação das atividades anestésicas da bupivacaína a 0,5%, 0,25% e 0,125% através do teste de estimulação da polpa dentária é mostrada na figura 16. Com as doses de 0,25% e 0,5% foi observado que entre os tempos de 40 e 90 minutos houve diferença significativa entre todas as medidas do limiar de dor. Foi também observado, que com as doses de 0,125% e 0,25% entre os tempos de 5 e 40 minutos houve diferença significativa entre todas as medidas do limiar de dor.

O fator a 0,5% apresentou um aumento significativo do limiar de dor em relação ao controle com nível de significância de  $p < 0,05$  aos 5 minutos,  $p < 0,001$  de 10 a 105 minutos e  $p < 0,01$  aos 120 minutos. O efeito máximo foi verificado aos 50 minutos ( $43,33 \pm 2,47$ ) após a injeção do fator (Figura 17).

Na dose de 0,25% o fator apresentou aumento do limiar de dor em relação ao controle nos primeiros 60 minutos, com níveis de significância de  $p < 0,001$  e de  $p < 0,01$ . O máximo limiar de dor foi verificado com 20 minutos ( $31,83 \pm 1,74$ ) após a injeção. (Figura 18).

O fator a 0,125% apresentou aumento do limiar de dor em relação ao controle apenas aos 10 minutos, com índice de significância estatística de  $p=0,03$  ( $9 \pm 1$ ) (Figura 19).

A figura 20 mostra a avaliação das atividades anestésicas do fator a 0,5%, 0,25% e 0,125% através do teste de estimulação da polpa dentária. Entre as doses de 0,25% e 0,5% não foi observada diferença significativa do limiar de dor nos tempos de 5 a 20 minutos ( $p>0,05$ ). Foi observado que entre os tempos de 30 e 105 minutos as medidas do limiar de dor da dose de 0,5% foram maiores que a de 0,25%, com índice de significância estatística de  $p<0,001$ . Foi também observado, que com as doses de 0,125% e 0,25% entre os tempos de 5 e 40 minutos houve diferença significativa entre todas as medidas do limiar de dor.

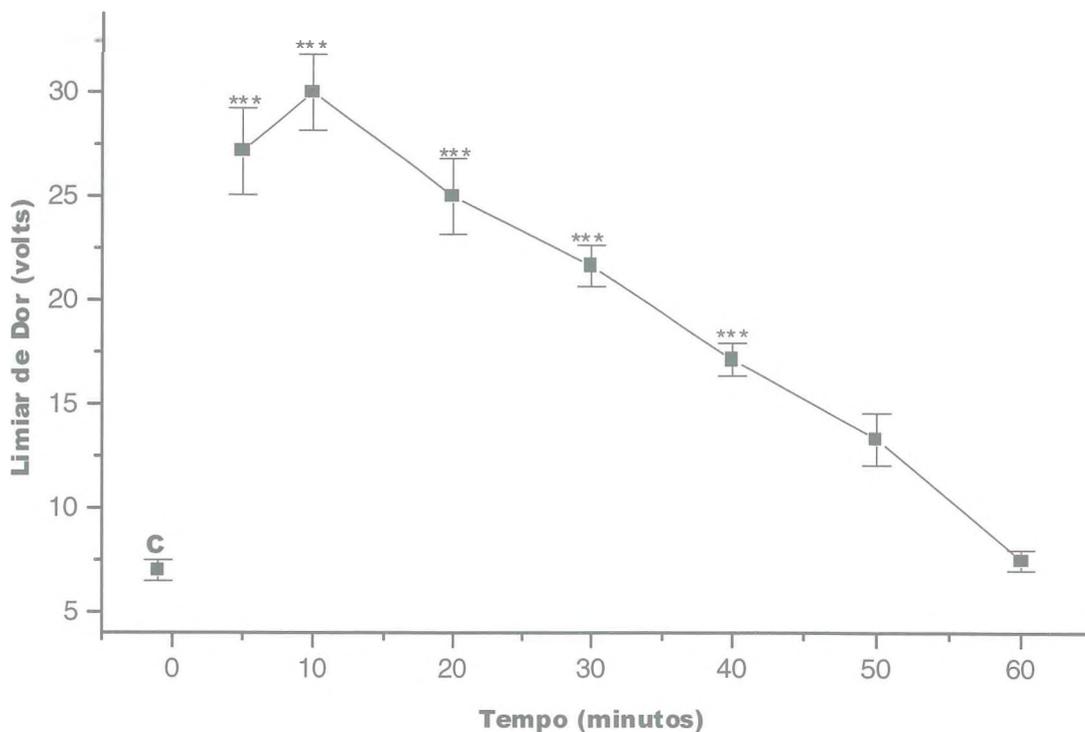
A comparação da atividade anestésica local do fator a 0,5% com a lidocaína a 2% mostrou um maior limiar de dor da lidocaína em relação ao fator de 5 a 10 minutos com níveis de significância estatística de  $p<0,05$  e  $p<0,001$ . Aos 20 minutos não houve diferença significativa deste limiar. Após o tempo de 30 minutos o limiar de dor obtido com o fator a 0,5% foi maior que o obtido com a lidocaína a 2% ( $p<0,001$ ). (Figura 21).

Na figura 22 foi feita uma comparação das atividades anestésicas do fator a 0,5% com a bupicavaína a 0,5%. Não houve diferença significativa de suas atividades anestésicas nos tempos de 5 a 20 minutos, bem como de 60 a 120 minutos. Entretanto, houve aumento significativo do limiar de dor do fator a 0,5% em relação a bupivacaína a 0,5% de 30 a 50 minutos, com níveis de significância estatística de  $p<0,01$  e  $p<0,001$ .

A atividade anestésica do fator a 0.25% com a lidocaína a 1% mostrou um maior aumento do limiar de dor da lidocaína a 1% em relação ao fator 0.25% aos 5 minutos com  $p < 0.01$ . Aos 10 minutos suas atividades anestésicas foram semelhantes. Após 20 minutos, a atividade anestésica do fator a 0.25% foi maior que a da lidocaína a 1%, com nível de significância estatística de  $p < 0.001$ . (Figura 23).

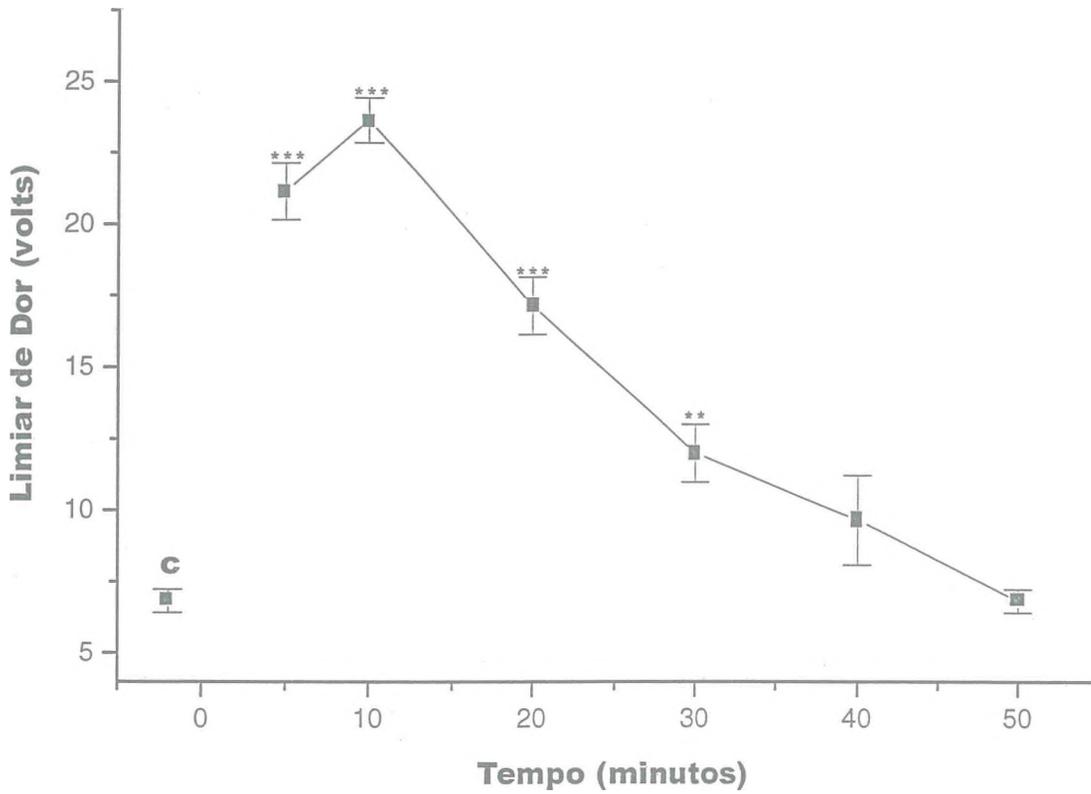
Na figura 24 foi feita uma comparação das atividades anestésicas do fator a 0.25% com a bupivacaína a 0.25%. Não houve diferença significativa de suas atividades anestésicas nos tempos de 5 a 10 minutos, bem como de 40 a 90 minutos. Houve aumento significativo do limiar de dor do fator a 0.25% em relação a bupivacaína a 0.25% de 20 a 30 minutos, com níveis de significância estatística de  $p < 0.05$  e  $p < 0.01$ .

Na figura 25 foi feita a comparação da atividade anestésica local máxima do fator a 0.125%, 0.25% e 0.5% com a bupivacaína 0.125%, 0.25% e 0.5% e com a lidocaína 2%, 1% e 0.5% utilizando o teste de estimulação da polpa dentária. Comparando-se os efeitos obtidos entre as doses de 0.5% da bupivacaína e 2% de lidocaína em relação à dose de 0.5% do fator observa-se que houve diferenças significantes ( $p < 0.001$ ). Comparando-se os efeitos de 0.25% da bupivacaína e 1% da lidocaína em relação à dose de 0.25% do fator, também observa-se que houve diferenças significantes ( $p < 0.01$  e  $p < 0.05$ , respectivamente). Entretanto, entre as doses de 0.125% da bupivacaína e 0.5% da lidocaína em relação à dose de 0.125% do fator não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0.05$ ).



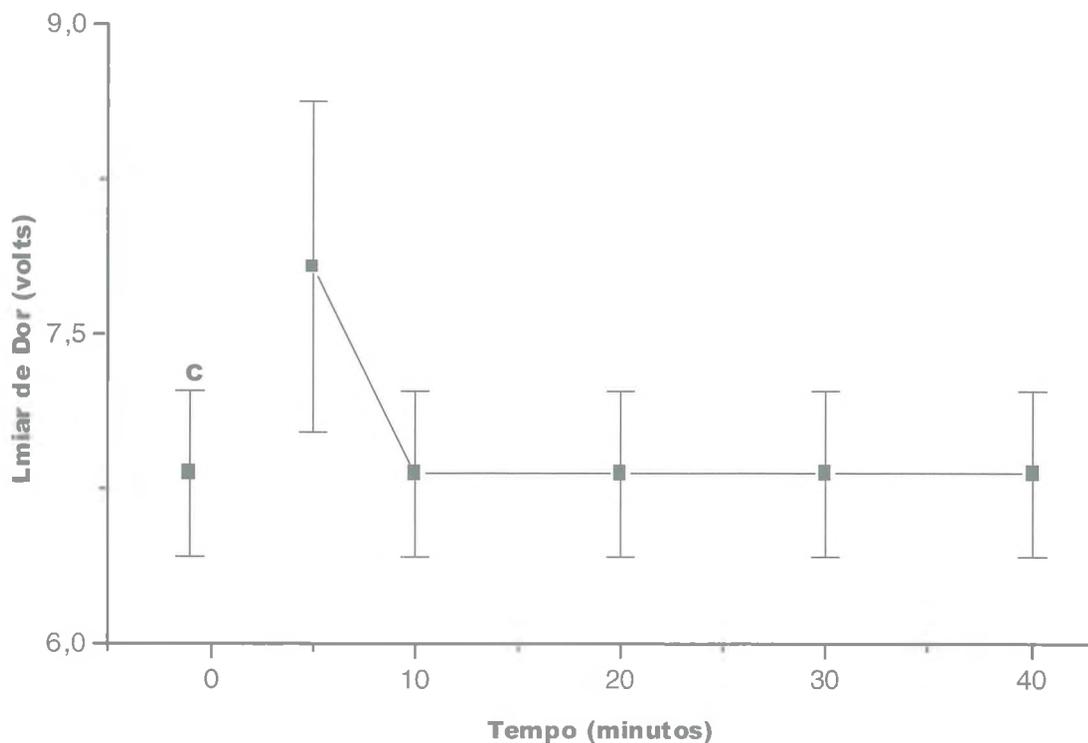
**Figura 9 – Avaliação da atividade anestésica local da lidocaína a 2% através do teste de estimulação da polpa dentária.**

Após a aplicação de 0,6ml do anestésico local através de infiltrações na região dos incisivos superiores do coelho obteve-se o limiar de dor (volts) através de uma resposta padrão de lambida e mordida. O tempo, em minutos, corresponde ao período em que o estímulo elétrico foi aplicado à polpa. O controle (c) equivale a determinação do limiar de dor antes da aplicação da lidocaína a 2%. Foram utilizados seis animais (n=6).\*\*\*(p< 0,001) indica o índice de significância estatística entre o limiar de dor do controle e o respectivo limiar nos vários tempos correspondentes ao estímulo da polpa.



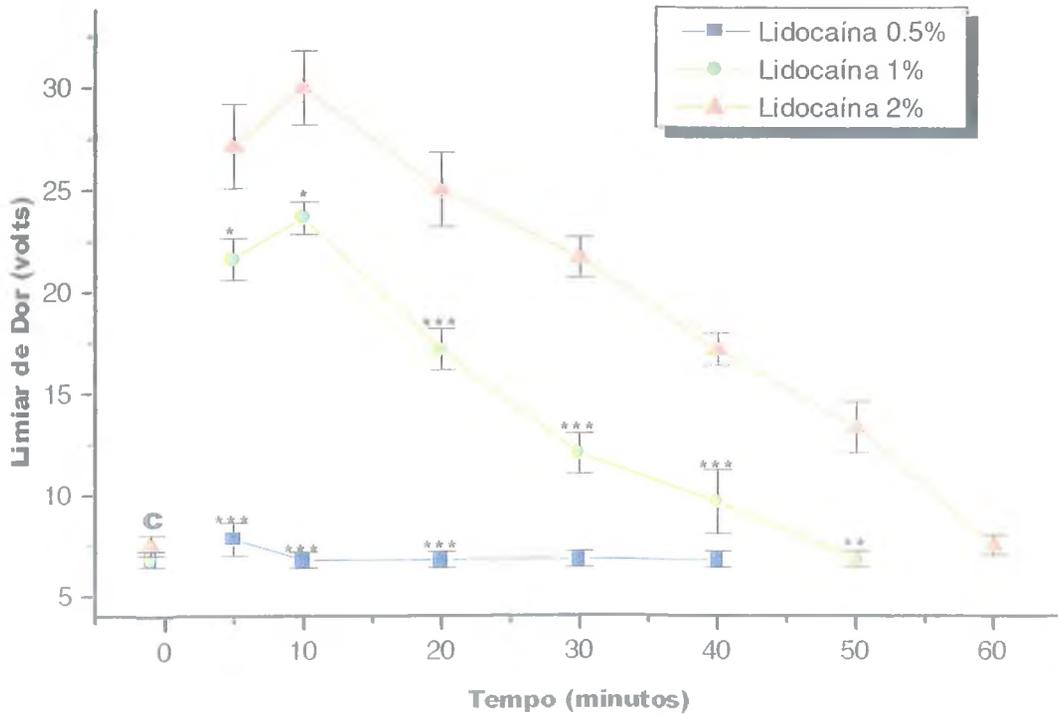
**Figura 10- Avaliação da atividade anestésica local da lidocaína a 1% através do teste de estimulação da polpa dentária.**

Após a aplicação de 0,6ml do anestésico local através de infiltrações na região dos incisivos superiores do coelho obteve-se o limiar de dor (volts) através de uma resposta padrão de lambida e mordida. O tempo, em minutos, corresponde ao período em que o estímulo elétrico foi aplicado à polpa. O controle (c) equivale a determinação do limiar de dor antes da aplicação da lidocaína a 1%. Foram utilizados seis animais (n=6). \*(p<0,01), \*\*\*(p< 0,001) indicam os índices de significância estatística entre o limiar de dor do controle e o respectivo limiar nos vários tempos correspondentes ao estímulo da polpa.



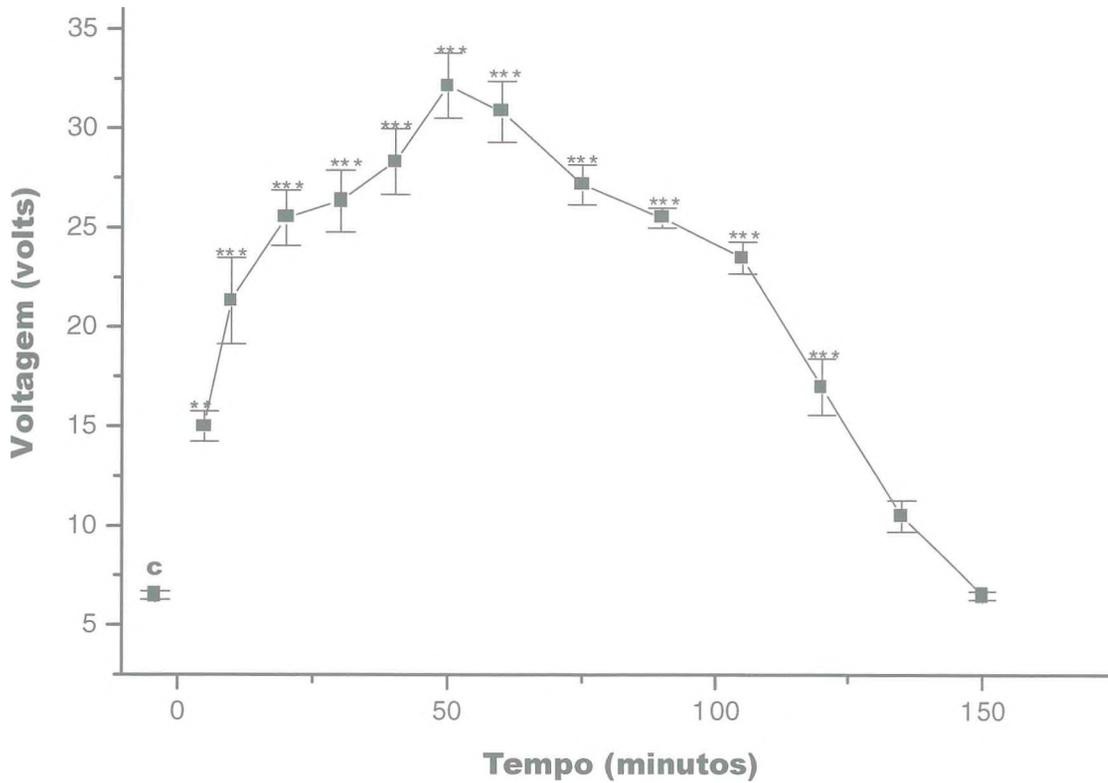
**Figura 11 -- Avaliação da atividade anestésica local da lidocaína a 0,5% através do teste de estimulação da polpa dentária.**

Após a aplicação de 0,6ml do anestésico local através de infiltrações na região dos incisivos superiores do coelho obteve-se o limiar de dor (volts) através de uma resposta padrão de lambida e mordida. O tempo, em minutos, corresponde ao período em que o estímulo elétrico foi aplicado à polpa. O controle (c) equivale a determinação do limiar de dor antes da aplicação da lidocaína a 0,5%. Foram utilizados seis animais (n=6).



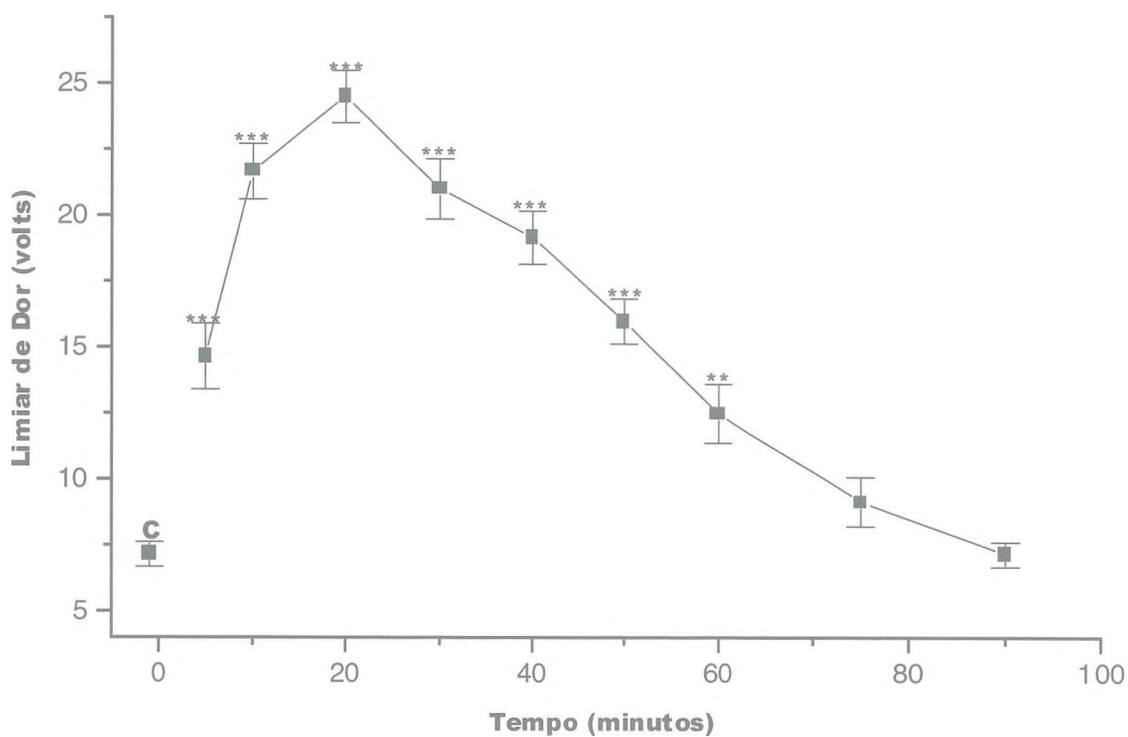
**Figura 12 -- Avaliação das atividades anestésicas locais da lidocaína a 2%, 1% e 0,5% através do teste de estimulação da polpa dentária.**

Após a aplicação de 0,6ml do anestésico local através de infiltrações na região dos incisivos superiores do coelho obteve-se o limiar de dor (volts) através de uma resposta padrão de lambida e mordida. O tempo, em minutos, corresponde ao período em que o estímulo elétrico foi aplicado à polpa. Os controles (c) equivalem a determinação do limiar de dor antes da aplicação da lidocaína a 2%, 1% e 0,5%. Foram utilizados seis animais (n=6) para cada concentração - \*(p<0,05), \*\*(p<0,01), \*\*\*(p<0,001) indicam o índice de significância estatística em cada um dos tempos utilizados para estimulação da polpa dentária entre as doses de 1% em relação à dose de 2% e a de 0,5% em relação à dose de 1%.



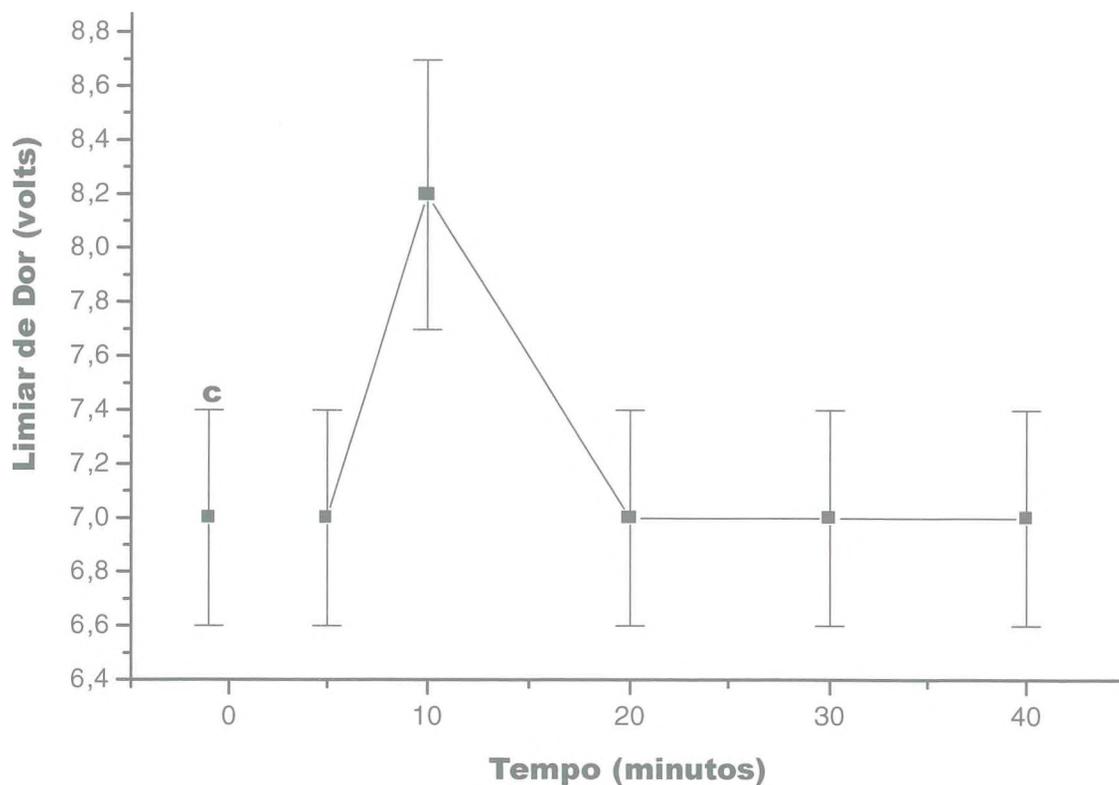
**Figura 13 - Avaliação da atividade anestésica local da bupivacaína a 0,5% através do teste de estimulação da polpa dentária.**

Após a aplicação de 0,6ml do anestésico local através de infiltrações na região dos incisivos superiores do coelho obteve-se o limiar de dor (volts) através de uma resposta padrão de lambida e mordida. O tempo, em minutos, corresponde ao período em que o estímulo elétrico foi aplicado à polpa. O controle (c) equivale a determinação do limiar de dor antes da aplicação da bupivacaína a 0,5%. Foram utilizados seis animais (n=6). \*\*\*( $p < 0,001$ ), \*\*( $p < 0,01$ ) indicam os índices de significância estatística entre o limiar de dor do controle e os respectivos limiares nos vários tempos correspondentes ao estímulo da polpa.



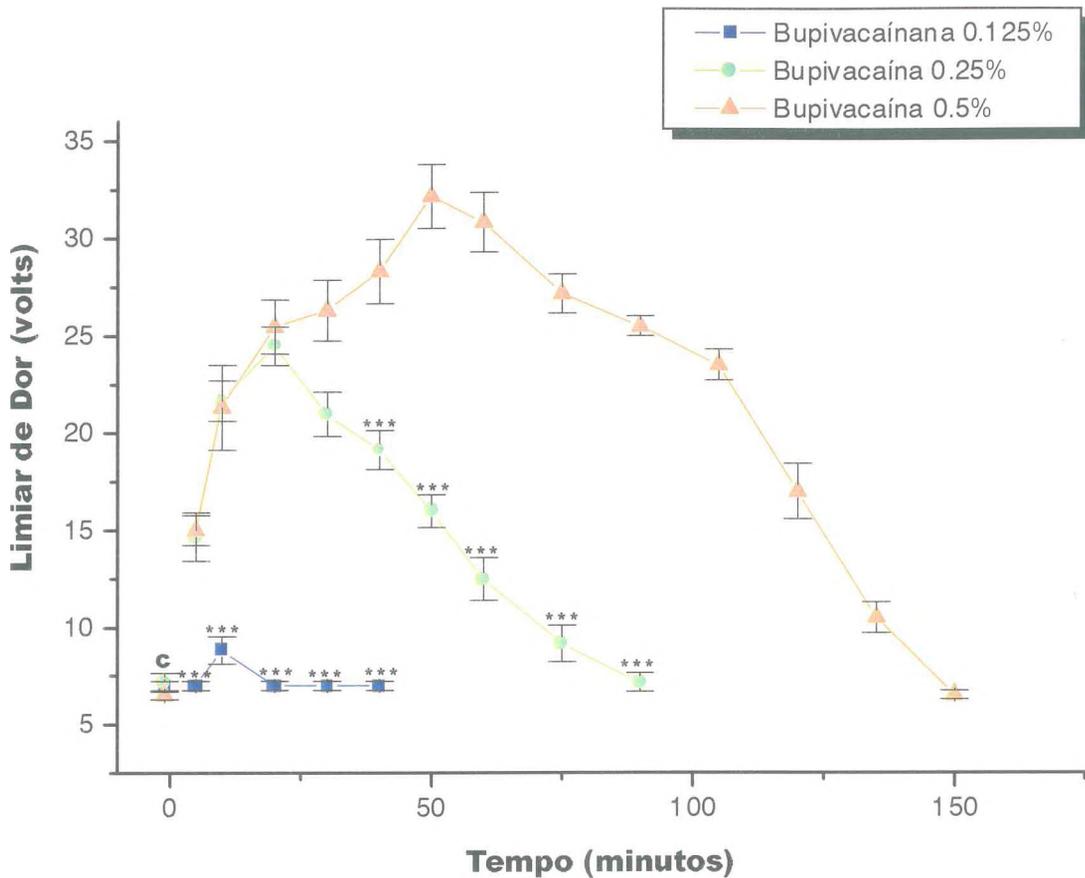
**Figura 14- Avaliação da atividade anestésica local da bupivacaína a 0,25% através do teste de estimulação da polpa dentária.**

Após a aplicação de 0,6ml do anestésico local através de infiltrações na região dos incisivos superiores do coelho obteve-se o limiar de dor (volts) através de uma resposta padrão de lambida e mordida. O tempo, em minutos, corresponde ao período em que o estímulo elétrico foi aplicado à polpa. O controle (c) equivale a determinação do limiar de dor antes da aplicação da bupivacaína a 0,25%. Foram utilizados seis animais (n=6). \*\* (p< 0,01), \*\*\*(p≤ 0,001) indicam o índices de significância estatística entre o limiar de dor do controle e o respectivo limiar nos vários tempos correspondentes ao estímulo da polpa.



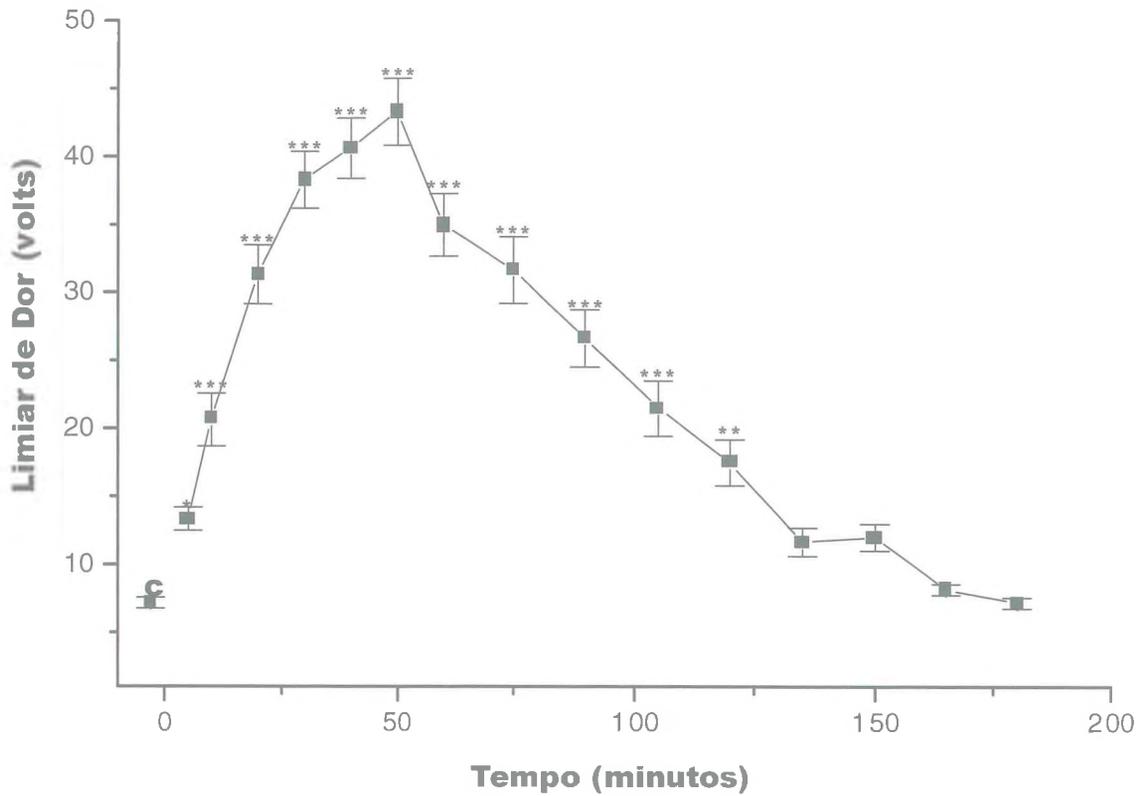
**Figura 15 – Avaliação da atividade anestésica local da bupivacaína a 0,125% através do teste de estimulação da polpa dentária.**

Após a aplicação de 0,6ml do anestésico local através de infiltrações na região dos incisivos superiores do coelho obteve-se o limiar de dor (volts) através de uma resposta padrão de lambida e mordida. O tempo, em minutos, corresponde ao período em que o estímulo elétrico foi aplicado à polpa. O controle (c) equivale a determinação do limiar de dor antes da aplicação da bupivacaína a 0,125%. Foram utilizados seis animais (n=6).



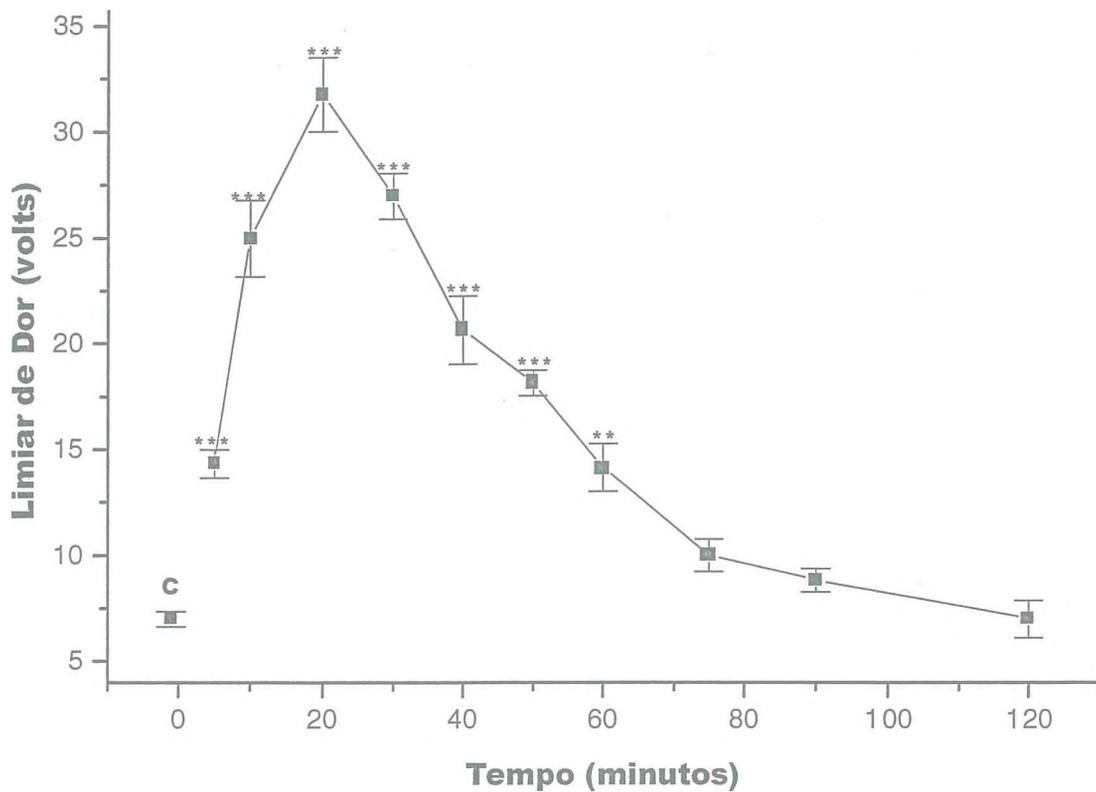
**Figura 16 - Avaliação das atividades anestésicas locais da bupivacaína a 0,5%, 0,25% e 0,125% através do teste de estimulação da polpa dentária.**

Após a aplicação de 0,6ml do anestésico local através de infiltrações na região dos incisivos superiores do coelho obteve-se o limiar de dor (volts) através de uma resposta padrão de lambida e mordida. O tempo, em minutos, corresponde ao período em que o estímulo elétrico foi aplicado à polpa. Os controles (c) equivalem a determinação do limiar de dor antes da aplicação da bupivacaína. Foram utilizados seis animais (n=6) para cada concentração. \*\*\*( $p < 0,001$ ) indica os índices de significância estatística em cada um dos tempos utilizados para a estimulação da polpa dentária entre as doses de 0,25% em relação à dose de 0,5% e 0,125% em relação à dose de 0,25%.



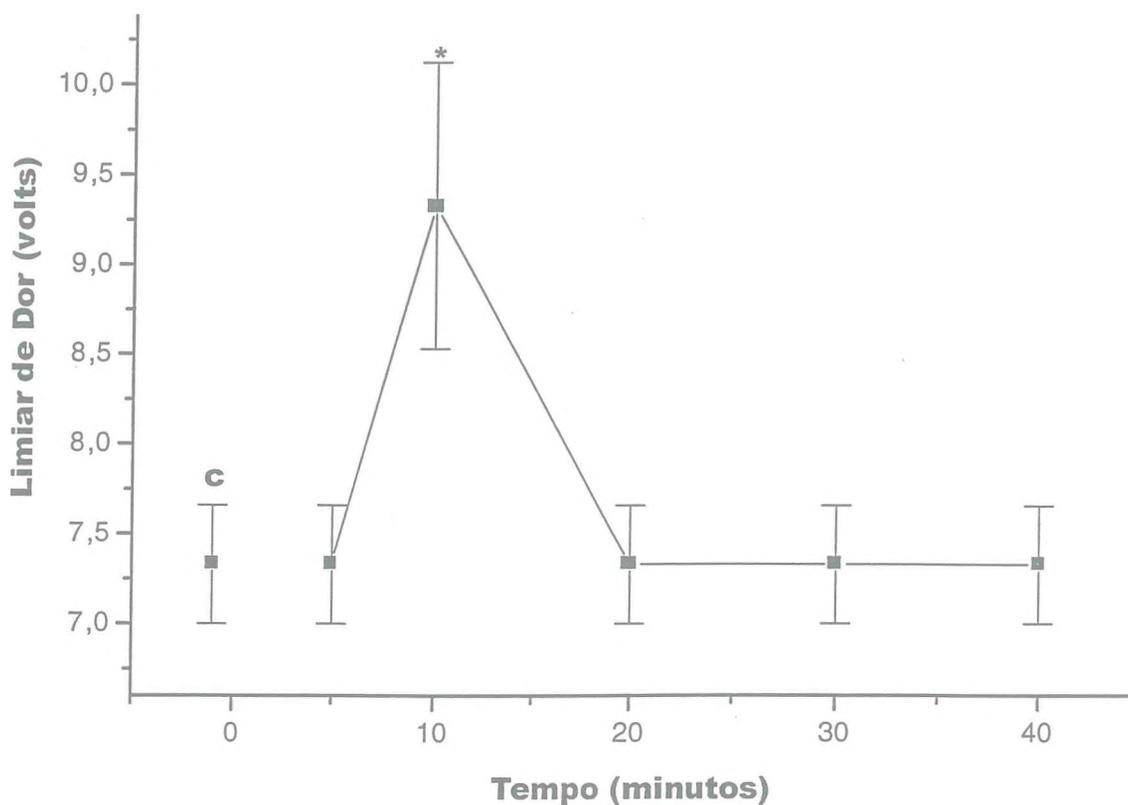
**Figura 17 –Avaliação da atividade anestésica local do fator a 0,5% através do teste de estimulação da polpa dentária.**

Após a aplicação de 0,6ml do fator a 0,5% através de infiltrações anestésicas na região dos incisivos superiores do coelho obteve-se o limiar de dor (volts) através de uma resposta padrão de lambida e mordida. O tempo, em minutos, corresponde ao período em que o estímulo elétrico foi aplicado à polpa. O controle (c) equivale a determinação do limiar de dor antes da aplicação do fator a 0,5%. Foram utilizados seis animais (n=6). \*(p <0,05), \*\* (p< 0,01) \*\*\*(p< 0,001) indicam os índices de significância estatística entre o limiar de dor do controle e o respectivo limiar nos vários tempos correspondentes.



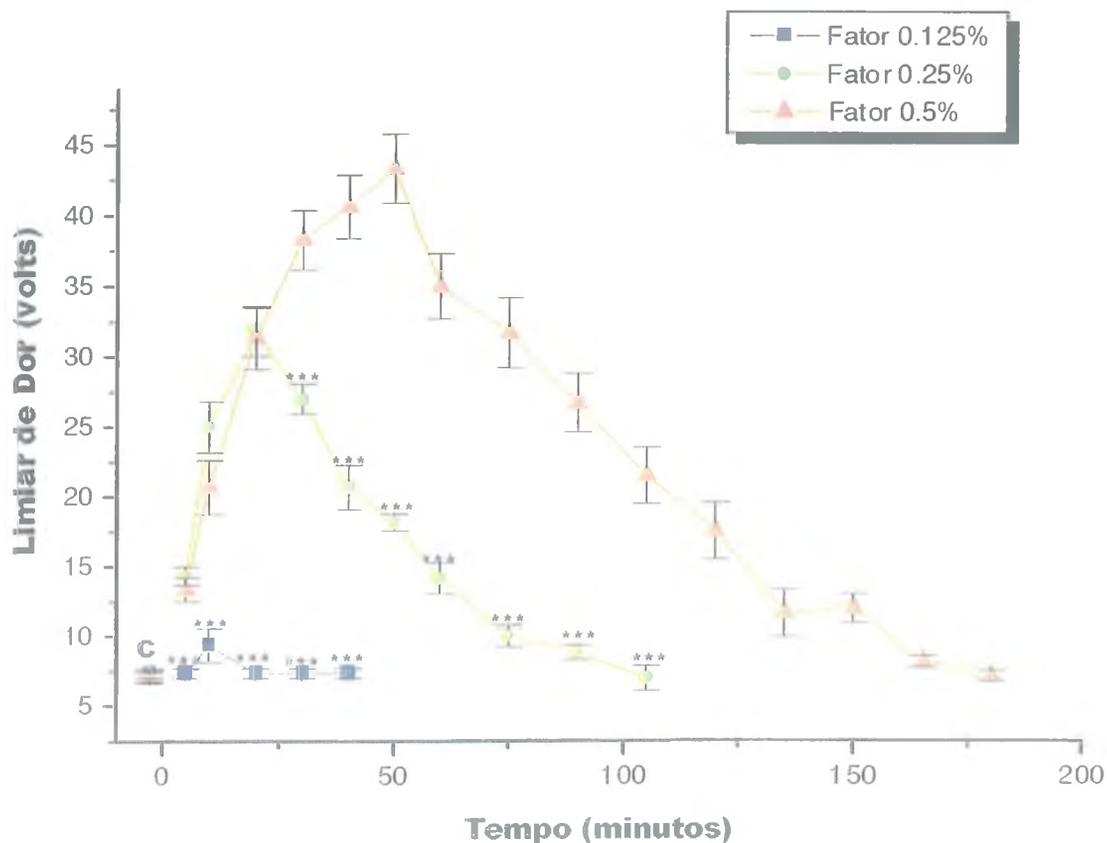
**Figura 18 – Avaliação da atividade anestésica local do fator 0,25% através do teste de estimulação da polpa dentária.**

Após a aplicação de 0,6ml do fator através de infiltrações na região dos incisivos superiores do coelho obteve-se o limiar de dor (volts) através de uma resposta padrão de lambida e mordida. O tempo, em minutos, corresponde ao período em que o estímulo elétrico foi aplicado à polpa. O controle (c) equivale a determinação do limiar de dor antes da aplicação do fator a 0,25%. Foram utilizados seis animais (n=6). \*\*( $p < 0,01$ ) e \*\*\*( $p < 0,001$ ) indicam os índices de significância estatística entre o limiar de dor do controle e o respectivo limiar nos vários tempos correspondentes ao estímulo da polpa dentária.



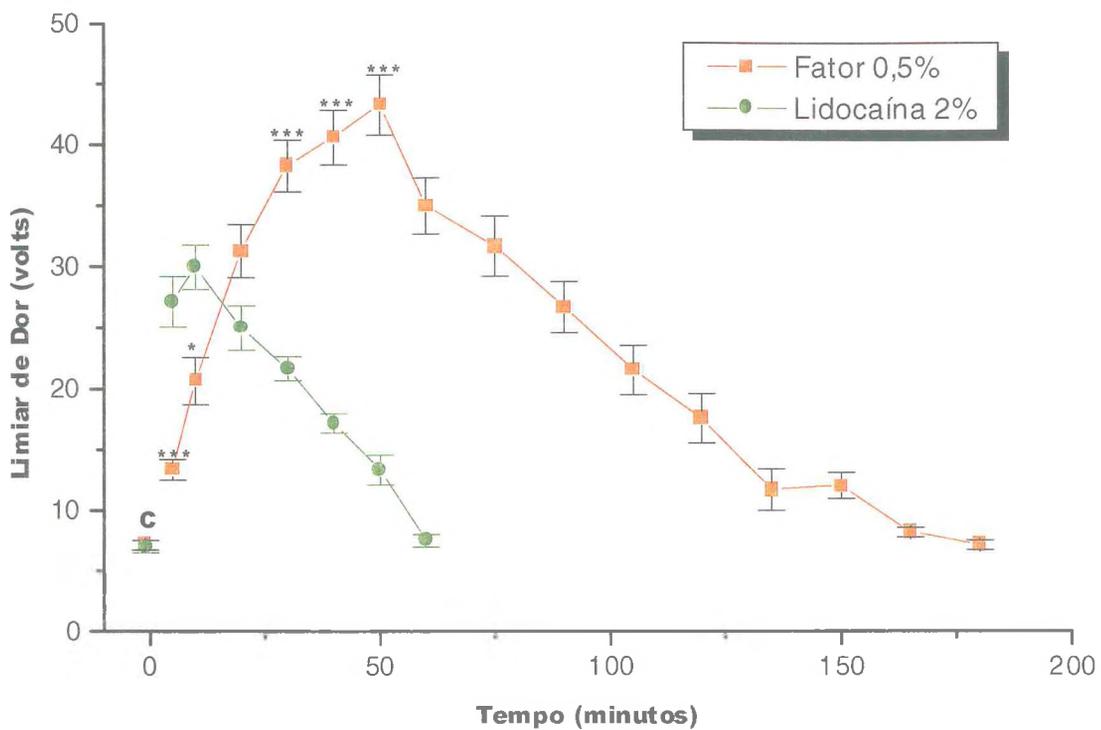
**Figura 19 - Avaliação da atividade anestésica local do fator 0,125% através do teste de estimulação da polpa dentária.**

Após a aplicação de 0,6ml do fator através de infiltrações na região dos incisivos superiores do coelho obteve-se o limiar de dor (volts) através de uma resposta padrão de lambida e mordida. O tempo, em minutos, corresponde ao período em que o estímulo elétrico foi aplicado à polpa. O controle (c) equivale a determinação do limiar de dor antes da aplicação do fator a 0.125%. Foram utilizados seis animais (n=6). \*(p=0,03) indica o índice de significância estatística entre o limiar de dor do controle e o limiar de dor no tempo 10.



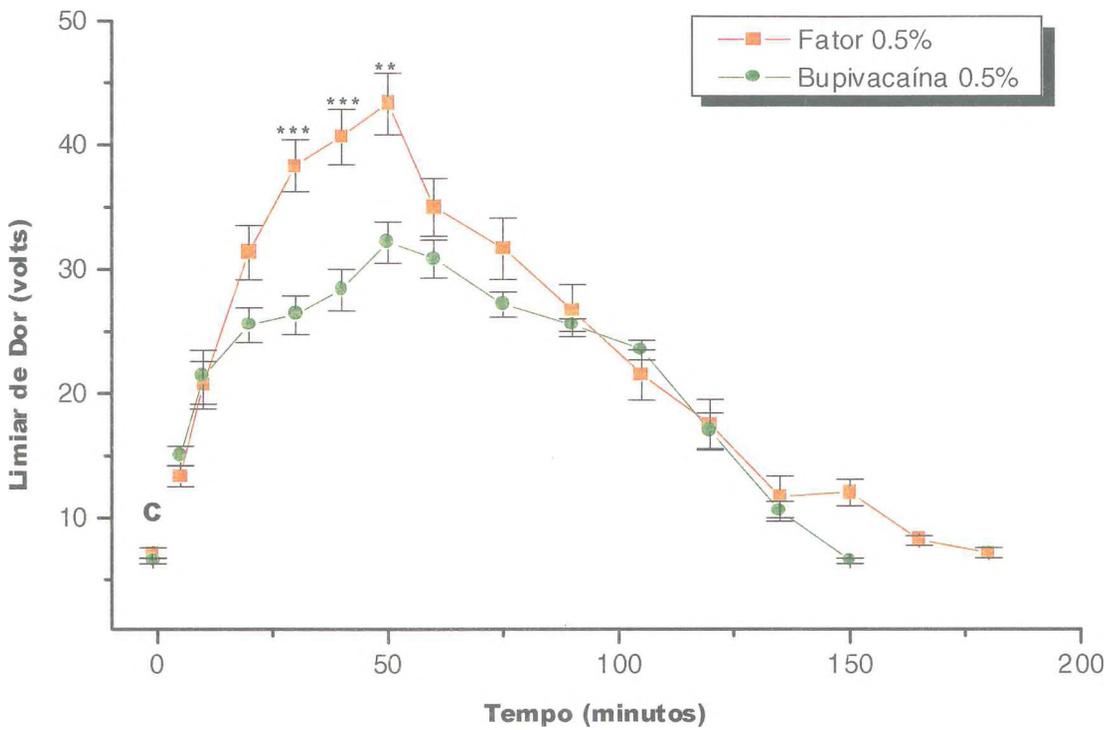
**Figura 20- Avaliação das atividades anestésicas locais do fator a 0,5%, 0,25% e 0,125% através do teste de estimulação da polpa dentária.**

Após a aplicação de 0,6ml do fator através de infiltrações na região dos incisivos superiores do coelho obteve-se o limiar de dor (volts) através de uma resposta padrão de lambida e mordida. O tempo, em minutos, corresponde ao período em que o estímulo elétrico foi aplicado à polpa. Os controles (c) equivalem a determinação do limiar de dor antes da aplicação do fator a 0,125% 0,25 e 0,5%. Foram utilizados seis animais (n=6) para cada concentração. \*\*\*( $p < 0,001$ ) indica os índices de significância estatística em cada um dos tempos utilizados para a estimulação da polpa dentária entre as doses de 0,25% em relação à dose de 0,5% e 0,125% em relação à dose 0,25%.



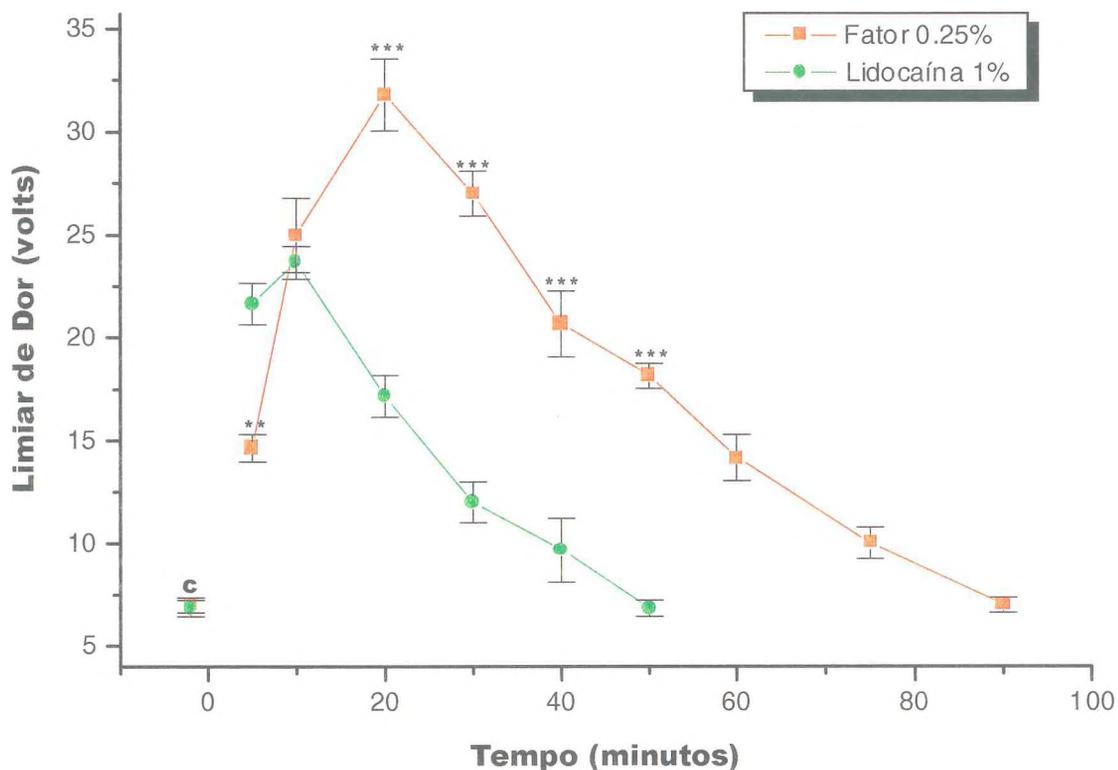
**Figura 21- Comparação da atividade anestésica local do fator a 0,5% e a lidocaína a 2%, utilizando o método de estimulação da polpa dentária.**

Após a aplicação de 0,6ml do anestésico local através de infiltrações na região dos incisivos superiores do coelho obteve-se o limiar de dor (volts) através de uma resposta padrão de lambida e mordida. O tempo, em minutos, corresponde ao período em que o estímulo elétrico foi aplicado à polpa. Os controles (c) equivalem a determinação do limiar de dor antes da aplicação da lidocaína 2% e do fator 0,5%. Foram utilizados seis animais (n=6) para cada concentração. \*(p<0,05), \*\*\*(p< 0.001) indicam os índices de significância estatística em cada medida dos diversos tempos entre o limiar obtido com o fator a 0,5% e a lidocaína a 2%.



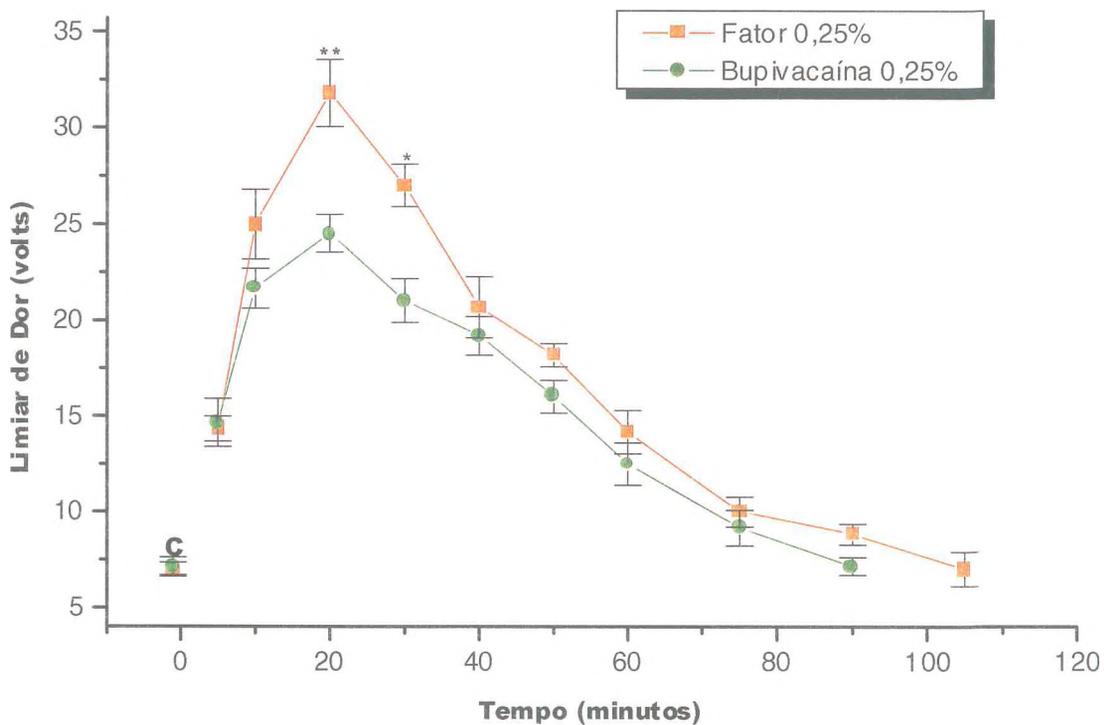
**Figura 22- Comparação da atividade anestésica local do fator a 0,5% e da bupivacaína a 0,5%, utilizando o método de estimulação da polpa dentária.**

Após a aplicação de 0,6ml do anestésico local através de infiltrações na região dos incisivos superiores do coelho, obteve-se o limiar de dor (volts) através de uma resposta padrão de lambida e mordida. O tempo, em minutos, corresponde ao período em que o estímulo elétrico foi aplicado à polpa. Os controles (c) equivalem a determinação do limiar de dor antes da aplicação do fator a 0,5% e bupivacaína a 0,5%. Foram utilizados seis animais (n=6) para cada concentração. \*\*\*( $p < 0,001$ ), \*\*( $p < 0,01$ ) indicam os índices de significância estatística em cada medida dos diversos tempos entre o limiar obtido com o fator a 0,5% e a bupivacaína a 0,5%.



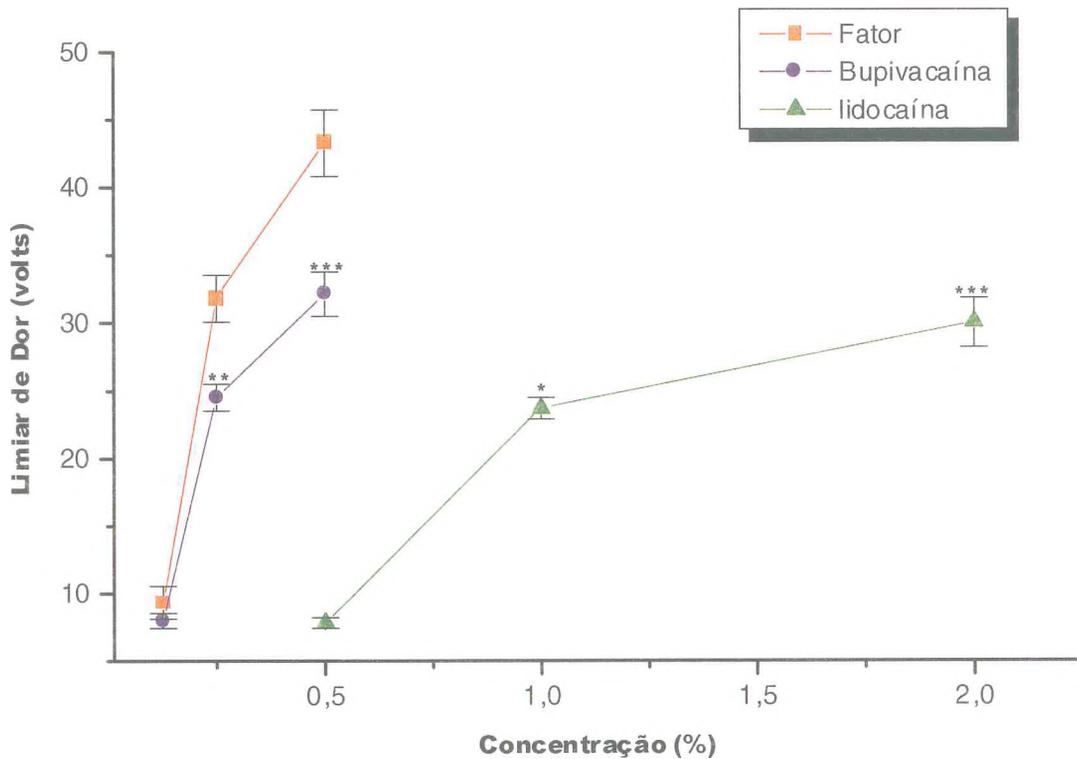
**Figura 23 - Comparação da atividade anestésica local do fator a 0,25% e da lidocaína a 1% utilizando o método de estimulação da polpa dentária.**

Após a aplicação de 0,6ml do anestésico local através de infiltrações na região dos incisivos superiores do coelho, obteve-se o limiar de dor (volts) através de uma resposta padrão de lambida e mordida. O tempo, em minutos, corresponde ao período em que o estímulo elétrico foi aplicado à polpa. Os controles (c) equivalem a determinação do limiar de dor antes da aplicação do fator a 0,25% e da lidocaína a 1%. Foram utilizados seis animais (n=6) para cada concentração. \*\* (p<0,01) e \*\*\* (p< 0,001) indicam os índices de significância estatística em cada medida dos diversos tempos entre o limiar obtido com o fator a 0,25% e a lidocaína a 1%.



**Figura 24 - Comparação da atividade anestésica local do fator a 0,25% e da bupivacaína a 0,25% utilizando o método de estimulação da polpa dentária.**

Após a aplicação de 0,6ml do anestésico local através de infiltrações na região dos incisivos superiores do coelho, obteve-se o limiar de dor (volts) através de uma resposta padrão de lambida e mordida. O tempo, em minutos, corresponde ao período em que o estímulo elétrico foi aplicado à polpa. Os controles (c) equivalem a determinação do limiar de dor antes da aplicação do fator a 0,25% e bupivacaína 0,25%. Foram utilizados seis animais (n=6) para cada concentração. \*( $p < 0,05$ ) e \*\*( $p < 0,01$ ) indicam os índices de significância estatística em cada medida dos diversos tempos entre limiar obtido com o fator a 0,25% e a bupivacaína a 0,25%.



**Figura 25- Comparação da atividade anestésica local máxima do fator a 0,125%, 0,25% e 0,5% com bupivacaína 0,125%, 0,25% e 0,5% e lidocaína 2%, 1% e 0,5% utilizando o método de estimulação da polpa dentária.**

Após a aplicação de 0,6ml do anestésico local através de infiltrações na região dos incisivos superiores do coelho, obteve-se o limiar de dor máximo (volts) através de uma resposta padrão de lambida e mordida. Foram utilizados seis animais (n=6) para cada concentração. Os pontos representam as atividades anestésicas locais máximas obtidas em diferentes concentrações do fator, da bupivacaína e da lidocaína. A análise estatística foi realizada isoladamente entre os pontos correspondentes a 0,5% do fator com 0,5% da bupivacaína ( $p < 0,001$ ) e com 2% da lidocaína ( $p < 0,001$ ), a 0,25% do fator com 0,25% da bupivacaína ( $p < 0,01$ ) e com 1% da lidocaína ( $p < 0,05$ ), e 0,125% da fator com 0,125% da bupivacaína e com 0,5% da lidocaína ( $p > 0,05$ ).

## 5-DISCUSSÃO

Por toda a História, as toxinas têm fascinado os homens. Toxinas animais têm feito uma significativa contribuição na melhoria do conhecimento da fisiologia e farmacologia humanas (Habermehl, 1981; Karalliedde, 1995).

Os sapos eram tidos na Antigüidade, como animais extremamente venenosos. Na Idade Média a secreção de sua pele era empregada na elaboração de numerosos venenos que, segundo sua composição, podiam determinar morte lenta ou rápida (Habermehl, 1981; Sebben et al, 1993). Suas secreções cutâneas foram usadas em misturas para envenenamento de pessoas em tempos antigos. Índios brasileiros costumavam assar e moer o sapo “cururu” (provavelmente *Bufo paracnemis*) para fazer um pó do qual se faziam porções que eram administradas secretamente e em pequenas quantidades de cada vez. Os sintomas de envenenamento eram dentre outros inflamação da boca e garganta, soluço, vômito, desinteria, desmaio, convulsões e delírio (Toledo & Jared, 1995).

A utilização das secreções de anfíbios não teve porém, fins estritamente maléficos. No oeste e no sudeste da Ásia, utiliza-se há séculos o veneno de sapos do gênero *Bufo* em preparados galênicos denominados Ch’an Su ou Senso. Este trata-se, provavelmente, do primeiro e mais antigo uso de um veneno de origem animal em terapêutica (Sebben et al,1993). Durante séculos o Ch’an Su vem sendo utilizado contra várias afecções como a sinusite, inflamações locais, hemorragias gengivais, dor de dente e resfriados, neste último caso sob forma de pílulas. Sob o ponto de vista farmacológico, há informações de que o veneno de sapo influencia positivamente na cicatrização de feridas na pele. Esse veneno em

contato com a mucosa bucal, tem efeito tóxico, às vezes letal para muitas espécies de animais (Toledo & Jared, 1989).

A toxicidade do veneno desses anfíbios tem sido sempre relacionada a componentes da natureza esteróide sendo que, uma grande parte dos efeitos tóxicos do veneno do *Bufo paracnemis* é atribuído à ação das bufogeninas (bufadienolídeos) (Toledo & Jared, 1989). Observações publicadas há mais de vinte anos atribuíam também a ação anestésica local desse veneno sobre a boca e a língua do homem e animais, à ação das bufogeninas (Chen & Kovarikota, 1967; Yoshida, 1976). Entretanto, apenas recentemente, foi isolado parcialmente um fator do veneno do *Bufo paracnemis* com ação anestésica local mais potente e com maior duração que aquelas da lidocaína e bupivacaína (Patrocínio, 1997; Evangelista, 2001). A determinação de sua estrutura química está em fase final. Atualmente tenta-se elucidar o mecanismo de ação.

O veneno dissolvido com etanol durante 24 horas mostrou ser um procedimento bastante eficaz para solubilizar o fator com atividade anestésica. O HPLC fracionou o sobrenadante extraído, em etanol, em vários picos. Por esse procedimento é possível realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (Lindsay, 1992). Através de um sistema isocrático de acetonitrila a 40% a purificação do fator com atividade anestésica foi obtida através de um único passo. Utilizando-se uma coluna semi-preparativa C18 foi possível obter-se grandes quantidades do fator, de maneira rápida e reprodutiva, o que foi fundamental para a realização dos diversos ensaios utilizados. Em cada ensaio foram injetados 1,7 ml ou seja 280 mg do veneno bruto. Assim, foi possível obter-se cerca de 5 mg do fator

purificado em cada cromatografia. Após uma jornada de 10 horas de trabalho um mínimo de 8 cromatografias eram realizadas obtendo-se ao final 40 mg do fator.

O pico 2 após passagem em HPLC com coluna analítica revelou um elevadíssimo grau de pureza do material evidenciada pela inexistência de outros picos. A aparente ausência de contaminação do material sugere fortemente que a atividade anestésica local encontrada fosse decorrente do fator.

Já que a dor é um efeito subjetivo, a ação anestésica deveria ser avaliada no homem. De qualquer modo, por razões de segurança, antes dos testes no homem é necessário avaliar a atividade anestésica em animais (Piercey e Schroeder, 1980).

Vários testes anestésicos têm sido usados para determinar atividade e potência anestésica, incluído bloqueio motor em cães usando implantes de cateter epidural para administrar anestésicos, bloqueio sensorial em macacos depois de injeção intratecal, resposta comportamental do sagui à pressão digital depois de injeção intratecal, bloqueio de condução depois da injeção intratecal em ratos e bloqueio de condução em ratos e camundongos depois da injeção de anestésicos na base da cauda (Thut et al., 1995). O bloqueio de condução induzido por anestésicos locais tem sido avaliado em várias espécies incluindo cobaias, ratos, camundongos, carneiros, gatos, macacos, coelhos e cachorros. Alguns desses modelos avaliam apenas o bloqueio motor, enquanto outros avaliam o bloqueio sensorial usando indicadores imprecisos como vocalização ou resposta comportamental a pressão digital (Grant et al, 1993).

O método de estimulação da polpa dentária é tido como o método mais seguro para avaliar a atividade anestésica local possibilitando uma análise

quantitativa e qualitativa para anestésicos de potência média a elevada (Piercey & Schroeder, 1980). Além disso, poucos animais são requeridos para a obtenção das curvas dose-resposta. A medida das respostas é feita após infiltração nos tecidos maxilares, de maneira semelhante à utilizada na clínica odontológica (Thut et al, 1995).

Este método foi primeiramente utilizado para testar a atividade analgésica central em coelhos e vem sendo desde então aplicado por vários autores a várias espécies de animais (Piercey & Schroeder, 1980; Thut et al., 1995). O teste de estimulação da polpa dentária tem sido utilizado com sucesso para acompanhar a potência, eficácia e duração de antinocicepção de analgésicos não opióides, analgésicos opióides, drogas antiinflamatórias e antipiréticas após injeção intravenosa ou intramuscular (Piercey & Schoeder, 1980; Thut et al., 1995; Vogel & Vogel, 1997). Já que o método é sensível a uma ampla variedade de componentes antinociceptivos, ele tem sido também usado para detectar a antinocicepção dos anestésicos locais após infiltração nos tecidos maxilares (Thut et al., 1995).

A estimulação da polpa dentária do coelho por estímulo elétrico induz reações características como: lambida, mordida, mastigação e agitação da cabeça que podem ser facilmente observadas (Vogel & Vogel, 1997). Como as drogas anestésicas locais infiltradas ao redor dos nervos dos ápices dentários da arcada maxilar e mandibular no homem, normalmente produzem anestesia efetiva para aliviar a dor de dente em procedimentos como extrações e restaurações, o mesmo deve acontecer em relação ao bloqueio da dor causada pelo estímulo elétrico em coelhos (Anderson & Pearl, 1975; Azerad & Woda, 1977; Thut et al, 1995).

Utilizando o método de estimulação da polpa dentária, os nossos resultados mostraram claramente que o fator isolado do veneno do *Bufo paracnemis* apresentou nas concentrações de 0.5% e 0.25% maior potência e duração anestésica semelhante à bupivacaína (anestésico local de longa duração) nas mesmas concentrações, respectivamente. O fator nas doses de 0.5% e 0.25%, apresentou maior potência e duração anestésica que a lidocaína nas concentrações de 2% e 1%, respectivamente. As razões para explicar esses resultados são, no momento, difíceis de encontrar, uma vez que o mecanismo de ação do fator é ainda desconhecido. A estrutura parcial do fator enquadra-o no grupo dos bufadienólídeos, substâncias compostas fundamentalmente de um grupamento esteróide ligado a uma  $\beta$ -lactona. Diferem, portanto, dos anestésicos locais clássicos que apresentam uma estrutura contendo um grupamento éster ou amida, essencial para a atividade anestésica.

É conhecido que os bufadienólídeos inibem a  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ , de maneira semelhante aos digitálicos. Entretanto esse mecanismo parece não estar envolvido no bloqueio de transmissão do potencial do nervo, uma vez que bufadienólídeos como a marinobufagina, que também apresenta forte atividade inibitória sobre a  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ , é completamente destituída de ação anestésica local (resultados não publicados do nosso laboratório). Portanto, serão necessários estudos aprofundados, como o “patch-clamp”, para se tentar elucidar o mecanismo de ação desse fator.

O primeiro anestésico local de significado clínico a ser utilizado foi a cocaína. No entanto, tornou-se evidente que ela possuía pelo menos duas propriedades indesejáveis a saber: toxicidade acentuada e capacidade de induzir dependência. Iniciaram-se, então, pesquisas no sentido de encontrar produtos

substitutos que tivessem as mesmas propriedades anestésicas locais, sem seus efeitos colaterais indesejáveis (Booth, 1992).

A identificação da cocaína como derivado do ácido benzóico possibilitou a síntese da benzocaína, também éster do ácido benzóico. Em 1905 foi sintetizada a procaína, anestésico local mais hidrossolúvel e menos tóxica que a benzocaína, compatível com o uso sistêmico. Com a síntese da lidocaína, em 1943, iniciou-se a era dos anestésicos locais tipo amida (Carvalho, 1994).

Portanto, tem-se estimulado a busca de novos produtos com maior atividade anestésica local e menor toxicidade.

As propriedades farmacológicas consideradas importantes do ponto de vista clínico para os anestésicos locais, incluem potência, latência para a produção do efeito, duração de ação e toxicidade (Berde e Strichartz, 2000).

Em três ensaios farmacológicos realizados anteriormente em nosso laboratório (anestesia por infiltração de superfície em cobaias, infiltração de anestésico local na base da cauda de camundongos e anestesia de superfície na córnea de coelhos) para a avaliação da atividade anestésica local, o fator apresentou potência e tempo de duração anestésica superiores aos da lidocaína e bupivacaína (Carvalho, 2001). Estes dados podem estar relacionados com a estrutura esteroideal da molécula, o que lhe confere uma característica lipoproteica (Evangelista, 2001). Sabe-se que os lipídios e as proteínas exercem um papel fundamental na organização molecular da membrana neuronal. Isso sugere que as propriedades físico-químicas dos anestésicos locais, especificamente a solubilidade em lipídios e a ligação a proteínas, são importantes em termos da

interação final entre as drogas anestésicas locais e a membrana do nervo e seu consequente efeito biológico. Drogas com maior solubilidade lipídica, apresentam mais fácil difusibilidade através da bainha de mielina e da membrana axonal, apresentando período de latência mais curto. A maior capacidade de ligação à proteína implica em maior grau de atração ao componente protéico da membrana e, conseqüentemente, maior potência anestésica intrínseca e duração de ação mais longa (Covino e Vassalo, 1985).

A grande duração de ação do fator pode se dever também, pelo menos parcialmente, ao fato de ele e outras bufogeninas apresentarem forte ação vasoconstritora. Essa propriedade pode vir a tornar-se importante no futuro, caso ela venha a ser utilizada clinicamente, pois diminuiria a necessidade do uso de vasoconstritores, o que ocorre frequentemente com os anestésicos locais clássicos. Essa associação com vasoconstritores apesar de ser usada com intuito de diminuir o sangramento e aumentar o tempo de ação dos anestésicos locais clássicos, pode trazer também importantes efeitos colaterais em pacientes com problemas cardiovasculares (Carvalho, 2001).

Assim, o efeito anestésico dos agentes com duração de ação curta e intermediária pode ser prolongado através do aumento da dose ou pelo acréscimo de um agente vasoconstritor como a epinefrina ou fenilefrina. O Vasoconstritor retarda a remoção da droga do sítio de injeção. Além disso, diminui o nível sanguíneo da droga e, portanto, a chance de toxicidade (Berde e Strichartz, 2000). Entretanto, os anestésicos de duração intrinsecamente longa, como a bupivacaína, não se beneficiam tanto quanto os de duração moderada ou curta, como a lidocaína e a prilocaína (Covino e Vassalo, 1985).

Entretanto, a absorção sistêmica de vasoconstritores pode provocar reações indesejáveis como hipertensão e taquicardia. Devem ser evitadas em extremidades ou circulações terminais e em pacientes com problemas cardiovasculares graves. Pode também retardar a cicatrização das feridas, promover edema ou necrose local devido, principalmente, à redução do consumo de oxigênio tecidual que, associado a vasoconstrição, causa hipóxia e lesão tecidual (Cortopassi et al, 2000). Portanto, a possível utilização clínica do nosso fator futuramente poderá dispensar o uso de um vasoconstritor.

O fator apresentou uma latência da ação anestésica local de dois a três minutos maior que aquelas da lidocaína e bupivacaína nas preparações da córnea de coelho e cauda de camundongo. Essa diferença foi de apenas cerca de um minuto na infiltração intradérmica (Evangelista, 2001). Entretanto, através do método de estimulação da polpa dentária, não observamos diferença na latência do fator em relação a lidocaína e bupivacaína que encontra-se nos cinco minutos iniciais.

Resultados anteriores em nosso laboratório revelaram que o fator tem uma DL<sub>50</sub> por via intraperitoneal (50 mg/Kg) maior que aquelas da lidocaína (40mg/Kg) e da bupivacaína (30 mg/Kg). Por via intravenosa, o fator também apresentou uma DL<sub>50</sub> (30 mg/Kg) maior que aquelas da lidocaína (18 mg/Kg) e da bupivacaína (7 mg/Kg) (Evangelista, 2001). Embora estudos mais aprofundados devam ser realizados, esses resultados sugerem que o fator apresente uma toxicidade aguda menor que aquela dos anestésicos locais clássicos. Essa propriedade também pode vir a tornar-se importante no futuro, caso essa substância venha a ser utilizada clinicamente (Carvalho, 2001).

Como os anestésicos locais clássicos podem agir sobre qualquer membrana excitável, os sistemas cardiovascular e nervoso central são particularmente susceptíveis à ação do anestésico local. Os efeitos do fator sobre o coração, assim como os de outras bufogeninas, são relativamente bem conhecidas, conforme vimos na introdução. Entretanto as suas ações sobre o sistema nervoso, particularmente a atividade anestésica local, eram até então desconhecidas .

Como observamos, o fator extraído do veneno das glândulas parotóides do *Bufo paracnemis* mostrou atividade anestésica local de grande potencia e longa duração. Caso esta substância venha a ser utilizada clinicamente, sua indicação na clínica odontológica deverá ser para procedimentos como cirurgia buco-maxilo-faciais ou qualquer outro procedimento mais demorado, assim como ocorre com a bupivacaína.

Concluindo, os resultados apresentados mostraram uma total purificação de um fator extraído das secreções cutâneas do *Bufo paracnemis* que possui um potente atividade anestésica local, longo tempo de duração e baixa toxicidade, tornando-se, portanto, uma substância promissora como instrumento para a pesquisa de uma nova classe de anestésicos locais para uso odontológico.

## 6. CONCLUSÕES

1. Uma substância com atividade anestésica foi isolada das glândulas parotóides do *Bufo paracnemis*.

2. Uma proposição estrutural foi determinada com a fórmula de  $C_{24}H_{34}O_5$  e com peso de 402 Da, pertencente ao grupo das bufogeninas.

3. O teste de estimulação da polpa dentária foi efetivo para análise quantitativa e qualitativa da atividade anestésica local desse fator e dos outros anestésicos locais clássicos utilizados.

4. No teste de estimulação da polpa dentária o fator a 0,25% e 0,5% apresentou maior potência e duração anestésica semelhante a bupivacaína nas mesmas concentrações, respectivamente. O fator nas concentrações de 0,25% e 0,5% apresentou também maior potência e duração anestésica que a lidocaína nas concentrações de 1% e 2%, respectivamente.

5. Esta substância poderá servir como instrumento de pesquisa de uma nova classe de drogas anestésicas locais com alta potência, longo tempo de duração anestésica e com baixa toxicidade. Assim, torna-se promissora para uso clínico em odontologia.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, K. V.; PEARL, G.S. C-Fiber activity in feline tooth pulp afferents. **Exp. neurol.** v. 47, p.357-359, 1975.

AZERAD, J.; WODA, A. Sensation evoked by bipolar intrapulpar stimulation in man. **Pain** v. 4, 145-152, 1977.

BAGROV A .Y; FEDOROVA,O V; DMITRIEVA, R.I; HOWALD W. N; HUNTER A P; KUZNETSOVA E. A; SHPEN, V.M. Characterization of a urinary bufodienolide Na k ATPase inhibitor in patients after acute myocardial infarction. **Hypertension**, v.31, n..5, p.1097-1103,1998.

BARRAVIEIRA, B. **Venenos animais**: uma visão integrada. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 1994.

BERDE, C. B.; STRICHARTZ, G. R. Local Anesthetics. In: MILLER, R. D. **Anesthesia**. Livirstone, 2000. p. 491-521.

BERGER, H.; KREIL, G. The constituinte of storage granules in the dermal glands of *Xenopus laevis*. Stucture of a basic polypeptide deduced from cloned cDNA. **FEBS LETTERS**. v. 249, n.2, p. 293-296, 1989

BOKESCH, P.M., RAYMOND, S.A., STRICHARTZ, G.R. Dependence of lidocaine potency on pH and  $P_{CO_2}$ . **Anesth Analg**, v.66, p.9-17, 1987.

BOMBANA, A.C. **Manual de Anestesia Local em Odontologia Aplicada à Clínica Odontológica**, 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Cristália, 1985.

BOOTH, N. H. Drogas Anestésicas dos nervos periféricos. In BOOTH, N.H.; LESLIE, E. McD. **Farmacologia e terapêutica em medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. p.121-336.

BORBA, S.R.C. Anestésicos Locais. In MANICA, J. **Anesthesiologia**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1992, cap 9, 188-98.

BROWNLEE, A. A; JOHNSON, P; MILLS, I. H. Actions of bufalin and cyanobufotalin, two bufadienolides respectively more active and less active than ouabain, on ouabain binding and Rb uptake by human erythrocytes. **Clin. Sci.**, v. 78, p. 169-174, 1990.

BUTTERWORTH, J.F., STRICHARTZ, G. R.; Molecular mechanisms of local anesthesia: a review. **Anesthesiology**, v.72, p. 711-34, 1990.

CAMARÃO, G.C. **Purificação e caracterização de um complexo proteico multicatalítico do exsudato da pele do *Xenopus laevis***. São Paulo, 1995. Tese (Doutorado)-Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1995.

CARVALHO, K.M., JOUDIQU, C., BOUSSETA, H., et al. A peptide-hormone-inactivating endopeptidase in xenopus laevis skin secretion. **Proc Natl Acad Sci**, v.89, n.1, p.84-88, 1992

CARVALHO, J.C. A. Farmacologia dos anestésicos Locais. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, , v.44, n.1, p. 75-81,1994.

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.; NOGUEIRA, R. M. D.; AZEVEDO, M. C. P.; UCHOA, D. E.; SILVEIRA, E. R. Unambiguous <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignments for marinobufagin, a potent epiteptogenic bufodienolide of the skin venom of *Bufo paracnemis* native from Ceará, Brazil. **Anais do ANAUREMN, VII Encontro de usuários**, Angra dos Reis, Rio de Janeiro, 1999..

CARVALHO, K.M. **Biodiversidade da fauna venenosa típica do nordeste brasileiro.** Fortaleza, 2001. Tese (Professor Titular) – Universidade Estadual do Ceará, 2001.

CARPENTER, Randall L.; MACKEY, David C. Local anesthetics. In: BARASH, P. G.; CULLEN, B. F.; STOELTING, R. K.. **Clinical anaesthesia.** Philadelphia: Raven, 1996. p. 413-440.

CATCHLOVE, R.F.H. The influence of CO<sub>2</sub> and pH on local anesthetic action. **J. Pharmacology Exp Ther**, v.181, p.298-311, 1972.

CATTERALL, W.; MACKIE, K. Local anesthetics. In :HARDMAN, J.G GILMAN, G; LIMBIRD, L.E. Goodman & Gilman's. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9<sup>th</sup> ed. New York: The McGraw Hill, 1996, cap.15, p.331- 348.

CHEN, K. K. E KOVARIKOVA. Farmacology and toxicology of toad venom. **J. Pharman. Sci**, v.56, p.1535.,1967.

CLARKE, B.T. The natural histore of amphibian skin secretions their normal function and potential medical applications. **Biol. Rev. Camb. Philos Soc**, v.72, n.3, p365-379, 1996.

CLARKSON, C. W., HONDEGHEM, L.M. Mechanism for bupivacaine depression of cardiac conduction: fast block of sodium channels during the action potencial with slow recovery from block during diastole. **Anesthesiology**, v.62. p.396-405, 1985.

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

CORTOPASSI, S.R.G.; FANTONI, D.T.; BERNARDI, M.M. Anestésicos Locais. In: SPINOSA, H. S.; GORNIAC, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada a medicina veterinária**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2000. p. 125-130.

COURTNEY, K.R. Mechanism of frequency-dependent inhibition of sodium currents in frog myelinated nerve by lidocaine derivative GEA 968. **J Pharmacol Exp Ther.**, p225-229, 1987.

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

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

DALY, J.W.; MYERS, C.W.; WHITTAKER, N. Further classification of skin alkaloids from neotropical poison frogs (Dendrobatidae), with a general survey of toxic/noxious substances in the amphibia. **Toxicon**, v.25, n.10, p.1023-1095, 1987.

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.

DENSON, D., COYLE, D., THOMPSON, G., et al. Alpha<sub>1</sub>-acid glycoprotein and albumin in human serum bupivacaine binding. **Clin Pharmacol Ther**, v.35, p.409-415, 1984.

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

DUELLMAN, W. E; TRUEB, L. **Biology of amphibians**. New York: McGraw Hill, 1986. p.670.

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

ESPARMER, V. Active peptides in the skin of one hundred amphibian species from Australia and Papua New Guinea . **Comp. Biochem. Physiol**, v. 77, n. 1, p. 99-108, 1984.

EVANGELISTA, I. L. **Estudos farmacológicos e clínicos em animais de um novo fator anestésico isolado do veneno do Bufo paracnemis**. Tese (Mestrado) - Universidade Estadual do Ceará, 2001.

FERREIRA, M. B. C. Anestésicos Locais. In: WANNMACHER, M.B.C.F. (Ed.) **Farmacologia Clínica para Dentistas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.104-116.

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

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

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

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

GMACHL, M.; BERGER, H.; THALHAMMER, J.; KREIL, G. Dermal glands of *Xenopus laevis* contain a polypeptide with a highly repetitive aminoacid sequence. **FEBS LETTERS**. v.260, n.1, p.145-148, 1990.

GRANT, G.J.; ZAKOWSKI, M.I.; VERMEULEN, K.; LANGERMAN, L.; RAMANATHAN, S.; TURNDORF, H. Assessing local anesthetic effect using the mose tail flick test. **J Pharmacol. Toxicol. Meth.**, 29, p. 223-226 , 1993.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Potenciais de membrana e potenciais de ação. In: **Tratado de Fisiologia Médica**. 9<sup>th</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.cap 5, p. 53-66.

HABERMEHL, G. **Venomous animals and their toxins**. Springer, Berlin, 1981.

HILLE,B; CATERRAL, W A. Excitability and ion channels. In: ALTERS; MOLINOFF; AGRONOFF. **Basic Neurochemistry**. 5<sup>th</sup> ed.. New York: Siegal, 1994. p. 7-95.

HONDEGHEM, L. M.; MILLER, R. D. Anestésicos Locais. In: KATSUNG. **Farmacologia Básica e Clínica**. 6<sup>th</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap 25, p.301-307, 1998

HONG, Z; CHAN, K; YEUNG, H. W. Simultaneous determination of Bufadienolides. In: the tradicional chinese medicine preparation, Liu-Shen-wan, by liquid chromatography. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 44; p. 1023-1026, 1992.

HUTTER, C.D. The Woolley and Roe case: A reassessment. **Anaesthesia**, v.45, p. 859-865, 1990.

IWAMURO, S., KUWAGAKI, D., KIKUYAMA, S. Effect of arginine vasocitin (AVT) and AVT-related peptide on skin gland secretion in *Xenopus laevis*, **Zool Sci**, v.8, p.743-746, 1991.

KARALLIEDDE, L. Animal toxins. **Bri J Anaest**, v. 74, p. 319-327, 1995.

KASTEN, G.W., MARTIN, S.T. Bupivacaine cardiovascular toxicity; comparision of the treatment with bretylium and lidocaine. **Anesth Analg**, v.64, p.911-916, 1985.

KOMATSU, K.; YAMAZAKI, S.; YAMAGUCHI, S.; CHIBA, M. Comparision of biomechanical properties of the incisor periodontal ligament among different species. **Anat. Rec.**, v. 250, p. 408-417, 1998.

KRENN, L; KOPP, B. Bufadienolides from animal plant sources. **Phytochemistry**, v. 48, n. 1, p. 1-29, 1998.

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; SALVARORI, S. Frog skin opioid peptides: a case for environmental mimicry. **Environ. Health Perspect.**, v. 102, n. 8, p. 648-654, 1994.

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

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

MARZOLA, C. Anestésias Terminais e por Bloqueio. In: **Anesthesiologia**, São Paulo: Pancast, 1989. p.39-54.

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

MEYER, K. Cardiotonic steroids from toads. **Mem. Int. Butantan**, v.33, p. 433-440, 1996.

MICHAELI, Y.; HIRSCHFELD, Z.; WEINREB, M. M. The cheek teeth of the rabbit: morphology, histology and development. **Acta Anat.**, v.106, p. 223-239, 1980.

MONTI, R.; CARDELLO, L.. Bioquímica do veneno de anfíbios. In: BARRAVIERA, B. **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: EPUC, 1994. p. 225-231.

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

PATROCÍNIO, M.C.A. **Purificação e caracterização de uma nova substância com atividade anestésica local do veneno das glândulas do Bufo paracnemis**. Fortaleza, 1997. Tese (Mestrado) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará.

PENCHMANN, J. H. K.; SCOTT, D.E.; SEMLITSCH, R.D.; CALDWEL, J.P.; VITT, L.J.; GIBBONS, J.W. Declining amphibian populations: the problem of separating human impacts from natural fluctuations. **Science**, v.253, p. 892-895, 1991.

PEREIRA, R.I.C. Anestésicos Locais. In: ORTNENZI, A. Z ;TADELLI, M.A . **Anestesiologia**. São Paulo: Atheneu.1996. p341-357.

PIERCEY, M.F.; SCHROEDER, L.A. A Quantitative analgesic assay in rabbit based on the response to tooth pulp stimulation. **Arch. Int. Pharmacodyn**, v. 248, p.294-304, 1980.

PORTO, A M; GROS, E.G. Biosynthesisi of the bufadienolide marinobufagin in toads Bufo paracnemis from cholesterol. **Experientia**, v. 27, n. 5, p. 506, 1971.

ROBERTS, D. H.; SOWRAY, J. H. Desenvolvimento da Analgesia Local. In: **Analgesia Local em Odontologia**. São Paulo: Santos, 1995. P.1-5.

RANG, H.P; DALE, M.M; RITTER, J. M. et al. Local Anesthetics and Other drugs that Affect Excitable Membranes. In: \_\_\_\_\_ **Pharmacology**. New York: Churchill Livingstone, 1995, cap. 34, p. 665-680.

REILLY, D.S., TOMASSINI, N., ZASLOFF, M. Expression of magainin antimicrobial peptide genes in developing granular glands of *Xenopus* skin and induction by thyroid hormone. **Dev Biol**, v.162, p.123-133, 1994.

ROSEGHINI, M.; ERSPAMER, V.; FALCONIERI, E. G., et al. Indole-, imidazole- and phenyl-alkylamines in the skin of one hundred and forty american amphibian skin species other than bufonids. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.85, p.139-147, 1986.

ROSSI, H.; BLUMENTHAL, E. E. A.; JARED, C. Bufodienolides from the venom of *Bufo paracnemis* ( anphibia, anura, bufonidae ). **Anais Assoc. Bras. Quim**, v.46, n. 1, p.21-26, 1997.

SAVARASE, J.; COVINO, B.G. Anestésicos Locais. In MILLER, R.D. **Tratado de Anestesia**. São Paulo: Manole, 1984, cap. 29, p. 1007-183.

SEBBEN, A; SCHWARTZ,C.A; CRUZ, J S. A defesa química dos anfíbios. **Ciência Hoje**, v.15, n. 87, p.25-35,1993.

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

STEYN, P. S; VAN HEERDEN, F. R. Bufadienolides of plant and animal origin. **Nat. Prod. Rep.**, p.397-413, 1998.

STORER, T. I.; SINGER, R.L. Classe amphibia. In: **Zoologia Geral**. São Paulo: Nacional, 1985, p.585-596.

THOMAS, R.D; BEHBEHANI, M.M; COYLE, D.E. et al. Cardiovascular toxicity of local anesthetics: na alternative hypotesis. **Anesth Analg**, v.65,p. 444-446,1986.

THUT, P. D.; TURNER, M. D.; CORDES, C. T.; WYAN, R. L. A rabbit tooth-pulp assay to quantify efficacy and duration of antinociception by local anesthetics infiltrated into maxillary tissues. **J Pharmacol. Toxicol. Methods.**, v.33, p.231-36, 1995.

TOLEDO, de Reynaldo C. Breve apreciação sobre a secreção cutânea dos anfíbios. **Ciênc. Cult.**, v. 38, n. 2, p. 279-284, 1984.

TOLEDO, de Reynaldo C.; JARED, Carlos. Considerações sobre o veneno dos anfíbios. **Ciênc. Cult.**. v.41, n.3, p.250-258,1989.

TOLEDO, de Reynaldo C; JARED, Carlos. Cutâneos granular glands and amphibian venoms. **Comp. Biochem. Physiol.** Vp. 1-29, 1995.

TOLEDO, R.C., VILLA, N. Estudo histopatológico das glândulas tibiais (ou paracênemicas) de Bufo paracnemis (Amphibia, Anura, Bufonidae). **Rev Bras Biol**, v.47, n.3, p.257-264, 1987.

TORTAMANO, N. Anestésicos Locais. In: **Guia odontológico terapêutico**. São Paulo: Santos, p.39-42, 1988.

TUCKER, G.H., MOORE, D.C., BRIDENBAUGH, P.O., ET AL. Systemic absorption of mepivacaine in commonly used regional block procedures. **Anesthesiology**, v.37, p.277-285, 1972.

VOGEL, H.G.; VOGEL, W.H. Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activity. In: **Drug discovery and evaluation**. Spinger-Verlagi Berlim, p.360-375, 1997.

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

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

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

YAGIELA, J. A. Anestésicos Locais. In: **Farmacologia e Terapêutica para Dentistas** 3<sup>th</sup> ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991. p.186-1991.

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.

ZELNIK, R. R.; ZITI, M.; GUIMARÃES, C.V. A chromatographic study of bufadienolides isolated from the venom of the parotoid glands of *Bufo paracnemis* Lutz. **J. Chromatogr** v. 15, p.9-14, 1964.