

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



TESIS

**Evaluación de la actividad anestésica local de extractos brutos
y del aceite esencial extraídos de *Ottonia anisum***

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

AUTOR: Dr. ESPINOLA LÓPEZ, Kelvin Stevens

ASESOR: Dr. SAGASTEGUI GUARNIZ, William Antonio

TRUJILLO - PERÚ

2022

DEDICATORIA

A Dios,
por iluminarme y bendecirme en todo este tiempo dedicado a la Ciencia.

El Señor da a los hombres el saber para que lo glorifiquen por los maravillosos remedios que creó. El médico los usa para curar y para quitar el dolor, el farmacéutico hace con ellos sus mezclas. De ese modo, las obras del Señor no se han terminado, y continúa difundándose el bienestar por la tierra.

Eclesiástico 38, 6-8

A mi hijo Nicolas Stevens,
Porque contigo comprendo cada día el verdadero significado del amor.

A mi madre Santos,
por su amor, fortaleza y apoyo incondicional permanente.

A mi esposa Mirian Kelly,
por su amor, apoyo y compañerismo.

In memoriam

A mi padre Andrés,
por su amor y su apoyo infinito.

A mis hermanos Li y Holger,

Por el cariño, ejemplo de superación y apoyo.

In memoriam

A mi hermana Roxana,
Por su cariño, apoyo e incentivo.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor de esta tesis Dr. William Sagastegui Guarniz, por sus enseñanzas, amistad, estímulo constante y por la oportunidad de asesorarme en este trabajo.

A mi asesor del Brasil Dr. Roberto Takashi Sudo por la oportunidad, estímulo, amistad y confianza.

A la profesora Dra. Maria Auxiliadora Coelho Kaplan, por su amistad, cariño, sabiduría y confianza.

A mi amigo Dr. André Mesquita Marques (IPPN) por haber colaborado con este proyecto al ceder las sustancias en estudio.

A todos mis profesores de Farmacia y Bioquímica, en especial al profesor Lizardo Cruzado Razco, César Gamarra Sánchez, Eduardo Ibáñez Zavaleta y Berta Boncún por sus enseñanzas, dedicación y contribuir grandemente en mi formación profesional.

A todos mis profesores e investigadores de maestría y doctorado, que con sus conocimientos sobre ciencia contribuyeron grandemente para mejorar académicamente, por su amistad, consejos y por considerarme como un brasileño.

A Jozsef, Noreen, Alessandra, Aneliese, Snayder, Esteban, Cyntia, Elias, Kris, Tania, Lenin, Héctor, Cesar, Juan, Jhon, Rolando, Lubida y a todos por compartir muchos momentos de diversión en familia.

A mis amigos peruanos; José Luis, Felipe, Will, Vanesa, Celis, Héctor, Miguelón, Carmen, Aleyda, Flor, Carlos, Cesar, Angelita, Manuel por disfrutar de nuestra amistad y apoyo, siempre.

A mis amigas brasileñas Paula y Adriane por la ayuda en los experimentos.

A todos mis amigos del laboratorio de Farmacología de la UFRJ - Brasil: Adriane, Sharlene, Menara, Carlos, Jaqueline, Allan, Gisele, Caroline Jóia, Guilherme, Barbara do Lago, Thaianá, Aline, Luana, Víctor, Daniele, Marcelle, Luciano, Carla, Daniela, Juliana, Silvânia, Tiago, Bruna, Rafael, Vera, Marcus e Caroline, por su amistad y compañerismo.

A la técnica del Laboratorio Marly de Souza, por su amistad y apoyo.

A Francisca por su apoyo e incentivo.

A mis amigos del Instituto de Pesquisa de Productos Naturales de la UFRJ: Ana Paula, Aline, Gloria, Marcus, Tiago, Daniela, Paulinho, Clarissa, Vitor y Vinicius, por la amistad y compañerismo.

A los miembros del jurado examinador y calificador, por la contribución dedicada a la revisión de esta tesis y por sus importantes recomendaciones para la excelencia de la misma.

Al Programa PEC-PG, CAPES, CNPq, INCT, Pronex por el apoyo financiero.

A los animales empleados en este estudio, por el apoyo involuntario, más que contribuyeron inestimablemente para la realización de esta tesis.

Mi agradecimiento a todos.

PRESENTACIÓN

SEÑORES MIEMBROS DEL JURADO DICTAMINADOR:

Dando cumplimiento a lo establecido por el reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, someto a vuestra consideración y criterio profesional, la presente tesis, titulada:

“Evaluación de la actividad anestésica local de extractos brutos y del aceite esencial extraídos de *Ottonia anisum*”

De manera especial agradezco la colaboración de los señores miembros del jurado y aprovecho la oportunidad para reconocer a mi Alma Mater y a toda la plana docente que con capacidad, voluntad y enseñanzas impartidas contribuyeron para mi formación profesional.

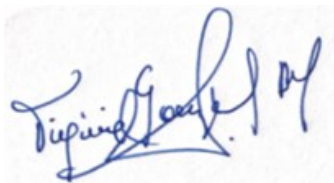
Dejo a vuestra consideración la respectiva calificación de la presente tesis.

Trujillo, 20 de abril del 2022



Dr. ESPINOLA LÓPEZ, Kelvin Stevens

JURADO DICTAMINADOR



Dra. María Virginia González Blas
PRESIDENTE



Dr. William Antonio Sagástegui Guarniz
ASESOR



Mg. Carmen Rosa Silva Correa
MIEMBRO

RESUMEN

El uso de las hojas de *Ottonia anisum* en la medicina popular para el alivio de la odontalgia, motivó el estudio de la actividad anestésica local (AL) de los extractos brutos, metanólico (OAF-MeOH) y hexánico (OAF-PH) y del aceite esencial (OAF-01). Modelos clásicos *in vivo* fueron usados en este estudio. Inyección intradérmica (3%) de OAF-MeOH y OAF-PH y del aceite esencial OAF-01 en cobayas causó anestesia de $325,8 \pm 5,4$ (n= 6), $262,8 \pm 2,4$ (n= 6) y $1658,4 \pm 35,4$ min (n= 6), respectivamente. Es importante resaltar, el hecho de que la duración de la anestesia causada por el OAF-01 (3%) fue 14 veces mayor al de la lidocaína (3%) ($119,2 \pm 3,1$ min, n= 6), anestésico usado como control positivo. La instilación de OAF-01 (0,005 y 0,01%, n= 4) en el globo ocular de conejos anestesió la córnea durante $18,8 \pm 1,0$ y $72,0 \pm 1,5$ min, respectivamente, superior ($P < 0,05$) a la lidocaína ($11,8 \pm 1,4$ y $40,8 \pm 0,9$ min, n= 4), respectivamente. Masajes con OAF-PH y OAF-01 (2%) (n= 6) durante 15 s anestesió la gingiva de cobayos durante $55,3 \pm 2,9$ y $249,6 \pm 2,4$ min, respectivamente, mayor ($P < 0,01$) al de la lidocaína (2%) ($23,1 \pm 1,0$ min, n= 6). Administración intratecal de OAF-01 (0,5%) y lidocaína (0,5%) en cobayos bloquearon las fibras sensitivas durante $44,3 \pm 6,5$ y $11,6 \pm 0,3$ min, respectivamente ($P < 0,001$). La actividad antinociceptiva medida en placa caliente puede ser demostrada con el OAF-MeOH (15 mg.kg⁻¹ i.p.) más, no con el OAF-01. Este estudio mostró una potente actividad anestésica local de los extractos OAF-MeOH y OAF-PH y del aceite esencial OAF-01 extraídas de las hojas de *Ottonia anisum* con acción selectiva en fibras nerviosas sensitivas.

Palabras clave: *Ottonia anisum*, anestésico local, fibras nerviosas sensitivas, fibras nerviosas motoras.

ABSTRACT

The use of leaves of *Ottonia anisum* in popular medicine for the relief of toothache motivated the study of the local anesthetic activity (LA) of the crude methanolic extracts (OAF-MeOH) and crude hexanic extracts (OAF-PH) and the essential oil (OAF-01). Classical *in vivo* models were used in this study. Intradermal injection (3%) of OAF-MeOH and OAF-PH and essential oil OAF-01 in guinea pigs caused anesthesia for 325.8 ± 5.4 (n= 6), 262.8 ± 2.4 (n= 6) and 1658.4 ± 35.4 min (n=6), respectively. It is important to highlight the fact that the duration of anesthesia caused by OAF-01 (3%) was about 14 times greater than that of lidocaine (3%) (119.2 ± 3.1 min, n= 6), anesthetic used as positive control. Instillation of OAF-01 (0.005 and 0.01%, n= 4) into the eyeball of rabbits anesthetized the cornea for 18.8 ± 1.0 and 72.0 ± 1.5 min, respectively, higher ($P<0.05$) to lidocaine (11.8 ± 1.4 min, and 40.8 ± 0.9 min, n= 4), respectively. Massages with OAF-PH and OAF-01 (2%) (n=6) for 15 s, anesthetized the gingiva of guinea pigs for 55.3 ± 2.9 (n= 6) and 249.6 ± 2.4 min, respectively, longer ($P<0.01$) to that of lidocaine (2%) (23.1 ± 1.0 min, n= 6). Intrathecal administration of OAF-01 (0.5%) and lidocaine (0.5%) in guinea pigs blocked sensory fibers for 44.3 ± 6.5 and 11.6 ± 0.3 min, respectively ($P<0.001$). The antinociceptive activity measured in the hot plate model was demonstrated with OAF-MeOH (15 mg.kg^{-1} i.p.) but, not with OAF-01. This study demonstrated a potent local anesthetic activity of the extracts OAF-MeOH and OAF-PH and essential oil OAF-01 extracted from leaves of *Ottonia anisum* with selective action on sensory nerve fibers.

Keywords: *Ottonia anisum*, local anesthetic, sensory nerve fibers, motor nerve fibers.

ÍNDICE

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	v
PRESENTACIÓN	vi
JURADO DICTAMINADOR	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIAL Y MÉTODOS	11
2.1. Obtención de los extractos hexánico y metanólico de las hojas de <i>O. anisum</i>	12
2.2. Obtención del aceite esencial	12
2.3. Evaluación de la actividad anestésica local <i>in vivo</i>	12
2.3.1. Evaluación de la actividad anestésica local por vía intradérmica	12
2.3.2. Evaluación de la actividad anestésica local por vía tópica en el globo ocular	13
2.3.3. Evaluación de la actividad anestésica local por la vía tópica gingival	13
2.3.4. Evaluación de la actividad anestésica local por vía intratecal	13
2.3.5. Evaluación de la actividad anestésica local por vía perineural	14
2.4. Evaluación de la actividad antinociceptiva sistémica	14
2.4.1. Evaluación de la actividad analgésica en Placa caliente	14
2.5. Análisis de datos	15
3. RESULTADOS	16
3.1. Efecto de la actividad anestésica local <i>in vivo</i>	17
3.1.1. Efecto de la actividad anestésica local por vía intradérmica en cobayos	17
3.1.2. Efecto de la actividad anestésica local por vía tópica en globo ocular en conejos	18
3.1.3. Efecto de bloqueo sensitivo anestésico local por vía gingival de cobayos	18
3.1.4. Efecto de la actividad anestésica local por la vía intratecal en cobayos	19
3.1.5. Efecto del bloqueo motor: inyección en la región perineural del miembro posterior de ratones	20
3.2. Efecto de la actividad antinociceptiva sistémica	21
3.2.2. Efecto de la actividad analgésica en Placa Caliente en ratones	21
4. DISCUSIÓN	22
5. CONCLUSIÓN	27
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales son recursos naturales que tienen merecida mención por su potencial en la producción de diversos medicamentos para beneficio de la humanidad. Comprenden diferentes familias botánicas en las cuales se encuentran especies ampliamente utilizadas por varios sectores de la sociedad. En el campo científico, la investigación se dirige a la búsqueda de nuevas sustancias naturales activas contra diversos tipos de enfermedades y síntomas¹. En las últimas décadas, varias sustancias derivadas de plantas tienen merecido destaque en función de sus efectos farmacológicos. El diterpeno taxol, aislado de plantas del género *Taxus*, es sintetizado en escala industrial y constituye un importante instrumento para el tratamiento del cáncer de ovario y pulmón. La forskolina, obtenida de *Coleus barbatulus*, presenta promisorios efectos contra hipertensión, glaucoma y ciertos tumores. La artemisinina, presente en *Artemisia annua*, posee propiedades antiinflamatoria, diurética, sedativa, antiespasmódica y antiplasmodium². Es destacable la importancia terapéutica de varios otros compuestos derivados de productos naturales como morfina, emetina, vincristina, colchicina y rutina³.

El enfoque multidisciplinar de la fitoquímica moderna contempla, entre otros, la farmacología y toxicología, las cuales son indispensables para la verificación de la actividad, de la aplicabilidad terapéutica y del grado de toxicidad de los extractos brutos o de sus sustancias activas aisladas e identificadas^{4,5}.

Los avances en la investigación de fitoterápicos a nivel farmacológico permitirán la obtención de medicamentos con el mecanismo de acción total o parcialmente esclarecido. Además de eso, ha habido avances en la evaluación toxicológica realizada según las normas que rigen los procesos de validación de fármacos, aumentando la seguridad para uso clínico.

El estudio fitoquímico de algunas plantas permitirá gran avance en las investigaciones de nuevos fármacos, por medio de la identificación de prototipos seguido de planeamiento molecular, tornándola más eficiente en su interacción con el blanco biológico para la acción farmacológica⁶.

En el segmento industrial es nítido el resurgimiento del interés por los productos naturales como fuente de modelos para fármacos^{7,8,9} y de la materia prima para el desarrollo de fitoterápicos¹⁰. En 1995, el mercado mundial de plantas medicinales invirtió más de US\$ 12 mil millones/año. En 1999, el valor global del mercado de los preparados a base de las plantas medicinales alcanzó US\$ 19,6 mil millones y en 2002, ultrapasó US\$ 24 mil millones¹¹. Este mercado incluye desde la materia-prima hasta el producto terminado. Se ha observado también que la utilización de los preparados fitoterápicos aumenta en todo el mundo¹¹.

El Brasil es un país que ocupa el primer lugar en mega biodiversidad en la faz de la Tierra. Posee una de las mayores proporciones de plantas superiores del mundo, pero, sufre con la deforestación acelerada y descontrolada. Descubrir nuevas sustancias químicas de plantas brasileñas y evaluar sus potenciales biodinámicas es un gran desafío. La familia Piperaceae, por ejemplo, está distribuida de norte a sur del Brasil¹² y sus especies tienen diversas indicaciones terapéuticas¹³.

De esta forma, buscar productos naturales bioactivos de origen vegetal y evaluar su actividad farmacológica constituye una vía interesante bajo el punto de vista científico, tecnológico y económico, principalmente para países en desarrollo que posean gran diversidad biológica, como es el caso del Brasil.

Es conocido desde la antigüedad que mascar hojas de *Erythroxylum coca* causa adormecimiento de la mucosa bucal y de la lengua. La cocaína (Figura 1), el principio activo presente en estas hojas fue aislado en 1860 por Albert Niemann. Von Anrep (1880) sugirió el uso clínico de la cocaína al observar la pérdida de la sensibilidad después de la infiltración cutánea, pero, la sugerencia no fue inmediatamente aceptada. La cocaína fue introducida en la práctica clínica como anestésico por Carl Koller en 1884, que realizó una cirugía oftalmológica, con audiencia pública, después de la instilación tópica en el globo ocular. Por esa demostración Koller es considerado el padre de la anestesia local. A pesar de la identificación de algunos efectos tóxicos, la cocaína fue utilizada por más de veinte años. Curiosamente, productos conteniendo la cocaína como principio activo, podían ser encontrados en nuestros hospitales hasta el inicio del siglo XX. Observaciones realizadas por Sigmund Freud y otros alertaron el gran potencial de desarrollo de dependencia química, lo que llevó a la prohibición del uso de la cocaína en 1914¹⁴.

Propiedades anestésicas locales pueden ser vistas en una variedad de sustancias químicas como amino-ésteres, amino-amidas, cetonas, tio-amidas, alcoholes, derivados de urea y poliésteres. Los ALs bloquean de forma reversible la generación y propagación de los potenciales de acción^{15,16} en el cordón espinal, en la raíz del nervio espinal o en nervios periféricos y así, inhiben la sensación de dolor sin pérdida de la consciencia¹⁷. Entre tanto, el hecho de que una sustancia presente propiedad anestésica local no le garantiza que deba ser usado o clasificado como AL para uso clínico. La toxicidad local y sistémica son los principales factores limitantes.

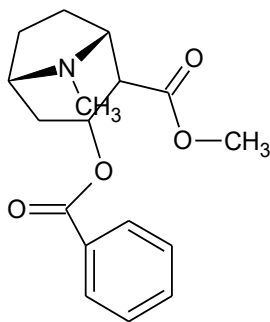


Figura 1. Estructura química de la cocaína

La procaína (Figura 2), un éster derivado del ácido para-aminobenzóico (PABA) sintetizada en 1905 por Einhorn, fue el primer AL sintético y su uso clínico perduró por casi medio siglo. En función de la ausencia del efecto central, como la dependencia, substituye progresivamente la utilización de la cocaína. La tetracaína (Tabla 1) de mayor potencia y duración de efecto que su análogo la procaína que fue introducida en 1935¹⁸. Entre tanto, luego se demostró la potencialidad tóxica sistémica de la tetracaína¹⁹. La toxicidad del metabolito PABA²⁰ y la rápida metabolización de la ligación éster por enzimas esterases plasmáticas limitaron el uso de los ALs amino-ésteres (procaína y tetracaína). Estos hechos contribuyeron para la búsqueda de nuevas sustancias anestésicas locales. Un gran progreso fue alcanzado con el descubrimiento de sustancias amino-amidas, a partir de 1943 (Tabla 1).

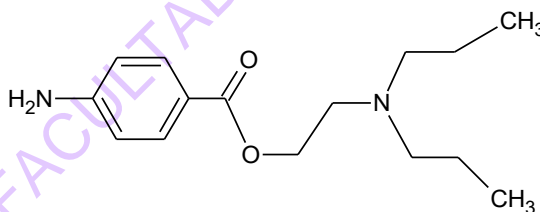


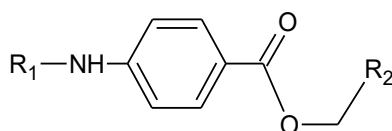
Figura 2. Procaína

La lidocaína (Tabla 1) sintetizada por Löfgren y Lundquist en 1943 determinó el pionerismo de sustancias amidas con actividad anestésica local para uso clínico. La gran diferencia de la lidocaína en relación a los derivados ésteres como la procaína y la tetracaína fue la reducida incidencia de reacciones alérgicas. El uso clínico no se restringió a la aplicación local. Protocolos para uso venoso fueron desarrollados para la anestesia regional intravenosa²¹, uso sistémico para mejorar la función acústica²², controlar las arritmias cardíacas y, como analgésico en el control del dolor central²³. La lidocaína aún puede ser indicada en el tratamiento preventivo del dolor neuropático, dolor agudo postoperatorio y dolor refractario a los opioides²⁴.

Ekstram *et al.*, en 1957 sintetizaron una serie homóloga de sustancias pertenecientes al grupo de las pipercolilixilidas (PPX) el cual contienen un átomo de nitrógeno piperidínico en la molécula. La introducción de diferentes radicales al átomo de nitrógeno originó nuevos ALs de

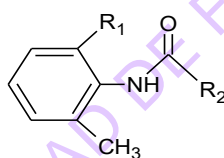
interés clínico. La introducción del grupo metilo originó el N-metil pipercolililidida (metil PPX o mepivacaína), butila, N-butil pipercolililidida (butil PPX o bupivacaína) y propila, N-propil pipercolililidida (propil PPX o ropivacaína).

Tabla 1. Estructura química de ALs y su correlación con los prototipos ésteres y amidas.

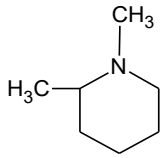
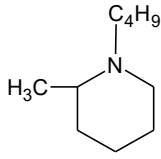


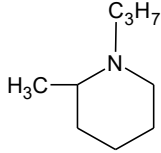
Prototipo éster

Anestésico local	R ₁	R ₂	Síntesis	pKa
Benzocaína	-H	-CH ₃	1890	2,5
Procaína	-H	-CH ₂ -N(C ₂ H ₅) ₂	1905	8,9
Tetracaína	C ₄ H ₉	-CH ₂ -N(CH ₃) ₂	1930	8,6



Prototipo amida

Anestésico local	R ₁	R ₂	Síntesis	pKa
Lidocaína	-CH ₃	-CH ₂ -N(C ₂ H ₅) ₂	1943	7,9
Etidocaína	-CH ₃	-CH(C ₂ H ₅)-N(C ₂ H ₅) ₂	1970	7,7
Prilocaina	-H	-CH(CH ₃)-NH-C ₃ H ₇	1972	7,7
Mepivacaína	-CH ₃		1957	7,6
Bupivacaína	-CH ₃		1957	8,1

Ropivacaína	-CH ₃		1987	8,1
-------------	------------------	---	------	-----

La bupivacaína (Figura 3) fue introducida para la utilización clínica en 1963. En función de su alta potencia y larga duración del efecto es actualmente el AL más utilizado. Sin embargo, estudios en animales revelaron que la bupivacaina es 6 a 10 veces más cardiopélica que la lidocaína^{25,26}. Esto se confirmó en el hombre por medio de relatos de varios casos de difícil resolución de intoxicación sistémica por la bupivacaina, algunos de ellos resultando en la muerte de los pacientes²⁷.

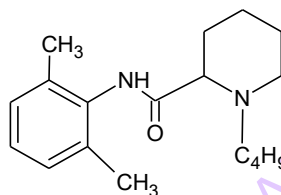


Figura 3. Bupivacaina

Los ALs son sustancias que impiden la generación y/o la propagación del impulso nervioso, cuyo principal lugar de acción es la membrana celular. Impiden el aumento transitorio de la permeabilidad de las membranas excitables al Na⁺ que normalmente es provocado por una leve y rápida despolarización de las mismas^{28,29,30,31}. La acción de los ALs resulta de la interacción directa con los canales de Na⁺ operados por voltaje (Na_v). A medida que esta acción se instala, la tasa de influjo de Na⁺ para la célula disminuye, resultando en una despolarización más lenta del potencial de acción y disminución de la velocidad de conducción del impulso^{32,33,34,35,36,37,38}.

Las moléculas anestésicas locales lipofílicas, no-ionizadas, cruzan la membrana fosfolipídica neuronal. Las moléculas se disocian para alcanzar un nuevo equilibrio de fracciones ionizadas y no-ionizadas, dependiendo del pH intracelular y del pKa del AL. La forma ionizada se une a los canales de Na⁺ abiertos, controlados por voltaje de manera reversible y dependiente de la concentración. El sitio de unión de los ALs se localiza en el dominio IV, segmento S6 y apenas es accesible cuando el canal está abierto. La unión de los ALs a los canales de Na⁺ abiertos, aumenta con la frecuencia de la despolarización del nervio. Esto es conocido como bloqueo fásico o dependiente del uso. El fármaco AL unido, estabiliza el estado inactivado del receptor, evitando una mayor transmisión neuronal. El bloqueo nervioso con el AL es dependiente de la concentración. A medida que se aumentan las concentraciones de AL, el pico del potencial de

acción disminuye, el umbral del disparo aumenta, la conducción del impulso se atenúa y el periodo refractario se alarga. El aumento de las concentraciones, inhibe totalmente la conducción nerviosa³².

La posible interacción de los ALs con el canal de Na⁺ y su afinidad con los diferentes estados de activación, activo, inactivo y reposo, fue demostrada en varios trabajos publicados a partir de 1953³⁹. Un experimento clásico realizado en los años setenta, mostró que los análogos cuaternarios de los ALs apenas inhiben la excitabilidad de los axones gigantes de calamar, cuando estos eran perfundidos internamente a la célula. De estos resultados se concluyó que la forma cargada de los ALs sería la responsable por el efecto anestésico y el acceso al sitio molecular de la acción sería a través de la parte interna de la membrana⁴⁰.

Buscar ALs de menor toxicidad pasó entonces a ser prioridad en este grupo de sustancias. En este sentido, en la década de 70 se despertó el interés por el estudio diferenciado de sustancias anestésicas que tuvieran en su estructura un centro quiral. Una de estas sustancias fue la propia bupivacaína cuyo producto comercial contiene mezcla equimolecular de los isómeros R(+) y S(-)-bupivacaína. Varios estudios mostraron significativas diferencias en la potencia y toxicidad entre los isómeros^{41,42,43,44}. En experiencias realizadas en animales se constató que la S(-)-bupivacaína es el isómero de menor cardiotoxicidad cuando comparada a la R(+)-bupivacaína, sin embargo, su potencia es inferior a la mezcla racémica⁴⁵. Mezcla no enantiomérica con exceso de la forma S(-)-bupivacaína (75% S(-) + 25% R(+)-bupivacaína) con menor toxicidad y equipotencia en relación a la mezcla racémica fue desarrollada en el Brasil³¹ y motivo de patente internacional (PCT/BR01/00040). El Brasil es el único país a comercializar este producto con gran ventaja terapéutica. Estudio toxicológico mostró que S(-)-ropivacaína es menos tóxica cuando es comparada a la bupivacaína⁴⁶. Estos datos y otros contribuyeron para la producción de la ropivacaína solamente en su forma levógira S(-)-ropivacaína⁴⁷.

Además del efecto anestésico local, algunas sustancias amidas, como la lidocaína actúan en la reacción inflamatoria. Tal vez esto explique el alivio del dolor después de las inyecciones intraarticulares de lidocaína en casos de osteoartritis articular periférica, especialmente en la articulación de la rodilla⁴⁸. La lidocaína posee propiedades antiinflamatorias significativas⁴⁹, reduciendo la liberación de citocinas al inhibir la activación de los neutrófilos *in vivo* e *in vitro*^{36,50,51,52,53} ^{37,38,39}. Es interesante destacar que algunos análogos de la lidocaína desprovistos de actividad anestésica tienen significativo efecto antiinflamatorio, principalmente de las vías respiratorias, sirviendo así, de un importante instrumento farmacológico para el tratamiento del asma y otras enfermedades inflamatorias pulmonares^{40,54,55,56}.

Aunque el efecto anestésico sea reversible hay indicios que los ALs son citotóxicos. La citotoxicidad varía entre los anestésicos, dependiendo de la concentración y del uso simultáneo de vasoconstrictores^{57,58}. Hay relatos de parálisis y parestesia causada por la acción quimiotóxica, muchas veces irreversibles, después del uso por la vía intratecal y en bloqueos del plexo braquial⁵⁹.

También son observadas lesiones de tejido después del uso por infiltración⁶⁰. Entre tanto, la toxicidad sistémica como consecuencia de un aumento en la concentración plasmática es una gran preocupación por el uso de ALs. Las causas más comunes son administración intravenosa accidental y uso de dosis más de las recomendadas^{61,62}. La toxicidad sistémica envuelve principalmente el sistema nervioso central y cardiovascular. La convulsión tónico-clónica y el colapso cardiovascular son las más temidas. Los mecanismos envueltos con la cardiotoxicidad de los ALs⁵⁷ pueden ser consecuentes de los efectos directos en los tejidos de conducción y en el músculo cardíaco⁴⁷. La toxicidad en el sistema nervioso central, aún no esclarecido, resulta de la acción preferencial de los ALs en áreas subcorticales, principalmente la amígdala y el hipocampo⁶³. La toxicidad cardíaca es caracterizada por disminución de la contractilidad ventricular, pérdida del tono vaso motor periférico, colapso cardiovascular y arritmia. De entre los ALs usados la gravedad de la toxicidad sistémica es mayor con la tetracaína y bupivacaína. La cardiotoxicidad de la bupivacaína está relacionada con la cinética de inhibición del Nav1.5, o sea, mantiene el canal en estado inactivado más de lo fisiológico, generando las arritmias cardíacas⁵⁷.

La toxicidad de los ALs es preocupante y al mismo tiempo motivadora para la investigación de nuevos compuestos de origen sintético o natural. En función de este argumento el presente trabajo de tesis estudió la actividad farmacológica de la planta de la especie *Ottonia anisum* con potencialidad para uso como anestésico local.

Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito sobre la toxicidad de los ALs sintéticos y observando la necesidad de descubrir nuevos fármacos ALs o con propiedades anestésicas locales de origen vegetal, es que se viene estudiando la familia Piperaceae que presenta cinco géneros: *Piper*, *Peperomia*, *Ottonia*, *Sarcorrhachis* y *Pothomorphe*, abarcando cerca de dos mil especies que poseen hábitos herbáceos y arbustivos o raramente arbóreos y lianas⁶⁴.

La familia Piperaceae se encuentra de norte a sur del Brasil y sus especies son utilizadas para fines medicinales desde los tiempos antiguos, siendo por eso una fuente estimulante para la investigación fitoquímica y farmacológica^{65,66,67,68,69,70,71,72}. De las 23 especies descritas para el género *Ottonia*, la mayoría es nativa del Brasil, siendo encontradas, principalmente, en las regiones Sur y Sureste^{73,59}. Esas plantas son popularmente utilizadas en el país como diuréticas, salivantes y anestésicas, siendo muchas veces conocidas como “anestesia” y “falso

jaborandi^{74,75,76,77,78,79}. Estudios etnobotánicos realizados en América Central y el norte de América del Sur (región amazónica) señalan la potencialidad anestésica de especies pertenecientes a la familia Piperaceae. Tales especies, son poseedoras de una característica marcante, inflorescencias en la forma de espigas, siendo comúnmente utilizadas en comunidades como, por ejemplo, para el tratamiento de dolor de diente en Costa Rica y Brasil. La especie *Ottonia anisum* es una fuente promisoras de metabolitos secundarios de entre ellas las amidas, son de gran interés medicinal⁷⁹. El aislamiento de sustancias a partir del género *Ottonia* tuvo inicio con Dustan y Garnett (1895) los cuales trabajaron con *Ottonia vahlii*, obteniendo un aceite esencial capaz de provocar hormigueamiento en los labios y lengua en pueblos de Trinidad, donde la misma era utilizada para fines medicinales. Pinder y Price (1967) elucidaron la estructura molecular de esa sustancia como C₁₁H₁₄O₂, denominándola de 1-butil-3,4-metilenodioxibeneno. Giesbrecht y colaboradores (1981) llegaron a la misma sustancia a partir de raíces y tallos de *Ottonia anisum*. Moreira y colaboradores (1997) identificaron la presencia de 1-butil-3,4-metilenodioxibeneno como uno de los componentes del aceite esencial de hojas de *O. anisum*. Sin embargo, el mismo producto no fue encontrado por Santos y colaboradores (2001). A pesar de ser utilizada en la medicina popular en algunas regiones del país, poco se sabe sobre la riqueza, el potencial químico y biológico de esa especie.

El género *Ottonia* es uno de los géneros pertenecientes a la familia Piperaceae, familia pantropical (flora comprendiendo toda el área de los trópicos, neotropical y paleotropical) con especies distribuidas en las florestas brasileñas, productoras de sustancias de gran interés medicinal^{80,81,82}.

De entre las diversas especies de Piperaceae brasileñas, se encuentra la *Ottonia martiana* Miq., arbusto de la Floresta Atlántica⁷³, conocida como “anestesia” por los nativos del litoral paranaense^{74,75,83}. Debido a la acción anestésica sobre la mucosa oral, sus raíces y partes aéreas son empleadas popularmente en el tratamiento de odontalgias, *in natura*, en la forma de fragmentos o alcoholaturas^{74,84}. Sin embargo, a pesar de esta propiedad medicinal ser popularmente reconocida, son escasos los estudios respecto a la actividad química y biológica de *O. anisum*⁷⁹.

Ensayo farmacológico del extracto bruto etanólico de *Ottonia martiana* no presentó toxicidad en el test de la irritación de la mucosa oral, en ratones presentaron intensa secreción salivar (también en conejos), además de erección de la cola (prueba de Straub positiva). La DL₅₀ fue de 164,5 mg.kg⁻¹ por vía oral y de 65 mg.kg⁻¹ por vía intraperitoneal. La actividad anestésica local exhibida por el extracto bruto etanólico en modelo de anestesia intradérmica en cobayos no fue detectada en el bioensayo de los reflejos palpebrales en córnea de conejos. La fase hexano y

la fase clorofórmica mostraron ser las fases bioactivas del extracto bruto etanólico de esta especie vegetal^{85,70}.

La especie *Ottonia corcovadensis* Miq. es un arbusto herbáceo perteneciente a la familia Piperaceae, conocida en la medicina popular brasileña con el nombre de “falso jaborandi”. Sus raíces y en menor extensión, los tallos son masticados para aliviar el dolor de diente, debido a su acción anestésica en las mucosas de la boca⁷⁹. La extracción con éter de petróleo de las raíces de una especie colectada en la montaña del Corcovado, Rio de Janeiro, Brasil, resultó en la presencia de 5 amidas: la piperovatina, piperlonguminina, corcovadina, la isopiperlonguminina y la isocorcovadina. La amida piperovatina, presentó actividad anestésica⁸⁶.

De todo lo descrito, se reconoce que los productos naturales son fundamentales en la sustentación de la civilización moderna, pues garantizan la mejorar calidad de vida del ser humano, ya que muchos son menos dañinos a los seres vivos y al medio ambiente⁵, siendo la realización de un estudio farmacológico de *Ottonia anisum* justificado.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar los efectos farmacológicos de los extractos y del aceite esencial de la especie vegetal *Ottonia anisum*.

Objetivos Específicos

1. Evaluar el efecto anestésico local de los extractos metanólico OAF-MeOH y hexánico OAF-PH, y del aceite esencial OAF-01 de las hojas de *Ottonia anisum* administrados a través de diferentes vías de administración.
2. Evaluar la selectividad del efecto anestésico local en fibras sensitivas.
3. Evaluar la acción antinociceptiva sistémica en modelo de dolor agudo.

MATERIALES Y MÉTODOS

2. METODOLOGIA

2.1. Sustancias

Los extractos y el aceite esencial utilizados en este estudio fueron gentilmente cedidos por la profesora Dra. María A. Coelho Kaplan del Núcleo de Investigación de Productos Naturales, UFRJ-Brasil.

2.1.1. Obtención de los extractos hexánico y metanólico de las hojas de *O. anisum*

El material fresco y fragmentado extraído por maceración estática, sucesivamente, con hexano por tres días, con cambio diario de solvente y con metanol suspendido en CH₃OH/H₂O (3:7) por cinco días, con cambio diario de solvente.

2.1.2. Obtención del aceite esencial

El aceite esencial de las hojas de la especie *Ottonia anisum* se extrajo por hidrodestilación en aparato tipo Clevenger⁸⁷, por dos horas.

2.2. Animales

Los animales de experimentación que se utilizaron fueron cobayos (*Cavia porcellus*), conejos (*Oryctolagus cuniculus*) y ratones suizos (*Mus musculus*), provenientes del Bioterio del Programa de Desarrollo de Fármacos del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Federal de Rio de Janeiro. Los protocolos experimentales utilizados en este estudio, fueron aprobados por la Comisión de Ética para el Uso de Animales de Experimentación del Centro de Ciencias de la Salud (CEUA-CCS) de la UFRJ bajo los números DFBCICB058 (*Cavia porcellus*), DFBCICB055 (*Oryctolagus cuniculus*) y DFBCICB056 (*Mus musculus*).

2.3. Evaluación de la actividad anestésica local *in vivo*

La actividad anestésica local de los extractos metanólico, hexánico y de aceite esencial de las hojas de *Ottonia anisum* se evaluó en modelos *in vivo*, descritos a seguir:

2.3.1. Evaluación de la actividad anestésica local por vía intradérmica

El ensayo descrito se basó en la metodología usada por Bülbring y Wajda⁸⁸ y Henn⁸⁹, con algunas modificaciones. Cobayos machos, pesando entre 250 y 350 g, fueron sometidos a tricotomía de la región dorsal en el día anterior a la realización de los ensayos. Se demarcaron 7

áreas circulares de aproximadamente 2 cm de diámetro. Seis de estas áreas fueron utilizadas para la administración de los extractos brutos metanólico (OAF-MeOH) o hexánico (OAF-PH) o aceite esencial (OAF-01) de las hojas de *Ottonia anisum* por vía intradérmica (i.d.) en un volumen de 0.1 ml. Por cada animal fueron aplicados dos concentraciones de uno de los extractos o aceite esencial en triplicado. Solución salina (0.1 ml) fue administrada en una de las áreas demarcadas para servir de control negativo. Concentraciones decrecientes de los extractos y del aceite esencial se administraron en diferentes animales para definir la concentración límite efectiva. La lidocaína utilizada como control positivo también se administró en concentraciones decrecientes. La eficacia de la anestesia fue constatada a través de la inhibición del reflejo motor en respuesta al pinchamiento de la piel de la región demarcada realizado con una pinza tipo diente de rata. Los parámetros evaluados fueron: 1) límite de concentración anestésica, definida como la menor concentración que bloqueará la respuesta del animal al estímulo doloroso; 2) duración del bloqueo sensitivo, definido como el tiempo entre el inicio y término del bloqueo al estímulo doloroso. Los datos (media \pm EPM) resultaran de 6 inyecciones para cada concentración.

2.3.2. Evaluación de la actividad anestésica local por vía tópica en el globo ocular

La actividad anestésica local por vía tópica ocular se evaluó en conejos machos albinos, pesando entre 2.5 a 3.0 kg. En función de la alta potencia constatada en el ensayo de botón i.d. y por el hecho de ser soluble en solución salina y no presentar irritación en la córnea, apenas el aceite esencial (OAF-01) se testó en este modelo. Dos gotas (aproximadamente 0,1 ml) de OAF-01 en concentraciones de 0.005 e 0.01% fueron aplicadas directamente sobre la córnea del ojo izquierdo. El ojo derecho se utilizó como control negativo donde se instiló la solución salina. La lidocaína (0.005 y 0.01%) se aplicó como control positivo. La anestesia local constatada a través de la inhibición del reflejo motor (cierre de la párpala) al estímulo táctil aplicado sobre la córnea por medio de un hisopo de algodón. El tiempo entre la inducción y recuperación de la pérdida de la sensibilidad de la córnea será definido como la duración de la anestesia tópica. Los datos representaran la media \pm EPM de 6 administraciones para cada concentración.

2.3.3. Evaluación de la actividad anestésica local por la vía tópica gingival

La actividad anestésica local por vía tópica gingival será evaluada en cobayos machos entre 250 a 350 g de peso. Hisopos de algodón embebidos con lidocaína (2%), OAF-PH (2%) o OAF-01 (2%) en volumen de 0,1 ml fueron directamente aplicadas en contacto con la gingiva, en local adyacente a los dientes incisivos, durante 15 s. La anestesia fue constatada a través de la inhibición del reflejo motor al estímulo algogénico que, en el caso, fue el pinchamiento de la gingiva

con pinza diente de rata. Fue evaluada la duración del bloqueo sensitivo. Los datos representaron la media \pm EPM (n= 6).

2.3.4. Evaluación de la actividad anestésica local por la vía intratecal

Esta actividad fue testada en cobayos machos entre 250 a 350 g de peso. Después de la tricotomía de la región lumbar, la punción fue efectuada entre los espacios L4-L5 con una aguja calibre 27-G conectada a una jeringa de 0,5 ml. Serán inyectados 0,05 ml de una solución 0,5% de OAF-01 o 0,5% de lidocaína (control positivo). La pérdida del tonus muscular de las patas posteriores fue utilizada como parámetro de bloqueo motor. La pérdida de la sensibilidad, medida después de la recuperación del tonus motor, fue medida través de la inhibición del reflejo motor al estímulo algogénico que, en el caso, será el pinchamiento del tendón del músculo gastrocnemio de las patas posteriores con pinza diente de rata. La duración del bloqueo motor fue el tiempo entre el inicio de la pérdida de la postura normal del animal hasta la recuperación de la misma y la duración del bloqueo sensitivo fue el tiempo entre el inicio del bloqueo motor hasta la recuperación del bloqueo sensitivo. Los datos experimentales fueron transformados en la media \pm EPM (n= 6).

2.3.5. Evaluación de la actividad anestésica local en el bloqueo motor por vía perineural

Con el objetivo de investigar el efecto anestésico local en fibras sensitivas y motoras *in vivo*, 0,05 ml de OAF-MeOH, OAF-PH y OAF-01 de una solución a 3% fueron inyectados por la vía perineural en el trayecto del nervio ciático en la región trocarteriana (lugar donde se encuentra el hueso trocánter) de ratones machos pesando entre 20 a 30 g. El bloqueo motor fue constatado por la pérdida del tonus muscular y el bloqueo sensitivo por la ausencia del reflejo motor en respuesta a la estimulación dolorosa inducida en la región posterior de la pata (tendón del músculo gastrocnemio). El bloqueo sensitivo sólo fue evaluado después de la recuperación del bloqueo motor. La duración del bloqueo motor fue considerada como siendo el tiempo entre la pérdida del tonus muscular, que fue constatada por la pérdida de la postura normal del animal cuando quede en pie y al caminar hasta su recuperación. La duración del bloqueo sensitivo fue considerada entre la instalación del bloqueo motor que fue constatada a través de la inhibición del reflejo motor en respuesta al pinchamiento de la región plantar de las patas posteriores realizado con una pinza tipo diente de rata hasta la recuperación del bloqueo sensitivo.

2.4. Evaluación de la actividad antinociceptiva sistémica

2.4.1. Evaluación de la actividad analgésica en Placa Caliente

Posibles efectos antinociceptivos supra-espinales inducidos por el OAF-MeOH y OAF-01 fueron testados en modelo de placa caliente⁹⁰. El método consistirá en la medida del tiempo en que el animal permanezca sobre una placa metálica (LE 7406 Hot plate, Letica) calentada a 52 ± 1 °C. Alcanzado el límite nociceptivo el animal reaccionará levantando las patas delanteras seguido de lamedura en la tentativa de enfriarlas. Se utilizaron ratones suizos pesando entre 18 y 25 g (10 animales por dosis), para la administración de sustancias antinociceptivas. El tiempo máximo permitido (“cut off”) para el animal quedar sobre a placa caliente fue de tres veces y valor medio de permanencia en el control evitando así, lesión tecidual en las patas del mismo.

El OAF-MeOH fue testado en la dosis de 15 mg.kg^{-1} (i.p.) y el OAF-01 em las dosis de 10 y 30 mg.kg^{-1} (i.p.). DMSO fue administrado en el grupo control. Los resultados obtenidos después de la administración del DMSO y de las sustancias fueron expresados bajo la forma de porcentaje de actividad analgésica (%AA) calculada según la fórmula:

$$\%AA = \frac{(\text{latencia post-tratamiento}) - (\text{latencia post-DMSO})}{(\text{“cut off”}) - (\text{latencia post-DMSO})} \times 100$$

2.5. Análisis de datos

Los resultados de los experimentos fueron calculados de por lo menos 5 experimentos independientes (n=6), usando la media \pm EPM de cada grupo de experimentos y GraphPad Prism 5.0 (GraphPadTM Software, San Diego, CA, USA), y los gráficos serán exhibidos.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Efecto de la actividad anestésica local *in vivo*

3.1.1. Efecto de la actividad anestésica local por vía intradérmica en cobayos

La eficacia del bloqueo sensitivo fue evaluada por medio del pinchamiento de la región demarcada. La misma concentración de lidocaína (control positivo), extractos brutos OAF-MeOH y OAF-PH y del aceite esencial OAF-01, fueron inyectados por triplicado en cada animal para cada sustancia, y la duración del bloqueo sensitivo determinado por la media observada en las 3 áreas circulares en las cuales fueron administradas las sustancias. Conforme se presenta en la Figura 4 en la concentración de 3%, la duración del bloqueo sensitivo de la lidocaína, extractos brutos OAF-MeOH y OAF-PH y del aceite esencial OAF-01 fue de $119,2 \pm 3,1$; $325,8 \pm 5,4$; $262,8 \pm 2,4$ y $1658,4 \pm 35,4$ min, respectivamente, observándose actividad superior del bloqueo sensitivo causado por el OAF-01 en comparación con las otras sustancias testadas (* $P < 0,05$ vs lidocaína y # $P < 0,01$ vs lidocaína o extractos). En la concentración de 0.006% la duración del bloqueo sensitivo para las mismas fue de $15,0 \pm 1,2$; $55,8 \pm 9,0$; $90,0 \pm 16,8$ y $288,4 \pm 47,1$ min, respectivamente. En esta concentración, la duración del bloqueo sensitivo del OAF-01 fue significativamente mayor que de las otras sustancias. La concentración límite que causó anestesia con el OAF-01 fue de 0.0015%, inferior al de la lidocaína (0.047%) y de los extractos brutos OAF-MeOH (0.006%) y OAF-PH (0.006%) (Figura 4). La duración del bloqueo sensitivo del OAF-01 (es cerca de 14 veces más que de la lidocaína) resultado que no se observa con ningún anestésico local disponible para uso clínico. Los extractos brutos OAF-MeOH y OAF-PH también causaron bloqueo sensitivo de duración significativamente mayor del que la lidocaína ($P < 0,05$) (Figura 4).

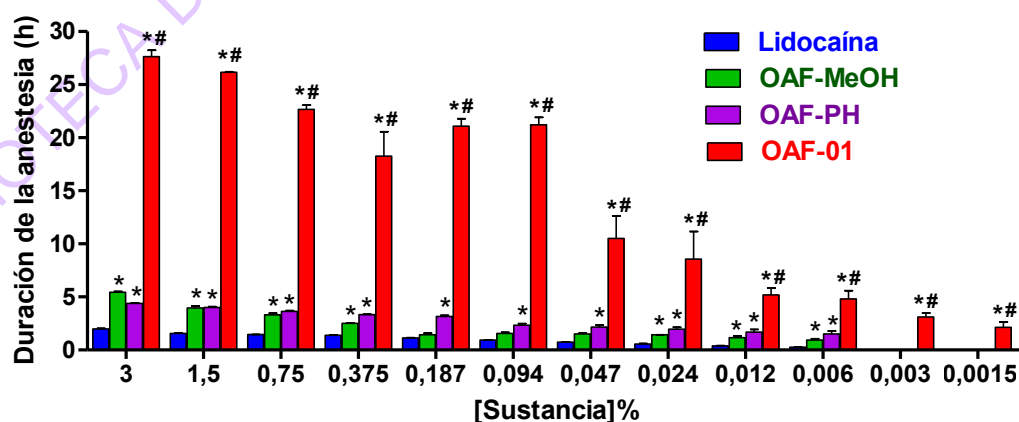


Figura 4. Duración del bloqueo sensitivo inducido por la administración i.d de lidocaína en cobayos, extractos OAF-MeOH, OAF-PH y aceite esencial OAF-01 (n= 6). La barra representa la media \pm EPM. * $P < 0,05$ vs lidocaína y # $P < 0,01$ vs extractos (test t-Student).

3.1.2. Efecto de la actividad anestésica local por vía tópica en globo ocular en conejos

En este experimento se evaluó la actividad anestésica local de la lidocaína (ojo derecho) y OAF-01 (ojo izquierdo) en concentraciones de 0.005 y 0.01%. Dos gotas (equivalente a 0.1 ml) de las sustancias fueron administradas en cada ojo. La duración del bloqueo sensitivo de la lidocaína y del OAF-01, en la concentración de 0.005% fue de 11.8 ± 1.4 y 18.8 ± 1.0 min ($P < 0.05$), respectivamente (Figura 5).

En la concentración de 0.01% la duración del bloqueo sensitivo causada por la lidocaína y OAF-01 fue de 40.8 ± 0.9 y 72.0 ± 1.5 min ($P < 0.05$), respectivamente (Figura 5).

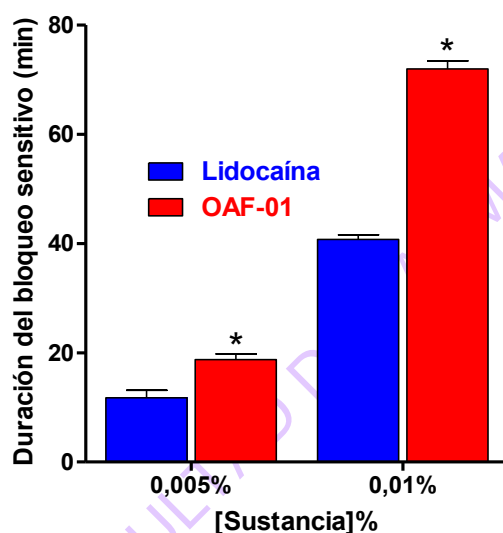


Figura 5. Duración del bloqueo sensitivo inducido por la lidocaína y OAF-01 en las concentraciones de 0.005 y 0.01% administradas por la vía tópica en el globo ocular de conejos. La barra representa la media \pm EPM ($n = 4$). * $P < 0,05$ vs lidocaína (test t-Student).

3.1.3. Efecto en el bloqueo sensitivo anestésico local por vía tópica gingival en cobayos

La actividad anestésica local tópica por la vía gingival fue testada con lidocaína (2%), OAF-PH (2%) y OAF-01 (2%). Las sustancias fueron aplicadas directamente en contacto con la gingiva, en la región adyacente a los dientes incisivos de cobayos. Los resultados mostraron que la duración del bloqueo sensitivo causado por la lidocaína ($n = 6$), OAF-PH ($n = 6$) y OAF-01 ($n = 6$) fue de 23.1 ± 1.0 ; 55.3 ± 2.9 y 249.6 ± 2.4 min, respectivamente. La actividad anestésica del OAF-01 y OAF-PH fue significativamente mayor ($P < 0.01$) en comparación con la lidocaína, siendo la actividad anestésica del OAF-01 también mayor en relación al extracto OAF-PH ($P < 0.01$). Es importante resaltar el hecho de que la duración del bloqueo causado por el OAF-01 es aproximadamente cuatro veces superior al del OAF-PH y diez veces al de la lidocaína por esta vía de administración (Figura 6).

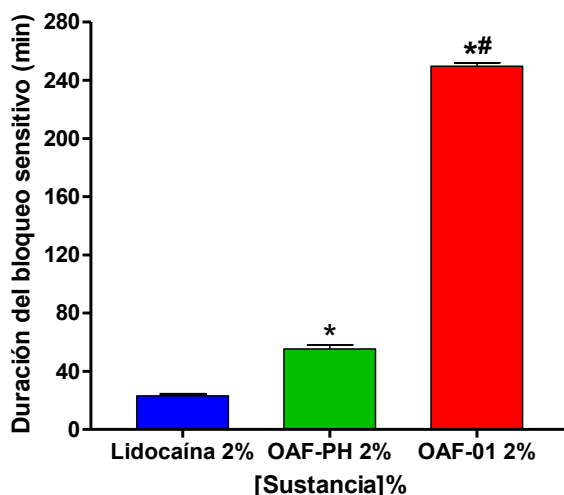


Figura 6. Duración del bloqueo sensitivo inducido por la lidocaína, OAF-PH y OAF-01 administradas por la vía tópica en la gingiva de cobayos. La barra representa la media \pm EPM (n= 6). *P<0.01 vs lidocaína y #P<0.01 vs OAF-PH (test t-Student).

3.1.4. Efecto de la actividad anestésica local por vía intratecal en cobayos

Esta actividad fue testada por medio de la administración de 0.05 ml de una solución al 0.5% de OAF-01 o lidocaína (control positivo) por la vía intratecal entre los espacios L4-L5 en cobayos. La Figura 7 muestra que la duración del bloqueo sensitivo causado por la lidocaína (n= 5) y OAF-01 (n= 5) fue de 11.6 ± 0.3 y 44.3 ± 6.5 min (P<0.001 vs lidocaína), respectivamente.

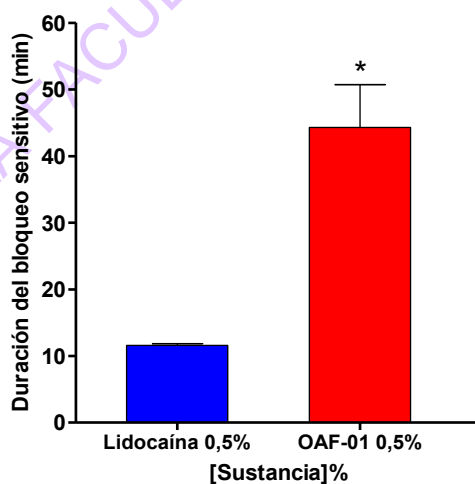


Figura 7. Duración del bloqueo sensitivo inducido por la lidocaína y el OAF-01 administrados por la vía intratecal en cobayos. La barra representa la media \pm EPM (n= 5). *P<0.001 vs lidocaína (test t-Student).

El efecto en el bloqueo motor en cobayos, vía administración raquídea de lidocaína (n= 5), fue de 8.2 ± 0.4 min y OAF-01 (n= 5) 0,5% no presentó bloqueo motor observado por mantener la postura normal de las patas posteriores del animal, como ilustra la Figura 8.

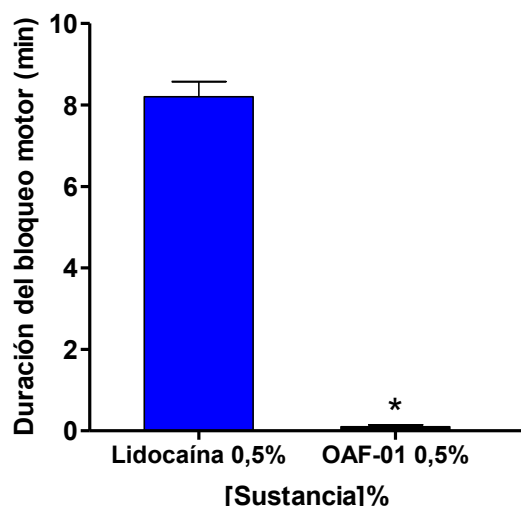


Figura 8. Duración del bloqueo motor inducido por la lidocaína (0.5%) y OAF-01 (0.5%) administradas por la vía intratecal en cobayos. La barra representa la media \pm EPM (n= 5). Note la ausencia de bloqueo motor causado por el OAF-01.

3.1.5. Efecto en el bloqueo motor: inyección en la región perineural del miembro posterior de ratones

El efecto en las fibras motoras *in vivo* fue evaluado por medio de la administración perineural de las sustancias en el trayecto del nervio ciático en la región trocanteriana de ratones. Un volumen de 0,05 ml de una solución a 3% fue administrado para todas las sustancias. La duración del bloqueo motor observado con la lidocaína (n= 5), OAF-MeOH (n= 5) y OAF-PH (n= 5) fue de 35.1 ± 1.4 ; 15.7 ± 0.6 y 24.3 ± 2.7 min, respectivamente. El Bloqueo motor no fue notado con OAF-01 (Figura 9).

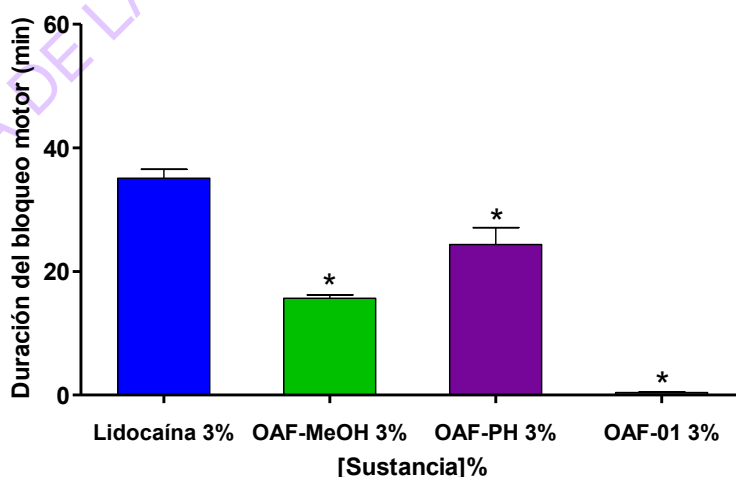


Figura 9. Duración del bloqueo motor del nervio ciático causado por la lidocaína, OAF-MeOH, OAF-PH y OAF-01 después de la inyección perineural del miembro posterior de ratones. * $P < 0.05$ vs lidocaína. La barra representa la media \pm EPM (n= 5). Note la ausencia del efecto con OAF-01 (test t-Student).

3.2. Efecto de la actividad antinociceptiva sistémica

3.2.1 Efecto de la actividad analgésica en placa caliente en ratones

Efectos antinociceptivos supra-espinales inducidos por el OAF-MeOH y OAF-01 fueron testados en modelo de placa caliente en ratones. La actividad analgésica (%) del OAF-MeOH (15 mg.kg⁻¹ i.p.) (n= 10) en los tiempos de 5, 15, 30 y 40 min después de la administración fue respectivamente de 66.8 ± 19.2; 36.0 ± 6.9; 44.7 ± 10.5 y 47.7 ± 9.4% (Figura 10), siendo en estos tiempos, significativamente mayor (P<0.05) que del DMSO (control). Para efecto comparativo la actividad analgésica del vehículo DMSO (8.6 ± 3.7; 12.5 ± 4.2; 17.9 ± 5.2 y 20.9 ± 4.9%) en los mismos tiempos. Por otro lado, la actividad analgésica del OAF-01 (10 y 30 mg.kg⁻¹ i.p.) no fue diferente al del DMSO (Figura 10).

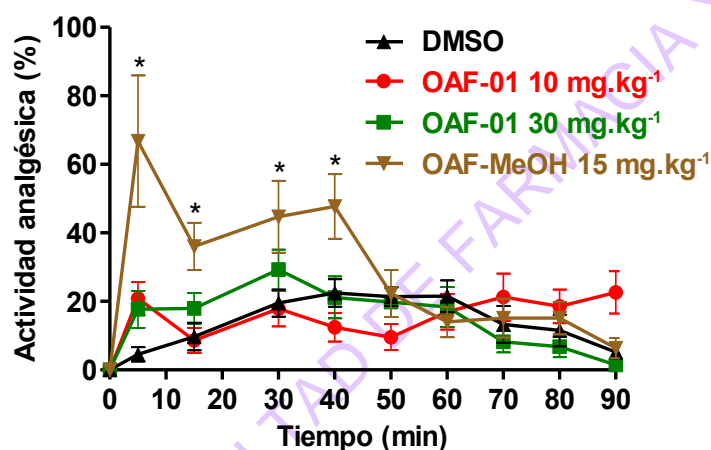


Figura 10. Actividad analgésica (%) en función del tiempo provocada por la administración del OAF-MeOH (15 mg.kg⁻¹) y OAF-01 (10 y 30 mg.kg⁻¹) por la vía i.p. en modelo de placa caliente en ratones. Los puntos representan la media ± EPM (n= 10). *P<0,05 vs DMSO (test t-Student).

DISCUSIÓN

4. DISCUSION

En 1860 Albert Niemann aisló la cocaína a partir de *erythroxyllum coca* y en 1884 Carl Kholer, demostró su eficacia clínica, dando inicio a la época de la anestesia local⁹¹. La descripción de graves efectos tóxicos agudos y crónicos causados por la cocaína estimuló la investigación para buscar nuevos anestésicos locales, de origen natural o sintético, que agregasen características como efecto prolongado, baja latencia, alta potencia, bloqueo selectivo de las fibras sensitivas y baja toxicidad local o sistémica. El objetivo de esta tesis es evaluar el efecto anestésico local de sustancias inéditas contenidas en los extractos y aceite esencial, con el objetivo de contribuir al desarrollo de nuevos ALs.

La investigación de un posible efecto anestésico local de nuevas sustancias se inicia por medio del uso de un protocolo clásico aprobado por la farmacopea^{41,46}, que consiste en la observación de la pérdida de la sensibilidad cutánea después de la administración i.d. En este ensayo es importante resaltar la duración de la anestesia después de la administración de los extractos brutos OAF-MeOH y OAF-PH y del aceite esencial OAF-01 que fue superior al de la lidocaína, fármaco patrón de amplio uso clínico^{92,93,94,95,96}. No fue posible establecer una comparación molar de potencia con la lidocaína, debido a que los extractos y el aceite esencial son constituidos de una mezcla de sustancias. A pesar de eso, debe ser destacado que la duración de la anestesia causada por el aceite esencial OAF-01 fue de aproximadamente 14 veces superior al de la lidocaína cuando ambas fueron administradas en la concentración de 3%. Este dato es inédito una vez que la bupivacaina, anestésico de mayor potencia en uso, causa bloqueo anestésico de duración de 4-6 veces mayor que el de la lidocaína. Otro hecho que llamó la atención fue la persistencia del bloqueo en concentración extremadamente baja del OAF-01 (0.0015%), en esta concentración la lidocaína fue totalmente ineficaz. Esto sugiere la posibilidad de la existencia de principios activos de alta afinidad con el sitio de acción que no identificamos. La diferencia de potencia observada entre los extractos brutos OAF-MeOH y OAF-PH con el aceite esencial OAF-01 sugiere la existencia de un conjunto de moléculas activas. Futuras identificaciones de estas sustancias permitirán separar aquellas de mayor potencia y menor toxicidad y, si es posible, desarrollar la ruta de síntesis.

Otro ensayo clásico usado para identificar la actividad anestésica local es la administración tópica de sustancias en el globo ocular de conejos. La anestesia en este modelo es caracterizada por la ausencia del reflejo de cierre del párpado en respuesta a un estímulo mecánico aplicado sobre la córnea^{97,98}. La córnea es un órgano altamente sensible, ricamente innervada y muy

permeable a los anestésicos. La anestesia en la córnea se instala en pocos segundos y la remoción del anestésico es rápida. La córnea usada también para investigar la toxicidad local de las sustancias. Sustancias citotóxicas causan, además del rojizo inmediato, la excavación de la córnea días después de la aplicación pudiendo evolucionar para ceguera. El OAF-01 bloqueó las fibras sensitivas de la córnea de forma dependiente de la dosis y la duración del efecto anestésico fue el doble del causado por la lidocaína en la misma concentración. La ausencia de rojizo o lesión de la córnea sugiere que el OAF-01 no posee acción citotóxica en la córnea.

Como descrito anteriormente, uno de los usos populares de la planta *Ottonia anisum* es el tratamiento de la odontalgia por medio de la masticación de las hojas. La administración de ALs directamente en la superficie de la gingiva por masajes es práctica bastante difundida en la odontología popular, confirmando la reducción de la incomodidad de la persona con dolor de diente y, en momentos que anteceden a la picada de la aguja en la anestesia por infiltración o bloqueo del nervio⁹⁹. La lidocaína en forma de gel es el producto recomendado para este fin. Para simular este uso el OAF-PH, OAF-01 y la lidocaína fueron directamente aplicados en la gingiva del cobayo por medio de un hisopo durante 15 s. Este tiempo fue suficiente para causar la inhibición del reflejo al estímulo doloroso inducido por el pinchamiento de la gingiva. Se puede así, constatar que las sustancias contenidas en el OAF-PH y OAF-01 son altamente difusibles en la mucosa de la gingiva y alcanzan rápidamente las fibras sensoriales, a ejemplo del observado en la córnea. Quedó nuevamente constatado que el OAF-01 contiene sustancia(s) que permiten el bloqueo de fibras sensitivas de mayor duración que del extracto OAF-PH.

La anestesia causada por los extractos y el aceite esencial de las hojas de *Ottonia anisum* cuando aplicadas por las vías, intradérmica, ocular y gingival de larga duración, indican que estas preparaciones contienen moléculas extremadamente activas en receptores periféricos sensitivos o en fibras sensitivas. En estas tres vías de administración no comprueban efecto en fibras motoras.

La administración de ALs por la vía intratecal es la técnica empleada para diversos procedimientos médicos desde hace más de 100 años¹⁰⁰. Mismo que trajo grandes beneficios, principalmente en el campo de la cirugía, algunas complicaciones neurológicas de alta gravedad han sido documentadas¹⁰¹ con el uso de ALs disponibles, por eso, nuevas sustancias tanto de origen vegetal como sintéticas deben ser investigadas. El bloqueo sensitivo de duración 4 veces superior al de la lidocaína en concentración equivalente fue mostrada con la inyección intratecal de OAF-01. Entre tanto, diferentemente a la lidocaína, el OAF-01 no bloqueó las fibras motoras. Mismo que sea aparentemente contradictorio, el bloqueo de fibras motoras es en la mayoría de las veces indeseable^{102,103}. El bloqueo selectivo de las fibras sensitivas es el principal objetivo de

la anestesia raquidiana y el bloqueo motor puede representar un efecto adverso. Una de las principales quejas de los pacientes en el período postoperatorio inmediato es la dificultad de mover los miembros inferiores causados por el bloqueo de fibras nerviosas motoras, requiriendo muchas veces, el uso de ansiolíticos. De esta forma el posible uso del OAF-01 o de su principio activo representaría un avance en la anestesia raquidiana. En función de la prolongada duración del bloqueo sensitivo, la anestesia causada por el OAF-01 podría ser comparada al de la bupivacaína o ropivacaína, que son ALs de uso terapéutico de prolongada duración del efecto^{104,105,106}. A pesar de que estas sustancias no causan bloqueo selectivo a las fibras sensitivas tan significativa cuanto al observado con el OAF-01.

Dependiendo del procedimiento quirúrgico es altamente deseable bloquear fibras sensitivas sin comprometer la funcionalidad de las fibras nerviosas motoras. En vista de la ausencia de descubrimiento de nuevas moléculas con esta propiedad, la farmacología y la toxicología de varios ALs actualmente en uso fueron revisadas^{22,25,107,108}. Varios estudios se concentraron en la selectividad de acción y toxicidad de los enantiómeros presentes en las moléculas de anestésicos locales de tipo amidas dotadas de centro quiral. Estudios realizados con isómeros de la bupivacaína indican que la S(-)-bupivacaína actúa más selectivamente en fibras sensitivas^{41,46,48,104}. Además de eso, estudios laboratoriales y clínicos muestran menor cardiotoxicidad de este enantiómero en comparación a la R(+)-bupivacaína¹⁰⁹. Trabajos clínicos mostraron semejanza en la calidad de la anestesia entre la S(-)-ropivacaína y la RS(±)-bupivacaína en determinadas técnicas anestésicas como en el bloqueo de plexo braquial y analgesia de parto^{110,111}. Estudios preclínicos realizados con ratas, ratones y conejos demostraron semejanza en la potencia y en la duración del bloqueo del nervio ciático entre los isómeros de la bupivacaína⁴¹. Además de esto, otros autores mostraron que la DL₅₀ de la R(+)-bupivacaína es aproximadamente de 30 a 40% menor que de la S(-)-bupivacaína⁴². Estos resultados fueron corroborados por los estudios de TRACHEZ *et al.* (1999), en los cuales las DC₅₀ y DL₅₀ de S(-)-bupivacaína y S(-)-ropivacaína fueron significativamente mayores a la forma R(+)-bupivacaína⁴⁵. La estructura química de los compuestos presentes en los extractos y en el OAF-01 aún no está identificada y, por lo tanto, no hay información referente a la presencia de centro quiral.

La acción selectiva de los extractos y del aceite esencial fue investigada en otros modelos experimentales. La administración perineural en ratones mostró que la lidocaína causa bloqueo indistinto sensitivo-motor, típico de ALs en uso clínico. La menor duración del bloqueo motor causado por los extractos OAF-MeOH y OAF-PH en comparación a la lidocaína y la ausencia total con el OAF-01 sugieren nuevamente que las moléculas presentes en las hojas de la especie vegetal *Ottonia anisum* tiene selectividad de acción en fibras sensitivas.

En modelo de inyección perineural las sustancias son administradas en torno del nervio ciático y las respuestas a la estimulación dolorosa y motora evaluadas. La comprobación de acción solamente en fibras motoras en modelo *in vivo*, puede ser obtenida aplicándose las sustancias directamente en el nervio ciático quirúrgicamente expuesto, seguida de estimulación eléctrica del mismo y registro de espasmos del músculo gastrocnemio^{41,45,47}. Esta técnica tiene la ventaja de que podemos cuantificar el efecto bloqueador en fibras motoras. En este modelo se constató una vez más, que la potencia bloqueadora de la lidocaína supera el extracto OAF-MeOH y que el OAF-01 no presentó cualquier bloqueo en fibras motoras en las concentraciones testadas ratificando la selectividad en fibras sensitivas.

La actividad anestésica observada en fibras sensitivas podría, en parte, ser influenciada por la actividad analgésica sistémica. Por este motivo el OAF-MeOH y el OAF-01 fueron administrados por la vía intraperitoneal y la actividad analgésica supra-espinal evaluada en modelo de placa caliente¹¹². Sorprendentemente quedó mostrada actividad analgésica en torno de 60% con el OAF-MeOH (15 mg.kg⁻¹) y la ausencia de actividad con OAF-01 (15 y 30 mg.kg⁻¹). Este efecto no fue tan expresivo como relatado en la literatura para los agonistas opioides, como la morfina, que es dependiente de la dosis, alcanzando 93,3% de actividad analgésica en la dosis de 10 mg.kg⁻¹ ¹¹³. Estos resultados indican que el efecto periférico en fibras sensitivas no está relacionado con actividad analgésica sistémica, por lo menos para el aceite esencial OAF-01. Entre tanto, evaluación futura con el OAF-MeOH debe ser considerada.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. El aceite esencial OAF-01 y los extractos brutos metanólico OAF-MeOH y hexánico OAF-PH son activos como anestésicos locales.
2. La duración del bloqueo de las fibras sensitivas causado por el OAF-01 fue superior al OAF-MeOH, OAF-PH y al de la lidocaína y los extractos brutos OAF-MeOH y OAF-PH fueron superiores al de la lidocaína. El OAF-01 no presentó bloqueo de las fibras motoras y los extractos presentaron menor duración de bloqueo de las fibras motoras comparados con la lidocaína.
3. El OAF-01, al contrario del OAF-MeOH, no provoca efecto antinociceptivo sistémico en modelo de dolor agudo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. VASCONSELOS, J.R. Estudo biomonitorado de extratos de plantas do Cerrado contra *Leshmania amazonensis* e *Tripanozoma cruzi*. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília.
2. SAGÁSTEGUI-GUARNIZ, W.A., *et al.* Actividad antiplasmodium “*in vitro*” e “*in vivo*” de extractos y fracciones a partir de hojas de *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae) que crece en Perú. Ciencia y tecnología, año 11, n.1, p. 129-139, 2015.
3. CECHINEL FILHO, V. e YUNES R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para a otimização da atividade. Quím. Nova, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.
4. MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Desenvolvimento de Fitoterápicos. São Paulo: Editorial Robe, p.115, 1999.
5. PINTO, A. C.; SIQUEIRA SILVA, D. H.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: Atualidades, Desafios e Perspectivas. Quím. Nova., v. 25, Supl. 1, p. 45-61, 2002.
6. YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; FILHO, V.C. Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. Quím. Nova, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.
7. KINGSTON, D.G.I. Natural products as pharmaceuticals and sources for lead structures. In: Wermuth, C. (ed.). The practice of Medicinal Chemistry. San Diego: Academic, p.101-114, 1996.
8. SHU, Y.Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. J. Nat. Prod., v. 61, p. 1053-1071, 1998.
9. HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. Drug Discov. Today, v. 5, n. 7, p. 294-300, 2000.
10. SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/ Editora da UFSC, cap. 15, p. 301-332, 2001.
11. DE LA CASA, Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y Aromáticas, v. 4, n. 3, p.44-45, 2005.
12. JOLY, A.B. Botânica – Introdução à taxonomia vegetal, Companhia Editorial Nacional, São Paulo, 1997.

13. DUKE, J.A. Handbook of Medicinal Herbs, CRC Press, New York, p. 677, 1985.
14. DE ARAÚJO, D.R.; PINTO, L.M.A.; BRAGA, A.F.A.; DE PAULA, E. Rev. Bras. Anesthesiol., v. 53, p. 663, 2003.
15. GUPTA, S.P. QSAR (quantitative structure-activity relationship) studies on local anesthetics. Chem. Rev., v. 91, n. 6, p. 1109-1119, 1991.
16. WHITERMAN, A.; BAJAJ, S.; and HASAN, M. Novel techniques of local anaesthetic infiltration. Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain, v. 11, n. 5, p. 167-171, 2011.
17. NAU, C. E WANG, G.K. Interactions of local anesthetics with voltage-gated Na⁺ Channels. J. Membr. Biol., v. 201, n. 1, p. 1-8, 2004.
18. ERNST, A.A.; *et al.* Lidocaine adrenaline tetracaine gel versus tetracaine adrenaline cocaine gel for topical anesthesia in linear scalp and facial lacerations in children aged 5 to 17 years. Pediatrics, v. 95, n. 2, p. 255-258, 1995.
19. KIM, C.H.; *et al.* The changes in expression of three subtypes of TTX sensitive sodium channels in sensory neurons after spinal nerve ligation. Brain Res. Mol. Brain Res., v. 95, n. 1-2, p. 153-161, 2001.
20. MARTIN, D. G.; WATSON, C. E.; GOLD, M. B.; WOODARD, C. L.; BASKIN, S. I.; Topical anesthetic-induced methemoglobinemia in macaques: A comparison of benzocaine and lidocaine. J. Appl. Toxicol., v. 15, p. 153-158, 1995.
21. DIPPENAAR, J.M. Local anaesthetic toxicity. SAJAA, v. 13, n. 3, p. 23-28, 2007.
22. RAWM, W.E.Jr.; *et al.* The effects of anesthetics upon the ear. IV. Lidocaine hydrochloride. Ann. Otol. Rhinol. Laryngol., v. 71, p. 116-123, 1962.
23. NICHOLSON, B.D. Evaluation and treatment of central pain syndromes. Neurology, v. 62, p. 30-60, 2004.
24. THOMAS, J.; *et al.*, Intravenous lidocaine relieves severe pain: results of an inpatient hospice chart review. J. Palliat. Med., v. 7, p. 660-667, 2004.
25. ADAMS, H.J.; KRONBERG, G.H.; TAKMAN, B. Local anesthetic activity and acute toxicity of (+)-2-(N-ethylpropylamino)-2',6'-butyro-xylidide, a new long acting local anesthetic. J. Pharm. Sci., v.61, p. 1829-1831, 1972.
26. LIU, P.; *et al.* Acute cardiovascular toxicity of intravenous amide local anesthetics in anesthetized ventilated dog. Anesth. Analg., v. 61, p. 317-322, 1982.
27. KARIYA, N.; COSSON, C.; MAZOIT, J.X. Comparative effect of lidocaine, bupivacaine and RAC 109 on myocardial conduction and contractility in the rabbit. Eur. J. Pharmacol., v. 691, p. 110-117, 2012.

28. LIPKIND, G.M.; FOZZARD, H.A. Molecular Modeling of Local Anesthetic Drug Binding by Voltage-Gated Sodium Channels. *Mol. Pharmacol.*, v. 68, n. 6, p. 1611-1622, 2005.
29. WOLFE, J.W.; BUTTERWORTH, J.F. Local anesthetic systemic toxicity: update on mechanisms and treatment. *Curr. Opin. Anaesthesiol.*, v. 24, n. 5, p. 561-566, 2011.
30. MAZOIT, J.X. Local anesthetics and their adjuncts. *Pediatr. Anesth.*, v. 22, n. 1, p. 31-38, 2012.
31. CULP, W.C.Jr and CULP, W.C. Practical Application of Local Anesthetics. *J. Vasc. Interv. Radiol.* v. 22, n. 2, p. 111-118, 2011.
32. TAYLOR, A. and McLEOD, G. Basic pharmacology of local anaesthetics. *British Journal of Anesthesia Education*, v. 20, n. 2, p. 34-41, 2020.
33. FIGUEREIRO PEREIRA CHEROBIN, A. C.; TASSARA TAVARES, G. Safety of local anesthetic. *An. Bras. Dermatol.*, v. 95, n. 1, p. 82-90, 2020.
34. BECKER, D. E.; KENNETH L, . R. Local anesthetics: review of pharmacological considerations. *Anesth. Prog.*, v. 59, n. 90, p. 90-102, 2012.
35. FOZZARD, H.A.; LEE, P.J. and LIPKIND, G.M. Mechanism of local anesthetic drug action on voltage-gated sodium channels. *Current Pharmaceutical Design*, v.11, n. 21, p. 2671-2686, 2005.
36. BIANCONI, M. L. Mechanism of action of local anaesthetics: a practical approach to introducing the principles of pKa to medical students. *Biochemical Education*, v. 26, p. 11-13, 1998.
37. THOHONGIM, T.; *et al.* Contemporary trends in dental local anaesthesia: a review of literature. *J. Dent. Assoc. Thai.*, v. 71, n. 2, p. 84-92, 2021.
38. EI-BOGHDADLY, K.; PAWA, A. and CHIN, K.J. Local anesthetic systemic toxicity: current perspectives. *Local and Regional Anesthesia*, v. 11, p. 35-44, 2018.
39. BUTTERWORTH, J.F.; STRICHARTZ, G.R. Molecular mechanisms of local anesthesia: A review *Anesthesiology*, v.72, p. 711-734, 1990.
40. NARAHASHI, T.; FRAZIER, D.T. Site of action and active form of local anesthetics. *Neurosci. Res.*, v. 4, p. 65-99, 1971.

41. ABERG, G. Toxicological and local anaesthetic effects of optically active isomers of two local anaesthetic compounds. *Acta Pharmacol. et. Toxicol.* v. 31, n. 4, p. 273-286, 1972.
42. MAZOIT, J.X.; CAO, L.S.; SAMI, K. Binding of bupivacaine to human serum proteins, isolated albumin and isolated alpha-1 acid glycoprotein. Differences between the enantiomers are partly due to cooperativity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 276, p. 109-115, 1993.
43. HUANG, Y.F.; *et al.* Cardiovascular and central nervous system effects of intravenous levobupivacaine and bupivacaine in sheep. *Anesth. Analg.*, v. 86, p. 797-804, 1998.
44. MORRISON, S.G.; *et al.* A comparison of the electrocardiographic cardiotoxic effects of racemic bupivacaine, levobupivacaine, and ropivacaine in anesthetized swine. *Anesth. Analg.*, v. 90, p. 1308-1314, 2000.
45. TRACHEZ, M.M. Farmacologia dos enantiômeros da bupivacaína e da S(-) Ropivacaína. Tese (Doutorado em Cirurgia Geral) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p. 1-95, 1999.
46. AKERMAN, B.; HELLBERG, I.B.; TROSSIVIK, C. Primary evolution of the local anaesthetic properties of the amino amide agent ropivacaine (LEA-103). *Acta Anesthesiol. Scand.*, v. 32, p. 571-578, 1988.
47. PETTERSEN, V.A. Estudo comparativo dos efeitos farmacológicos e toxicológicos dos isômeros da ropivacaína e suas misturas. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p.80, 2002.
48. SCHUMACHER, H.R. Aspiration and injection therapies for joints. *Arth. Rheum.* v. 49, p. 413-420, 2003.
49. HOLLMANN, M.W.; DRIEUX, M.E. Local anesthetics and the inflammatory response: a new therapeutic indication 2000? *Anesthesiology*, v. 93, p. 858-875, 2000.
50. OKADA, S.; *et al.* Lidocaine and its analogues inhibit IL-5-mediated survival and activation of human eosinophils. *J. immunol.*, v. 160, p. 4010-4017, 1998.
51. TANIGUCHI, T.; *et al.* Effects of lidocaine administration on hemodynamics and cytokine responses to endotoxemia in rabbits. *Crit. Care Med.*, v. 28, p. 755-759, 2000.
52. LAHAV, M.; *et al.* Lidocaine inhibits secretion of IL-8 and IL-1 β and stimulates secretion of IL-1 receptor antagonist by epithelial cells. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 127, p. 226-233, 2002.
53. DE KLAVER, M.J.M.; BUCKINGHAM, M.G.; RICH, G.F. Lidocaine attenuates cytokine-induced cell injury in endothelial and vascular smooth muscle cells. *Anesth. Analg.*, v. 97, p. 465-470, 2003.

54. OLSEN, P.C.; *et al.* Two for one: Cyclic AMP mediates the anti-inflammatory and anti-spasmodic properties of the non-anesthetic lidocaine analog JMF2-1. *Eur. J. of Pharmacol.*, v. 680, n. 1-3, p. 102-107, 2012.
55. OLSEN P.C.; *et al.* Lidocaine-derivative JMF2-1 prevents ovalbumin-induced airway inflammation by regulating the function and survival of T cells. *Clin. Exp. Allergy*, v. 41 p. 250-259, 2011.
56. DA COSTA, J.C.S.; *et al.* JMF2-1, a lidocaine derivative acting on airways spasm and lung allergic inflammation in rats. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 119, p. 219-225, 2007.
57. HOGAN, Q.; *et al.* Local anesthetic myotoxicity: a case and review. *Anesthesiology*, v. 80, p. 942-947, 1994.
58. NOUETTE-GAULAIN, K.; CAPDEVILA, X.; ROSSIGNOL, R. Local anesthetic 'in situ' toxicity during peripheral nerve blocks: update on mechanisms and prevention. *Curr. Opin. Anesthesiol.*, v. 25, n. 5, p. 589-595, 2012.
59. ARAI, T.; HOKA, S. Neurotoxicity of intrathecal local anesthetics. *J. Anesth.* v. 21, p. 540-541, 2007.
60. MUGURUMA, T.; SAKURA, S.; SAITO, Y. Epidural lidocaine induces dose-dependent neurologic injury in rats. *Anesth. Analg.*, v. 103, n. 4, p. 876-881, 2006.
61. BOULOUX, G.F.; PUNNIA-MOORTHY, A. Bupivacaine versus lidocaine for third molar surgery: a double-blind, randomized, crossover study. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 57, p. 510-514, 1999.
62. HUNG, C.H.; *et al.* The systemic toxicity of equipotent proxymetacaine, oxybuprocaine, and bupivacaine during continuous intravenous infusion in rats. *Anesth. Analg.*, v. 110, n. 1, p. 238-242, 2010.
63. DE JONG, R.H.; *et al.* Cerebral and circulatory effects of high-dose bupivacaine and etidocaine. *Anesthesiology*, v. 53, n. 3, p. S224, 1980.
64. PARMAR, V.; *et al.* Phytochemistry of the genus Piper. *Phytochemistry*, v. 46, n. 4, p. 597-673, 1997.
65. NAKAMURA, C.V.; *et al.* Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. *Ver. Bras.Farmacogn.*, v. 16, p. 61-66, 2006.
66. AMARAL, F.M.M. *et al.* Plants and chemical constituents with giardicidal activity. *Rev. Bras. Farmacogn. supl.* 16, p. 696-720, 2006.
67. BARBOSA-FILHO, J.M.; *et al.* Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 16, p. 258-285, 2006a.

68. BARBOSA-FILHO, J.M.; *et al.* Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE). A review between 1980-2000. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 16, p. 421-446, 2006b.
69. POTZERNHEIM, M.C.L.; BIZZO, H.R, VIEIRA, R.F. Análise dos óleos essenciais de três espécies de *Piper* coletadas na região do Distrito Federal (Cerrado) e comparação com óleos de plantas procedentes da região de Paraty, RJ (Mata Atlântica). *Rev. Bras. Farmacogn.* v. 16, p. 246-251, 2006.
70. AMORIM, M.F.D.; *et al.* The controvertible role of kava (*Piper methysticum* G. Foster) an anxiolytic herb, on toxic hepatitis. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 17, p. 448-454, 2007.
71. BARBOSA-FILHO, J.M.; *et al.* Sources of alpha-, beta-, gamma-, delta- and epsilon-carotenes: A twentieth century review. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 18, p. 135-154, 2008.
72. SOUSA, P.J.C.; *et al.* Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper aduncum* L. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 18, p. 217-221. 2008.
73. YUNCKER, T.C. The Piperaceae of Brazil. *Hoehnea*, v. 3, p. 121-3, 136-8, 1973.
74. LOPES, M. Contribuição para o estudo fitoquímico de *Ottonia martiana* Miq. - Piperaceae. Curitiba. Dissertação (Mestrado em Botânica), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, p. 102, 1989.
75. CUNICO, M.M. Estudo fitoquímico e das atividades antimicrobianas da *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p. 83, 2001.
76. CUNICO, M.M.; *et al.* Avaliação antifúngica de extratos obtidos de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae) sobre três fitopatógenos. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 71, supl., p. 141-143, 2004.
77. AGRA, M.F.; França P.F.; Barbosa-Filho, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in northeast of Brazil. *Ver. Bras. Farmacogn.* v. 17, p. 114-140, 2007.
78. AGRA, M.F., *et al.* Survey of medicinal plants used in the region northeast of Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 18, p. 472-508, 2008.
79. MESQUITA, A.M.; *et al.* Larvicidal activity of *Ottonia anisum* metabolites against *Aedes aegypti*: A potential natural alternative source for mosquito vector control in Brazil. *J. Vector Borne Dis.* v. 54, p. 61-68, 2017.
80. ANTUNES, P.A.; *et al.* Spectroscopic characterization of *N*-isobutyl-6-(*p*-methoxyphenyl) 2*E*-4*E*-hexadieneamide extracted from *Ottonia propinqua*. *Vibrational Spectroscopy.* v. 27, p. 175-181, 2001.
81. SINGH, S.K.; *et al.* Neolignans and alkaloids from *Piper argyrophyllum*. *Phytochemistry*, v. 43, n. 6, p. 1355-1360, 1996.

82. FIGUEIREDO, R.A. and SAZIMA, M. Pollination biology of Piperaceae species in southeastern Brazil. *Annals of Botany*, v. 85, p. 455-460, 2000.
83. CUNICO, M.M.; *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana de *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, v. 24, n. 2, p. 141-145, 2003a.
84. CUNICO, M.M.; *et al.* Extração de esteróides em frutos de *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae, com gás liquefeito. *Quím. Nova*, v. 16, n. 6, p. 803-806, 2003b.
85. CUNICO, M.M. *Ottonia martiana* miq., Piperaceae: Um estudo fitoquímico com enfoque multidisciplinar. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2007.
86. VALDIR, A.F.; SELENE, M.M.; RAIMUNDO, B.F. Constituintes químicos de *Ottonia corcovadenis* Miq. da floresta Amazônica: atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono. *Quim. Nova*, v. 27, n. 1, p. 79-83, 2004.
87. GOTTLIEB, O.R.; MAGALHÃES, M.T. Modified distillation trap. *Chem. Analyst*, v. 49, p. 114-115, 1960.
88. BÜLBRING, E.; WADJA, I. Biological comparison of anaesthetics. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, v. 85, p. 78-84, 1945.
89. HENN F. Determination of the toxicological and pharmacological properties of carbocaine, lidocaine and procaine by means of simultaneous experiments. *Acta Anaesth. Scand.*, v. 4, p. 125-154, 1960.
90. SMITH, D.J.; *et al.* The mu opiate receptor is responsible for descending pain inhibition originating in the periaqueductal gray region of the rat brain. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 156, p. 47-54, 1988.
91. BISCOPING, J.; BACHMANN-MENNENGA, M.B. Local anesthetics from ester to isomer. *Anesthesiol. Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, v. 35, p. 285-292, 2000.
92. KUNDU, S.M.D.; ACHAR, S. Principles of Office Anesthesia: Part II. Topical Anesthesia. *Am. Fam. Physician.*, v. 66, n. 1, p. 99-102, 2002.
93. GREGORIO, G.D.; *et al.* Clinical presentation of local anesthetic systemic toxicity a review of published cases, 1979 to 2009. *Reg. Anesth. Pain Med.*, v. 35, n. 2, p. 181-187, 2010.
94. CULP, W.C.Jr; CULP, W.C. Practical Application of Local Anesthetics. *J. Vasc. Interv. Radiol.* v. 22, n. 2, p. 111-118, 2011.
95. SOBANKO, J.F.; MILLER, C.J.; ALSTER, T.S. Topical Anesthetics for Dermatologic Procedures: A Review. *Dermatol. Surg.*, v. 38, n. 5, p. 709-21, 2012.

96. WALSH, A.M.; MORAN, B.; WALSH, S.A. Knowledge of Local Anesthetic Use Among Dermatologists. *Dermatol. Surg.* v. 38, n. 6, p. 882-887, 2012.
97. HARVEY, S.U.Y.; *et al.* Ropivacaine-lidocaine versus bupivacaine-lidocaine for retrobulbar anesthesia in cataract surgery. *J. Cataract. Refract. Surg.*, v. 28, p. 1023-1026, 2002.
98. ADAMS, L. Adjuvants to local anaesthesia in ophthalmic surgery. *Br. J. Ophthalmol.*, v. 95, p. 1345-1349, 2011.
99. MIGROM, P. Four dimensions of fear of dental injection. *J. Am. Dent. Assoc.* v. 128, p. 756-62, 1997.
100. MOORE, D.C.; THOMPSON, G.E. Commentary: neurotoxicity of local anesthetics - An issue or a scapegoat? *Reg. Anesth. Pain Med.*, v. 23, p. 605-610, 1998.
101. HORLOCKER, T.T. Complications of regional anesthesia and acute pain management. *Anesthesiology Clin.* v. 29, p. 257-278, 2011.
102. TOFFOLETTO, P.G.; *et al.* Spinal anesthesia in out patient knee surgery: 22-gauge versus 25-gauge Sprotte needle. *Anesth. Analg.*, v. 81, p. 73-79, 1995.
103. KUUSNIEMI, K.S.; PIHLAJAMÄKI, K.K.; PITKÄNEN, M.T. A low dose of plain or hyperbaric bupivacaine for unilateral spinal anesthesia. *Reg. Anesth. Pain Med.*, v. 25, p. 605-610, 2000.
104. COX, C.R.; FACCENDA, K.A.; GILHOOLY, C. Extradural S(-)-bupivacaine: comparison with racemic RS-bupivacaine. *Br. J. Anaesth.* v. 80, p. 289-293, 1998.
105. DELFINO, J.; VALE, N.B.; MAGALHÃES, E.F. Comparação entre bupivacaína racêmica e levogira a 0,5%. Estudo em anestesia peridural para cirurgia de varizes. *Rev. Bras. Anesthesiol.*, v. 49, p. 4-8, 1999.
106. GANEM, E.M.; VIANNA, P.T.G.; TAKATA, I.T. Peridural com ropivacaína a 1%: experiência com volume proporcional à estatura. *Rev. Bras. Anesthesiol.*, v. 48, p. 283-288, 1998.
107. REIZ, S.; *et al.* Cardiotoxicity of ropivacaine - a new amide local anaesthetic agent. *Acta Anesthesiol. Scand.*, v.33, p. 93-98, 1989.
108. TANZ, R.D.; *et al.* Comparative cardiotoxicity of bupivacaine and lidocaine in the isolated perfused mammalian heart. *Anesth. Analg.*, v. 63, p. 549-556, 1984.
109. GRAF, B.M.; *et al.* Differences in Cardiotoxicity of Bupivacaine and Ropivacaine are the result of physicochemical and stereoselective properties. *Anesthesiology*, v. 96, p. 1427-1434, 2002.

110. McCRAE, A.F.; *et al.* Pharmacokinetic and clinical study of ropivacaine and bupivacaine in women receiving extradural analgesia in labour. *Br. J. Anaesth.*, v. 79, n. 5, p. 558-562, 1997.
111. STIENSTRA, R.; *et al.* Ropivacaine 0.25% versus bupivacaine 0.25% for continuous epidural analgesia in labor: A double-blind comparison. *Anesth. Analg.*, v. 80, p. 285-289, 1995.
112. SMITH, D.J.; *et al.* The mu opiate receptor is responsible for descending pain inhibition originating in the periaqueductal gray region of the rat brain. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 156, p. 47-54, 1988.
113. SUDO, R.T.; *et al.* Interaction of morphine with a new α_2 -Adrenoceptor agonist in mice. *J. PAIN*, v. 11, n. 1, p. 71-78, 2010.

BIBLIOTECA DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

UNT

RECTORADO

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

DECLARACIÓN JURADA

Los AUTORES suscritos en el presente documento DECLARAMOS BAJO JURAMENTO que somos los responsables legales de la calidad y originalidad del contenido del Proyecto de Investigación Científica, así como, del Informe de la Investigación Científica realizado.

TITULO: Evaluación de la Actividad anestésica local de extractos brutos y del aceite esencial de *Ottonia anisum*.

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

PROY DE TRABAJO DE INVESTIGACION (PREGRADO)

PROYECTO DE TESIS PREGRADO

PROYECTO DE TESIS MAESTRIA

PROYECTO DE TESIS DOCTORADO

()

(X)

()

()

INFORME FINAL DE INVESTIGACION CIENTÍFICA

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN (PREGRADO)

TESIS PREGRADO

TESIS MAESTRÍA

TESIS DOCTORADO

()

()

()

()

Equipo Investigador Integrado por:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES	FACULTAD	DEP. ACADÉMICO	CATEGORIA DOCENTE ASESOR	CÓDIGO Docente asesor Numero Matricula del estudiante	Autor Coautor asesor
1	Espinola López Kelvin	Farmacia	Farmacia		0012892-89	Autor
2	Sagastegui Guarniz N.	Farmacia	Farmacia	Principal	3217	Asesor

FIRMA

FIRMA

Trujillo, 5 de Mayo de 2022

18193274

DNI

17816655

DNI

FIRMA

DNI

FIRMA

DNI

¹ Este formato debe ser llenado, firmado, adjuntado al final del documento del PIC, del Informe de Tesis, Trabajo de Investigación respectivamente





RECTORADO

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN EN REPOSITORIO DIGITAL RENATI-SUNEDU

Trujillo, 5 de Mayo de 2022

Los autores suscritos del INFORME FINAL DE INVESTIGACIÓN CIENTIFICA

Titulado: Evaluación de la actividad anestésica local de extractos brutos y del aceite esencial de *Oftonia canisum*

AUTORIZAMOS SU PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL, REPOSITORIO RENATI-SUNEDU, ALICIA-CONCYTEC, CON EL SIGUIENTE TIPO DE ACCESO:

- A. Acceso Abierto:
- B. Acceso Restringido (datos del autor y resumen del trabajo)
- C. No autorizo su Publicación

Si eligió la opción restringido o NO autoriza su publicación sírvase justificar _____

ESTUDIANTES DE PREGRADO: TRABAJO DE INVESTIGACIÓN TESIS
 ESTUDIANTES DE POSTGRADO: TESIS MAESTRIA TESIS DOCTORADO
 DOCENTES: INFORME DE INVESTIGACIÓN OTROS
 El equipo investigador Integrado por:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES	FACULTAD	CONDICIÓN (NOMBRADO, CONTRATADO, EMÉRITO, estudiante, OTROS)	CÓDIGO Docente Numero Matrícula del estudiante	Autor Coautor asesor
1	Espinola Lopez Kelvin	Farmacología	Estudiante	001282-89	Autor
2	Sagástegui Guarnie W.	Farmacología	Profesor	3217	Asesor

FIRMA

18193274
DNI

FIRMA

17816655
DNI

FIRMA

DNI

FIRMA

DNI



¹ Este formato debe ser llenado, firmado y adjuntado en el Informe de Tesis y/o Trabajo de Investigación respectivamente
² Este formato en el caso de Informe de investigación científica docente debe ser llenado, firmado, scaneado y adjuntado en el sistema de www.picfedu.unitru.edu.pe