

ESTUDIO FITOFARMACOLOGICO DE LA FRACCION LIPOSOLUBLE DE LAS FLORES DE *Spilanthes americana* (Mutis)

PARTE II: ESTUDIO FARMACOLOGICO

Luz Stella Ospina de Nigrinis, Química Farmacéutica, M.Sc., Profesora Asociada, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional.

Jorge Olarte, Químico Farmacéutico, Doctor en Farmacia, Profesor Asociado, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional.

Enrique Núñez Olarte, Químico Farmacéutico, Doctor en Medicina, Profesor, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional.

RESUMEN

El estudio farmacológico de la N-isobutil-deca-5-ino-8-eno-trans amida aislada de las flores de *Spilanthes americana* (Mutis) Hieron, se inició con la evaluación de la acción anestésica local por los métodos de anestesia de superficie, de infiltración y de conducción. También se evaluó la acción cicatrizante, microscópica y macroscópicamente y se determinó la toxicidad aguda y local de la isobutilamida.

SUMMARY

The pharmacological study of the N-isobutil-deca-5-ino-8-eno-trans amida, isolated from the flowers of *Spilanthes americana* (Mutis) Hieron, was initiated with this work. The local anesthetic activity was evaluated by means of the following technics: surface, infiltration and conduction anaesthesia. The "healing" activity was also evaluated by microscopic and macroscopic examination. In addition the acute toxicity were determined.

INTRODUCCION

En la primera parte del estudio fitofarmacológico de las flores *Spilanthes americana*, (Mutis), utilizadas en medicina popular para el tratamiento de las aftas bucales y de algunas variedades de herpes, se informó sobre el aislamiento e identificación de dos sustancias: una biológicamente activa, para la cual se propuso la estructura correspondiente a la N-isobutil-5-ino-8-eno-trans-isobutilamida, y un triterpeno pentacíclico, el acetato de taraxasterol (1).

La segunda parte de la investigación corresponde al estudio de la actividad anestésica local, de la actividad cicatrizante y de la toxicidad aguda y local de la isobutilamida aislada. Los resultados obtenidos concuerdan con las observaciones hechas en los estudios clínicos realizados por Calle M. y Prada A. con el extracto completo de las flores de la *Spilanthes americana* (Mutis) Hieron (2).

PARTE EXPERIMENTAL

El estudio farmacológico de la isobutilamida aislada, se orientó a la evaluación de la actividad anestésica local, de la actividad cicatrizante y de la toxicidad aguda y local.

Acción Anestésica Local

Las sustancias usadas para el estudio de la acción anestésica local fueron los clorhidratos de cocaína, lidocaína y de procaína, la isobutilamida aislada y el ácido clorhídrico al 37%. Dada la naturaleza liposoluble de la isobutilamida aislada fue necesario buscar un solvente apropiado. Consultado el estudio de Worthley y Schott (3) sobre la evaluación farmacocinética de nueve sistemas solventes administrados intraperitonealmente a ratones, se escogió como solvente para el compuesto una mezcla de Tween 80 - tween 21 - agua (1:1:98). Como animales de experimentación se usaron ranas, ratones blancos de ambos sexos, cobayos blancos (machos) y conejos Nueva Zelanda de ambos sexos.

Se emplearon los métodos clásicos: anestesia de superficie (4), anestesia de infiltración (5) y anestesia de conducción (6). También se han propuesto métodos en piel intacta, para lo cual se usan soluciones del anestésico local (base) en solventes orgánicos los cuales tienen la propiedad de penetrar en la piel sin causar daños irreversibles, aumentando así la absorción percutánea (7), (8). La acción anestésica local de la isobutilamida se estudió empleando los siguientes métodos:

Anestesia de superficie en córnea de conejo.

La prueba se realizó en conejos blancos de ambos sexos, de 4 meses de edad y de un peso entre 3 y 3.5 kilos. Del compuesto se prepararon seis soluciones de concentración entre 0,2; y 2 g%. Como solvente se empleó una mezcla de tween 80 - tween 21 - agua

(1:1:98). Para cada concentración se utilizó un grupo de 6 animales a los cuales se les observó inicialmente la respuesta a un estímulo doloroso (mecánico) en la córnea. Luego se aplicaron en el sacro conjuntival del ojo derecho 2 gotas de la respectiva concentración y se mantuvo cerrado el ojo durante un minuto. En el ojo izquierdo se colocaron de igual manera 2 gotas de solvente como control.

Inmediatamente se observó la respuesta a 30 estímulos mecánicos en la córnea del ojo tratado (100% de respuesta) como también la respuesta del ojo patrón. La observación se repitió cada dos minutos, hasta cuando el animal recobró totalmente el reflejo palpebral. Con cada grupo de animales se repitió el ensayo en forma cruzada. Para calcular la potencia relativa de la isobutilamida respecto a los clorhidratos de cocaína, lidocaína y procaína, se usaron soluciones al 2% de estos compuestos. Como solvente se empleó solución isotónica de cloruro de sodio. La observación se hizo en la forma indicada para la isobutilamida, utilizando en el ojo control solución isotónica de cloruro de sodio. El tiempo de duración de la anestesia para el clorhidrato de lidocaína se consideró como el 100% y a este valor se refirieron los tiempos de las demás sustancias.

Anestesia de infiltración en la piel de cobayo

La evaluación de la acción anestésica por infiltración se hizo en cobayos blancos (machos) de 3 meses de edad y de un peso entre 500 y 600 g., suministrados por el bioterio del Departamento de Farmacia. Los animales fueron ambientados durante ocho días y se les mantuvo con dieta controlada. Veinticuatro horas antes de la prueba, se rasuró a ambos lados de la región medio dorsal de cada animal. De la isobutilamida se usaron 6 concentraciones entre 0,3 y 4 g%. Se utilizó el mismo solvente indicado en el método anterior. Para efectuar la prueba se dividieron los animales en 6 grupos de 6 y de cada uno de los animales se usó el lado derecho para el ensayo y el lado izquierdo como control. Cada una de las concentraciones fue ensayada con un grupo de 6 animales. Se seleccionó el área de mayor sensibilidad, por aplicación de un estímulo doloroso (eléctrico) el cual fue cambiado hasta que el animal respondió a éste.

Una vez ubicada la región de mayor sensibilidad se inyectó intradérmicamente en el lado derecho 0.2 ml de cada una de las soluciones a valorar y en el lado izquierdo 0.2 ml del solvente. Inmediatamente se aplicó el estímulo eléctrico en las regiones tratadas (ensayo y control), se determinó el período de latencia y luego se hicieron observaciones cada tres minutos hasta que el animal recobró completamente la sensibilidad; el ensayo se repitió en forma cruzada.

Para calcular la potencia relativa de la isobutilamida respecto a los clorhidratos de cocaína, lidocaína y procaína se usaron soluciones al 2% de estos compuestos, en solución isotónica de cloruro de so-

dio. Para cada sustancia se empleó un grupo de 6 animales. La observación se hizo en la forma indicada para la isobutilamida, inyectando en la región control 0.2 ml de la solución isotónica de NaCl. El tiempo de duración de la respuesta del Clorhidrato de lidocaína se consideró como el 100% y a este valor se refirieron los tiempos de respuesta de las demás sustancias.

Anestesia de conducción en el nervio ciático de la rana

Para este ensayo se emplearon ranas de tamaño uniforme suministrado por el bioterio del Departamento de Farmacia, las cuales fueron descerebradas. Posteriormente se aisló el nervio ciático del miembro posterior derecho, el miembro posterior izquierdo se usó como control. Se utilizaron cuatro concentraciones de la isobutilamida entre 0,3 y 1.8 g/100 en el solvente indicado. Como estímulo doloroso se usó una solución de HCl al 0.5%.

Inicialmente se observó la respuesta de las extremidades al estímulo químico, para lo cual se introdujeron simultáneamente en un recipiente con HCl al 0.5%. Inmediatamente se enjuagaron en forma cuidadosa con solución isotónica de cloruro de sodio; a continuación se aplicó sobre el nervio ciático aislado, durante 2 minutos, la solución respectiva a valorar. Seguidamente se aplicó el estímulo doloroso a las 2 extremidades, se observó la respuesta y a continuación se lavó con solución isotónica de cloruro de sodio. El proceso se repitió cada 3 minutos hasta que el animal recobró la sensibilidad. Para cada concentración se usaron grupos de 6 animales. Se repitió la prueba descrita para la isobutilamida con el solvente, con un número igual de animales.

Para calcular la potencia relativa de la isobutilamida respecto a los clorhidratos de cocaína, lidocaína y procaína se usaron soluciones al 1.8% de cada uno de estos compuestos en solución isotónica de cloruro de sodio. En la evaluación de cada compuesto se empleó un grupo de 6 animales. El tiempo de duración de la respuesta del clorhidrato de lidocaína a la concentración dada se consideró como el 100%, y a este valor se refirieron los tiempos de las otras sustancias.

Estudio de la acción cicatrizante

Para comprobar la posible acción cicatrizante del extracto de las flores de *Spilanthes americana*, en el tratamiento de aftas y del *Herpes simplex*, sobre todo en la primera etapa de desarrollo de las lesiones causadas en la mucosa y en la piel respectivamente, se utilizaron las siguientes sustancias: extracto de flores de *Spilanthes americana* obtenido por el método indicado en (1), la isobutilamida aislada del extracto de las flores de *Spilanthes americana* (1), como solvente para el extracto y para la amida se empleó tween 80 - tween 21 - agua 1:1:98. Para el estudio se utilizaron conejos Nueva Zelanda, de ambos sexos de 5 meses de edad y de un peso entre 3 y 3.5 kilos.

La metodología empleada permitió hacer el estudio microscópico y macroscópico utilizando los mismos animales. Se seleccionó el tejido de la piel del conejo en lugar de la mucosa de superficie húmeda (cavidad oral) ya que en ambas se encuentran básicamente las mismas estructuras, una superficie epitelial (estratificado plano) y un sostén conectivo subepitelial. Además las superficies externas permiten un control adecuado de variables, las cuales pueden incidir en los resultados.

Estudio microscópico

Con el objeto de observar el posible efecto de la isobutilamida y del extracto completo en un proceso de cicatrización, se utilizó una solución al 0.5% de la isobutilamida y al 5% del extracto completo. Como solvente se empleó la mezcla ya indicada. Se utilizaron 5 grupos de 10 animales, a los cuales se les rasuró la parte dorsal media derecha y se les anestesió con Ethrane (anestesia de inhalación). En la región rasurada se practicó una incisión de 15 mm de longitud por 2 mm de profundidad aproximadamente. A seis de los animales se les aplicaron 2 gotas de la solución tratamiento (isobutilamida, o extracto total) en la herida y a los cuatro restantes se les aplicó el solvente para emplearlos como control; el tratamiento se aplicó cada 12 horas. Después de 12 horas (grupo 1), 24 horas (grupo 2), 48 horas (grupo 3), 72 horas (grupo 4) y 96 horas (grupo 5) se hizo una biopsia de la piel de aproximadamente 20 x 10 mm quedando en la parte central la incisión inicial. El tejido así obtenido se fijó en formol al 10% y posteriormente se procesó por el método de inclusión en parafina, se hicieron cortes de 4 micras de espesor, posteriormente se colorearon con hematoxilina-eosina y se observaron en un microscopio de luz (11).

Estudio macroscópico

A los animales a los cuales se les practicó la biopsia para el estudio histológico se les sometió a observación y al siguiente tratamiento: cada 12 horas se colocó sobre la herida respectivamente 3 gotas de la solución de la isobutilamida, de la solución del extracto o del solvente. Los animales fueron observados hasta cuando finalizó el proceso de cicatrización tanto en los grupos tratados como en los grupos de control.

Estudio de Toxicidad

Toxicidad aguda. Determinación de la DL₅₀

Para la evaluación de la toxicidad aguda se usaron dos vías de administración: intraperitoneal y subcutánea. La prueba se realizó empleando ratones blancos de ambos sexos, con un peso de 30 y 32 g. Se utilizaron 10 grupos de 11 ratones cada uno, a cada grupo se le inyectó intraperitonealmente un volumen de 0.2 ml de una solución con un intervalo de dosis entre 120 y 140 mg/kilo de peso.

Para la vía subcutánea se emplearon también 10 grupos de 11 ratones a los cuales se les inyectó respectivamente una dosis de 0.2 ml: entre 336 y 392 mg/kilo de peso. En la observación intraperitoneal como en la subcutánea se usó un grupo control de 11 animales, a los cuales se les inyectó 0.2 ml del solvente.

Se siguió el procedimiento llamado de acumulación de datos observados durante un período de 24 horas, acumulando todos los animales vivos y todos los animales muertos (9). También se observó el comportamiento general de los animales y la aparición de síntomas como convulsiones, excitación, depresión, etc.; la experiencia se finalizó después de 5 días. Con los datos observados se obtuvo el valor de la DL₅₀, para las 2 vías de administración, tanto por el sistema gráfico como matemático.

Toxicidad local

Irritación en la piel

La observación de un posible efecto tóxico a nivel de la piel se hizo en cobayos blancos y en conejos blancos de ambos sexos. Se utilizaron 2 dosis de concentración mayor que las empleadas para la prueba de anestesia intradérmica. Se trabajó con dosis de 25 y 40 mg por kilo de peso. Cada dosis fue inyectada intradérmicamente en la parte dorsal media del animal previamente rasurado.

Para cada dosis se utilizó un grupo de 12 animales, los cuales fueron observados durante un período de 15 días. Se tuvo en cuenta la aparición de eritema y el grado de inflamación (10). Se comparó con un grupo control al cual se le inyectó 0.2 ml del solvente.

Tolerancia ocular en el conejo

La prueba se realizó para evaluar posibles lesiones en el iris, córnea y mucosa conjuntival. Los parámetros empleados para la evaluación fueron: tamaño de pupila, reacción del ojo a la luz, enrojecimiento, congestión y hemorragia. Se trabajó con dos concentraciones de la isobutilamida, para cada concentración se utilizó un grupo de 10 animales a los cuales se les aplicaron en el saco conjuntival del ojo derecho, 2 gotas de la respectiva solución. El ojo contrario se usó como control, al cual se le aplicaron 2 gotas del solvente. Las evaluaciones se hicieron a las 24 y 48 horas después de aplicado el tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSION

Evaluación de la acción anestésica local

La acción anestésica local de la isobutilamida pudo ser comprobada por medio de la metodología empleada. Se observaron respuestas positivas cuando se utilizaron métodos de evaluación en córnea de conejo, en piel de cobayo y en nervio ciático de rana.

En la evaluación de la acción anestésica en córnea se obtuvo una duración máxima de respuesta de 19 minutos \pm 3,9 para una concentración del 2% del compuesto. Los clorhidratos de cocaína, lidocaína y procaína a una concentración del 2% presentaron respectivamente una duración de respuesta, al 100% de estímulo mecánico, de $40 \pm 3,1$; $24 \pm 2,7$ y $23 \pm 2,7$ minutos.

Al comparar los resultados obtenidos con el clorhidrato de lidocaína, con los que presentaron la isobutilamida y los clorhidratos de cocaína y procaína, se observó que la capacidad de la isobutilamida para disminuir el dolor al estímulo mecánico es del 75%, la de la cocaína del 166% y la de la procaína del 96% es decir, que en las condiciones del experimento, el clorhidrato de cocaína actúa más intensamente que el clorhidrato de lidocaína y ambos de una manera superior a la isobutilamida y al clorhidrato de procaína. Llamó la atención el efecto post-anestésico observado en todos los animales usados en la experimentación. Después del período de anestesia se pudo apreciar la caída del párpado del ojo tratado durante 10 a 15 minutos aproximadamente; esto podría compararse con una respuesta de tipo curarizante.

El vehículo utilizado para la incorporación de la isobutilamida no presentó ningún efecto cuantificable con el método empleado para la evaluación de la acción anestésica. El tiempo de latencia observado para la isobutilamida fue de un minuto, lo cual indica que el vehículo empleado permitió el reparto del principio activo en la superficie húmeda de la mucosa, lográndose así una concentración efectiva al minuto de haber aplicado la dosis.

En la evaluación de la acción anestésica de la isobutilamida por el método de infiltración en piel de cobayo no se observaron grandes variaciones en el tiempo de respuesta para los dos primeros valores de concentración. A partir de la tercera concentración se observa un cambio apreciable en el tiempo de respuesta, apreciándose lo mismo con la 4a. y 5a. concentración. Con la 6a. concentración se presenta variación en el tiempo de respuesta, pero no en la proporción que venía observándose a partir de la 3a. concentración, es decir, que la parte superior de la curva tiende a hacerse asintótica a la abcisa, obteniéndose en esta forma una curva signoídea, lo cual indica la saturación de la capacidad de respuesta. El tiempo máximo de respuesta fue de $63 \pm 2,77$ minutos para la concentración de 4 g%.

Al comparar los tiempos de respuesta de soluciones de igual concentración de la isobutilamida y de los clorhidratos de cocaína y procaína, con el tiempo de respuesta de una solución al 2% de clorhidrato de lidocaína, los resultados fueron: isobutilamida (base) 22 ± 3 ; clorhidrato de cocaína $40 \pm 3,2$; Clorhidrato de procaína $15 \pm 1,75$ y clorhidrato de lidocaína $23 \pm 2,7$ minutos; se puede apreciar que la isobutilamida presenta una capacidad para disminuir el dolor a un estímulo eléctrico, muy similar al clorhidrato de lidocaína (97%), mientras que el

clorhidrato de cocaína llega al 173% y el clorhidrato de procaína solamente al 65.2%. Estos valores están indicando que la velocidad de absorción en una misma región es diferente para cada sustancia en particular, posiblemente porque éstas pueden alterar las condiciones circulatorias locales en grado diferente; la misma consideración puede ser válida para una misma sustancia, pero administrada en forma hidrosoluble (sal) o liposoluble (base).

La isobutilamida presentó un período de latencia de 3 minutos (fase I), es decir, que solamente después de este tiempo se logró la concentración necesaria a nivel de las terminaciones nerviosas, para bloquear la respuesta al estímulo aplicado (estímulo eléctrico). Después de esta primera fase se mantuvo el tiempo de anestesia en forma sostenida, por un lapso, el cual dependió de la dosis utilizada (Fase II). Posteriormente se fue recuperando la sensibilidad al estímulo aplicado, en forma lenta y progresiva hasta llegar a la recuperación total de la sensibilidad al estímulo eléctrico, (Fase III).

La respuesta anterior fue comparada con el comportamiento presentado con el clorhidrato de lidocaína. Se pudo observar una fase I similar a la isobutilamida, una fase II, dependiente de la concentración y una fase III de aparición inmediata, contrastando con la respuesta de la isobutilamida, la cual fue lenta en esta etapa. La razón de dicha variación posiblemente obedece a las diferencias fisicoquímicas entre la naturaleza liposoluble de la isobutilamida y la hidrosoluble del clorhidrato de lidocaína. La concentración de la forma hidrosoluble (lidocaína) en el sitio de acción después del período de anestesia, desaparece en forma "vertical", en comparación con la forma liposoluble (isobutilamida) debido a que el clorhidrato de lidocaína por su naturaleza hidrofílica, en razón de su solubilidad, difunde con menor dificultad a la circulación general. El solvente empleado para la isobutilamida no mostró ningún efecto frente a los receptores del dolor en las condiciones de la experiencia.

La isobutilamida presentó la propiedad de bloquear en forma reversible la conducción nerviosa, cuando se utilizó este método de estudio en el nervio ciático de la rana. La duración del efecto anestésico alcanzó su valor máximo a los 29 minutos con una concentración de 1.8 g/100. A concentraciones mayores se observó parálisis flácida generalizada, pues los músculos de las estructuras contralaterales tampoco respondieron al estímulo. La duración del efecto presentado por una solución de clorhidrato de lidocaína de concentración 1,8 g/100 fue comparada con el tiempo de duración del efecto presentado por la isobutilamida, y los clorhidratos de cocaína y procaína a la misma concentración.

Los valores dados en minutos fueron respectivamente: clorhidrato de lidocaína $39 \pm 3,8$; isobutilamida (base) $30 \pm 2,7$; clorhidrato de procaína $13 \pm 2,8$. Considerando el tiempo de duración del efecto del clorhidrato de lidocaína como el 100%, los valores relativos para las demás sustancias fueron: iso-

butilamida 76%, clorhidrato de cocaína 74% y clorhidrato de procaína 33%. El solvente empleado para la isobutilamida no bloqueó la conducción nerviosa, observándose una respuesta inmediata al estímulo doloroso (estímulo químico). Es de anotar que para comparar el efecto anestésico local, por los tres métodos utilizados, del clorhidrato de lidocaína con las demás sustancias, se usaron soluciones porcentuales y no valores equimoleculares de las mismas.

Evaluación de la acción cicatrizante

Pruebas de cicatrización en la piel de conejo

Observación microscópica

La metodología empleada en el estudio histológico para observar la evolución del proceso de cicatrización en los animales control, se diseñó con el objeto de hacer evaluaciones a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas de tratamiento. Se hicieron observaciones hasta las 96 horas, debido a que la reparación por primera intención se lleva a cabo completamente en condiciones naturales en este período de tiempo.

En el grupo tratado "12 horas", llamó la atención el estado sólido de la escara en formación, en la dermis se apreció una marcada infiltración de polimorfos nucleares neutrófilos (P.M.N.) y algunos capilares mostraron marginación leucocitaria; en los cortes correspondientes al grupo control, se observó una capa aparentemente poco deshidratada y la reacción de P.M.N. fue menos marcada que en los grupos tratados. En el grupo tratado "24 horas" se apreció mayor consistencia de la escara y una capa bien dispuesta de P.M.N. limitando la superficie desnuda del epitelio. En las capas de la dermis se observó la aparición temprana de un número apreciable de mononucleares, principalmente monocitos y macrófagos. Fue evidente la presencia de fibroblastos. La superficie abierta del grupo control presentó una capa sólida de fibrina deshidratada y abundantes células necróticas. En la dermis se observó congestión, hemorragia y persistió la marginación, migración e infiltración leucocitaria de polimorfos nucleares neutrófilos.

En la dermis del grupo tratado "48 horas" se apreció la afluencia de mononucleares (macrófagos) y proliferación de fibroblastos; Igualmente empezó a observarse la regeneración epitelial; en el grupo control se observó una mejor organización de la escara, fue notoria la hemorragia y la congestión en la dermis y la infiltración de polimorfos nucleares. En el grupo tratado "72 horas" el hecho de mayor importancia fue la continua regeneración del epitelio, el cual progresó reparando la herida. Prácticamente no se observaron células de infiltración en la dermis; en el grupo control apareció la escara completamente formada, pero aún fue muy marcada la reacción de polimorfos nucleares neutrófilos en las capas superficiales. La regeneración de la epidermis fue evidente aún en las partes adyacentes a la escara.

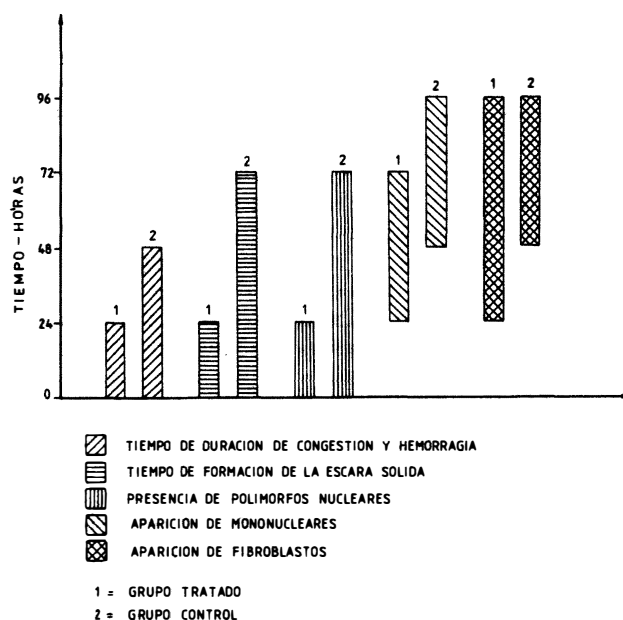
En el grupo tratado "96 horas" se apreció la reparación epitelial casi total, en la dermis no se observaron células de reacción inflamatoria y la formación de bandas de colágeno fue muy satisfactoria; el grupo control mostró mayor celularidad en la dermis que el grupo tratado a igual tiempo de observación.

Las reacciones descritas para los diferentes tiempos de observación tanto para los grupos tratados como para los grupos controles se ven esquematizados en la figura 1.

Los efectos observados en cuanto a la migración y presencia temprana y abundante de P.M.N. en el grupo de animales que recibió la isobutilamida con respecto al grupo control, hacen pensar que el compuesto utilizado puede tener un efecto sinérgico con las leucotaxinas que normalmente se producen en un tejido lesionado.

Los fenómenos congestivos hemorrágicos se observaron con igual intensidad en ambos grupos en las primeras horas post-quirúrgicas, pero desaparecen de una forma más temprana en el grupo de animales que recibió tratamiento, en los cuales hacia las 24 y 48 horas prácticamente no existen, mientras que en el grupo control persisten aún hasta las 48 horas. Se observó una diferencia notoria, micro y macroscópicamente en la consistencia y morfología de la capa de fibrina que posteriormente iba a formar la escara. La apariencia hialina y sólida que se apreció en los tiempos 12-24 y 48 horas posiblemente es el resultado de deshidratación y contracción

FIG. 1.
EVOLUCION DEL PROCESO DE CICATRIZACION
EN PIEL DE CONEJO TRATADA CON
N-ISOBUTIL-DECA-5-INO-8-ENO-TRANS-AMIDA.
ESTUDIO HISTOLOGICO



rápida de la malla de fibrina, probablemente por la disminución en la cantidad de fluido sérico, que hace parte del exudado.

La función primordial de los fibroblastos en un proceso inflamatorio es la reparación por sustitución de las áreas lesionadas. Suponiendo el hecho de que los exudados celular y humoral desaparecen con mayor prontitud, cualquier herida en estas condiciones debe empezar a repararse más rápidamente; este concepto está de acuerdo con la presencia de fibroblastos a partir de las 24 horas en el grupo tratado, mientras que en los controles este hecho se evidencia a partir de las 48 horas. No se encontraron diferencias morfológicas en el proceso de regeneración epitelial el cual fue igualmente satisfactorio en ambos grupos.

Observación macroscópica

A los animales a los cuales se les practicó la biopsia para el respectivo estudio histológico, se les continuó el tratamiento hasta cuando el proceso de cicatrización finalizó. La observación se hizo con la isobutilamida aislada y con el extracto completo de las flores. A los animales control se les aplicó la mezcla utilizada como solvente. En los animales a los cuales se les aplicó el tratamiento de la isobutilamida, después de 2 horas se pudo apreciar sobre la herida una película brillante y no se observó hemorragia ni presencia de exudado.

A las 24 horas, en los grupos tratados se apreció una escara bastante sólida, no se apreció eritema ni inflamación; el proceso siguió una evolución muy favorable observándose la caída de la escara y la aparición del epitelio nuevo entre el 5o. y 6o. días de tratamiento. En los animales control el proceso finalizó entre el 7o. y 9o. días de tratamiento. Los grupos tratados con el extracto completo cicatrizaron más lentamente que los tratados con la isobutilamida, pero dentro de un período de tiempo menor que el del grupo control.

Los resultados obtenidos en el estudio histológico concuerdan plenamente con la evolución del proceso de cicatrización observado macroscópicamente pues en los grupos tratados después de las 2 primeras horas post-quirúrgicas se observó una superficie seca, brillante, mientras que en los grupos controles fue evidente la presencia de exudado. La isobutilamida presentó un efecto protector de la lesión experimental, el cual pudo evidenciar por la formación rápida de la escara, disminución del proceso hemorrágico e inflamatorio y cicatrización completa, en menor tiempo que los grupos control.

Toxicidad aguda

Determinación de la DL₅₀

El efecto tóxico presentado por la isobutilamida fue evaluado empleando dos vías de administración: intraperitoneal y subcutánea. Cuando se utilizó la vía intraperitoneal se observó que una dosis de

120 mg por kilo de peso causó síntomas de intoxicación, los cuales se pudieron evidenciar después de cinco minutos de haber administrado la dosis. El efecto tóxico observado consistió en una notoria excitabilidad motora descoordinada, pero el grupo de animales regresó a la normalidad en un tiempo máximo de 30 minutos.

En el grupo al cual se le administró una dosis de 140 mg por kilo de peso, se desencadenó después de cinco minutos una reacción tóxica principalmente sobre el sistema nervioso central, caracterizada por un estado convulsivo, el cual duró aproximadamente diez minutos, observándose paro respiratorio y finalmente la muerte de todos los animales del grupo. El valor de la DL₅₀ obtenido de los sistemas gráficos y por cálculo matemático fue de 128 mg/k.

Al comparar el valor de la DL₅₀ para la isobutilamida por vía intraperitoneal con el valor reportado por la literatura, 210 mg/k, (12) para el clorhidrato de lidocaína utilizando esta misma vía de administración en ratón, se puede ver que la isobutilamida es 1,6 veces más tóxica que el clorhidrato de lidocaína. Los resultados obtenidos por vía subcutánea mostraron reacciones tóxicas similares a las descritas para la vía intraperitoneal; se obtuvo una DL₅₀ de 336 mg/kg y una DL₁₀₀ de 392 mg/kg. El valor de la DL₅₀ encontrado a partir de los sistemas gráficos y por cálculo matemático fue de 358 mg/kg. Relacionando el valor de la DL₅₀ encontrado experimentalmente para la isobutilamida con el reportado por la literatura para el clorhidrato de lidocaína por vía subcutánea, 440 mg/kg, (13) se observa que la isobutilamida es 1,23 veces más tóxica que el clorhidrato de lidocaína, en ratón. También pudo observarse que el valor de la DL₅₀ por vía subcutánea para la isobutilamida es 2,8 veces mayor que el valor de la DL₅₀ por vía intraperitoneal, en ratón.

Toxicidad local

Irritación en la piel

Las investigaciones hechas sobre animales de experimentación dan informaciones de gran valor en cuanto a la toxicidad y a los procesos de detoxificación de los anestésicos locales; sin embargo, se pueden presentar diferencias fundamentales entre las distintas especies de animales. Para el ensayo de toxicidad local, concretamente irritación en la piel, la bibliografía recomienda como animales de experimentación el conejo y el cobayo (14), (15), (16).

Las pruebas realizadas para la isobutilamida con concentraciones de 25 y 40 mg/kg no presentaron señales correspondientes a eritema ni a inflamación en el sitio de inyección en los tiempos de observación dados para la experiencia.

La evaluación de la respuesta al tratamiento utilizado para observar una posible reacción tóxica local en el ojo de conejo, indicaron la ausencia de toxicidad local en los animales tratados, y en los animales control, a las concentraciones de trabajo, 2 y 4% de la isobutilamida después de 24 y 48 horas.

CONCLUSIONES

1. Se comprobó la acción anestésica local de la N-isobutil-deca-5-ino-8-eno-trans-amida, por métodos farmacológicos tales como anestesia de superficie en córnea de conejo, infiltración en piel de cobayo y conducción en nervio ciático de rana.
2. En las condiciones experimentales empleadas, la N-isobutil-deca-5-ino-8-eno-trans-amida resultó ser más eficaz cuando se usó como anestésico de infiltración que como anestésico de superficie o de conducción, y fue tan eficaz como el clorhidrato de lidocaína para anestesia de infiltración cuando se usaron concentraciones porcentuales iguales.
3. En el estudio histológico del proceso de cicatrización en piel de conejo se demostró que la N-isobutil-deca-5-ino-8-eno-trans-amida facilita significativamente el proceso de cicatrización, respecto al tiempo para que ésta ocurra, como en la mayor provisión de elementos para hacerlo, lo cual fue evidente por la disminución del tiempo necesario para la cicatrización y la regeneración tisular y por un incremento de defensas en la región experimentalmente agredida, porque en una forma prematura se presentan los polimorfos nucleares neutrófilos, sin causar edema, concomitantemente con la presencia temprana de los fibroblastos, lo cual muestra un proceso de cicatrización rápida con respecto al grupo control.
4. Seguramente el efecto favorable presentado por la N-isobutil-deca-5-ino-8-eno-trans-amida para

la cicatrización de heridas asépticas sea debido a una disminución de los fenómenos inflamatorios (exudación, migración leucocitaria, congestión y hemorragia).

5. El estudio macroscópico de la acción cicatrizante de la N-isobutil-deca-5-ino-8-eno-trans-amida confirmó plenamente los resultados obtenidos en la observación histológica.
6. Aunque la eficacia de la N-isobutil-5-ino-8-eno-trans-amida como anestésico de superficie es menor que como anestésico de infiltración, podría tener un uso más importante como anestésico de superficie en ulceraciones de la mucosa húmeda, por cuanto quita el dolor, por una acción anestésica local, la cual al hacerse persistente, se traduce en una acción analgésica, a la vez que simultáneamente facilita el proceso de cicatrización.
7. Los resultados obtenidos en esta investigación respecto al estudio farmacológico, están de acuerdo con los observados en los estudios clínicos realizados por Calle M. y Prada J. en la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional, con el extracto completo de las flores de *Spi-lanthes americana* (Mutis) Hieron.

AGRADECIMIENTOS

Los autores del trabajo agradecen la colaboración del doctor Héctor Eduardo González, Médico-Veterinario, Ph.D., del Laboratorio de Investigaciones Médico-Veterinarias, ICA, en el estudio histopatológico.

BIBLIOGRAFIA

1. OSPINA DE NIGRINIS L.S., OLARTE, J.E., NUÑEZ, O.E., Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas, No. 15, p. 37, (1986).
2. CALLE M., PRADA J., Revista de la Federación Odontológica Colombiana, XXIV, p. 3, (1977).
3. WORTHEY E.G., SCHOTT C.D., Llodya 20, 2, p. 123 (1966).
4. WIEDLING S., Acta Pharmacol et Toxicol. 17, p. 233 (1960).
5. MCLEAD L.J., Pharmacological Experiments on Intact Preparations, E. and S. Livingstone, London, p. 33 (1970).
6. MENESES DE GONGORA BLANCA, MRAD DE OSORIO AFIFE, POLO, A., HERNANDEZ, L., Manual de Farmacología Especial, Universidad Nacional, Departamento de Farmacia, p. 29A, (1966).
7. ZEIGENMEYER J., and MEYER FR., Arch. Int. Pharmacodyn., 224 p. 164, (1976).
8. ZEIGENMEYER J., Ibid, p. 338.
9. RUIZ e IBAÑEZ, Métodos Biológicos de valoración de Medicamentos, 1a. ed. Ed. Alhambra, madrid, p. 256, (1951).
10. COLLINS R.F. and LARGE B.J., J. Pharm. and Pharmacol., 14, p. 48T, (1962).

11. LUNA G.L., **Manual of Histologic Staining Methods**, 3a. ed. McGraw Hill, New York, p. 258, (1968).
12. WIEDLING S., *Acta Pharmacol. et Toxicol.*, *17* p. 233, (1960).
13. WIEDLING S., *Ibid.*
14. COLLINS, R.F. and LARGE B.J., *J. Pharm. and Pharmacol.*, *14*, 48T, (1962).
15. WIEDLING, S., *Acta Pharmacol et Toxicol.*, *17*, p. 233 (1960).
16. SHAPERO, M., EDWARDS K.B., *J. Pharm and Pharmacol.*, *14* p. 119, (1966).
17. RUNNELS R.A., MONLUX, W.A., *Principles of Veterinary Pathology*. 7a. ed., University Press, Ames Iowa, p. 287, (1967).