

ACCIÓN ANESTÉSICA LOCAL DEL ACEITE DE BOTONES FLORALES DE *Syzygium aromaticum* EN *Rattus rattus* var. *albinus*
ANESTHESIA LOCAL ACTION OF OIL FLORAL BUTTON *Syzygium aromaticum* in *Rattus rattus* var. *albinus*

S. Santillán Aredo* & M. Román Vargas**
Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú.
rivert_89@hotmail.com*; margaritaromanvargas@hotmail.com

RESUMEN

Syzygium aromaticum "clavo de olor" es utilizado en la elaboración de alimentos, en la cocina, farmacia, perfumería, también como antifúngico y analgésico; por lo que se propuso determinar el efecto anestésico local en "ratas albinas", utilizando como niveles de tratamientos las dosis de 0,20 mg/kg; 0,30 mg/kg y 0,40 mg/kg de la disolución del aceite de "clavo de olor" en agua y alcohol en una proporción 1:3:0.2 respectivamente; para lo cual utilizamos cinco unidades experimentales de sexo masculino, en cada uno de los tratamientos; así como para los grupos control positivo y negativo, conformadas por lidocaína al 2% y solución salina fisiológica al 8,5% respectivamente. Para alcanzar el objetivo, se sometieron a los animales experimentales al test de la retirada de cola (tail-flick), en el cual los resultados muestran un tiempo inducción anestésica de $4,52 \pm 0,45$ min, $4,34 \pm 0,38$ min y $3,89 \pm 0,16$ min para las dosis de 0,20 mg/kg; 0,30 mg/kg y 0,40 mg/kg respectivamente, con tiempos de recuperación anestésica de $3,26 \pm 0,49$ min., $4,08 \pm 0,26$ min y $4,64 \pm 0,08$ min para la dosis de 0,20 mg/kg, 0,30 mg/kg y 0,40 mg/kg respectivamente. Los datos fueron analizados mediante la prueba estadística análisis de varianza y la prueba de la Mínima Diferencia Significativa Honesta, con un error de 0,05 %, mediante el cual se concluye que todas las dosis empleadas presentan efectos anestésicos locales en *Rattus rattus* var. *Albinus*, obteniendo el mayor efecto anestésico local en la dosis de 0,40 mg. /Kg .

Palabras claves: Inducción, recuperación, anestésicos, *Syzygium aromaticum*.

ABSTRACT

Syzygium aromaticum "clove" is used in food processing, in the kitchen, pharmacy, perfume, as antifungal and analgesic; so therefore seeks to determine the local anesthetic effect "albino rats", treatments using as the dose levels of 0.20 mg / kg, 0.30 mg / kg and 0.40 mg / kg dissolution of the oil "clove" in water and alcohol in a ratio 1:3:0.2 respectively; for which we used five male experimental units in each of the treatments, as well as for positive and negative control groups, made up of 2% lidocaine and saline 8.5% respectively. To achieve the goal, the animals were subjected to the test of experimental removal of tail (tail-flick), where the results show an anesthetic induction time of 4.52 ± 0.45 min, $4.34 \pm 0,38$ min. and 3.89 ± 0.16 min. for the dose of 0.20 mg / kg, 0.30 mg / kg and 0.40 mg / kg respectively, with anesthetic recovery times of 3.26 ± 0.49 min., 4.08 ± 0.26 min. and 4.64 ± 0.08 min. for the dose of 0.20 mg / kg, 0.30 mg / kg and 0.40 mg / kg respectively. Data were analyzed by ANOVA statistical test and the test of Least Significant Difference Honest, with an error of 0.05%, by which it is concluded that all doses, has local anesthetic effect *Rattus rattus* var. *Albinus*, obtaining the greatest local anesthetic effect in the dose of 0.40 mg. / Kg.

Key words: induction, recovery, anesthetics, *Syzygium aromaticum*.

Recibido: 06 Enero 2013

Aceptado: 16 Setiembre 2013

INTRODUCCIÓN

Los anestésicos son productos importantes que se utilizan para facilitar la gestión y, posiblemente el estrés en algunos animales terrestres y acuáticos, especialmente peces, tanto en investigaciones como en las prácticas de rutina en el campo (Rothenstein, 1983) Caracterizados como agentes farmacológicos capaces de manejar a estos animales, en una pérdida parcial o total de la percepción de los estímulos externos, afectando la capacidad de restaurar la postura normal de los especímenes (Daniel y col., 2009; Rothenstein y col., 1983; Wright y col., 1995).

El aceite de "clavo de olor" que se destila de las flores, los tallos y las hojas de *Syzygium aromaticum* (L.) Merrill & Perry, *Eugenia aromatica* (L.) Baillon o *Eugenia caryophyllata* Thunberg, la cual es una planta perteneciente a la familia Myrtaceae; es un árbol de hoja perenne que crece

hasta una altura de entre 8 a 12 m. con grandes hojas y flores sanguíneas, en numerosos grupos de racimos terminales. Los clavos son cosechados cuando tienen de 1.5 a 2 cm de largo, que consisten en un largo cáliz, que termina en cuatro sépalos difusos y cuatro pétalos no abiertos que forman una pequeña bola en el centro. Se cultiva de forma natural en Indonesia y en muchas partes del mundo, como Brasil, Perú entre otros. (Abe y col., 1995; Agra y col., 2008 y Lane, 1991).

Las plantas tienen un olor fenólico y sabor a ocre fuerte. El “clavo de olor” es utilizado en la cocina, en la elaboración de alimentos, farmacia, perfumería, cosméticos y popularmente en odontologías, sirve como fuente para la extracción de eugenol que manipulada con óxidos de zinc permitía la restauración en el sellado de cavidades abiertas en las muelas. (Agra, 2008; Lane, 1991; Oliveira y col., 2007). Entre los usos tradicionales de aceite de “clavo de olor” se incluyen el uso en el cuidado dental como anestésico, antiséptico y analgésico. (Oliveira, 2007)

La eficiencia y la seguridad de la anestesia del aceite de clavo, se describen en la literatura para varias especies de peces, tanto para la gestión de las consideraciones de la piscicultura, como para la realización de investigaciones (Lane, 1991). Entre las investigaciones hechas al respecto se encuentran las realizadas para peces dulceacuícolas como; “lubina” *Dicentrarchus labrax* Linnaeus, 1758, “dorada” *Sparus aurata* Linnaeus, 1758, “dentón” *Dentex dentex* Linnaeus, 1758 y “sargo picudo” *Diplodus puntazzo* Cetti, 1777 en México; *Seriola dumerilli* Risso, 1810 en México, *Piaractus mesopotamicus*, en Brasil, para su manipulación y traslado, así también en *Hippocampus hippocampus* Linnaeus, 1758 en España, para establecer un protocolo de anestesia y recuperación en el estudio de morfometría de juveniles de “caballito de mar”. Dicha propiedad medicinal ha sido tan efectiva que ha sido utilizada además en gastrópodos como; *Haliothis tuberculata* en España, en el cultivo de abalón. En nuestro país se han realizado pocas investigaciones al respecto pero entre las cuales figuran *Xiphophorus helleri* Heckel, 1848 en Lima, para realizar diversas pruebas de eficacia anestésica y económica del aceite de clavo, sobre las labores de manipulación genética.

Teniendo en cuenta la efectividad del “clavo de olor” como anestésico en peces, y la poca información de su acción en animales mamíferos el presente trabajo tiene como finalidad determinar la dosis del aceite de botones florales de *S. aromaticum* “clavo de olor”, que produzca un efecto anestésico local en *Rattus rattus var. Albinus*.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Química Biológica y Fisiología Animal, de la Facultad de Ciencias Biológicas.

- Material biológico:

Se utilizó 24 individuos machos adultos de *Rattus rattus var. Albinus*, aparentemente sanos, obtenidos del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo, con un peso promedio de 250 gramos. Cada uno de los tratamientos fueron obtenidos aleatoriamente. Se utilizó 500 gramos de botones florales secos de *S. aromaticum* “clavo de olor”. los cuáles fueron adquiridos en el mercado mayorista “la Hermelinda” (Trujillo – Perú). Como control se utilizó lidocaína al 2 %.

- Procedimiento:

- Obtención del aceite de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor”.

Los botones florales de “clavo de olor”, se lavaron con agua y se dejó secar en una estufa a 40° C durante una hora; se cortó hasta obtener un material más pequeño, para luego colocarlo en un equipo de destilación de arrastre por vapor durante 2 horas. Dado que el aceite de clavo es insoluble en agua, se realizó una dilución en agua y alcohol etílico al 96% en proporciones de 1:6:0.2 respectivamente

- Preparación de *Rattus rattus var. albinus*:

Los animales fueron inmovilizados con ayuda de una caja de restricción de movimiento fija y colocada en la unidad de estimulación del equipo, se les puso en reposo por un lapso de 30 minutos, a fin de que el espécimen se adapte, antes de tomar los datos.

➤ Metodología:

Para la presente experiencia se utilizó el método de retirada de cola (tail-flick), que fue descrito por D'Amour y Smith (1941). Para lo cual se procedió a someter el tercio distal de la cola del animal a un estímulo calórico de 45°C, por un periodo máximo de exposición de 21 segundos, dicho estímulo fue producido por un foco de 100 w. que se encuentra suspendido a una distancia de 2 cm sobre la superficie; cubierto por una caja hecha a base de cartón, que permitió mantener el calor producido por dicho foco, dicha caja tiene en su base un orificio de 2.7 cm de radio, permitiendo la salida constante del calor; el método cuenta con cronómetro que se inicia cuando se prende el haz calórico y se apagará cuando se interrumpe el mismo, provocado por el movimiento de la cola, dando el tiempo de duración total del estímulo. Previamente con una aguja de 25 G x 5/8" se inyectaron en el tercio distal de la cola las dosis de 0.20, 0.30 y 0.40 (mg/kg) de la dilución del aceite de *S. aromaticum*, en los respectivos especímenes que conforman los tratamientos; así como la droga patrón lidocaína al 2% como control positivo y la solución salina fisiológica al 8.5 % con alcohol al 96% en proporción 6:0.2 como control negativo.

➤ Medición del efecto anestésico del aceite de botones florales del "clavo de olor".

La medición del tiempo de inducción se tomó después de hacerse inyectado las dosis de aceite de *S. aromaticum*, en cada uno de los especímenes que conformaron los tratamientos.

La respuesta y resultados se tomaron cuando la rata albina presento molestias, las que se evidenciaron cuando el animal alejó la cola de la fuente de calor. El tiempo de recuperación se comenzó a tomar cuando *R. rattus* logro superar el tiempo máximo de exposición al estímulo de calórico de 45 °C (21 segundos), de tal modo se obtuvo la concentración en la que se produjo el efecto anestésico. Los datos obtenidos de la prueba anestésica se analizaron mediante el programa estadístico stargraphic plus 5.1, determinando mediante la prueba estadística análisis de varianza y la prueba de la Mínima Diferencia Significativa Honesta para los niveles de tiempo de inducción y recuperación anestésica según tratamientos.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestra que los tiempos promedios de inducción para las dosis de 0.20 mg. /Kg; 0.30 mg. /Kg y 0.40 mg. /Kg las cuales son de 4.52 ± 0.45 (min); 4.34 ± 0.38 (min) y 3.89 ± 0.16 (min) y los tiempos promedio de recuperación anestésica que son de 3.26 ± 0.49 ; 4.08 ± 0.26 y 4.64 ± 0.08 respectivamente para cada dosis. Puesto que el p-valor del test F en el análisis de varianza es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre los tiempos de inducción y recuperación medio de un nivel de tratamientos a otro, para un nivel de confianza del 95,0%.

La Fig. 1 muestra las curvas generadas por la reducción del tiempo de inducción e incremento en de los tiempos de recuperación según las dosis empleadas, comparadas el anestésico odontológico lidocaína.

Tabla 1. Promedio y análisis de varianza de los resultados obtenidos en la prueba anestésicas con aceite de *S. aromaticum* "clavo de olor" a diferentes dosis; en machos (n=25) de *R. rattus* var. albinus. Los valores de la tabla están expresados como medias ± D.E. (desviación estándar).

	S.S.F. al 8.5% + alcohol (1:0.2)	Aceite de "clavo de olor" diluido en agua y alcohol (1:6:0.2)			Lidocaína AL 2 %
Dosis	0.06 mL.	0.20 mg./ Kg	0.30 mg./ Kg	0.40 mg./Kg	0.06 mL.
Peso medio (g)	209.62±5.34	250.54±6.96	255.28±32.71	271.6±12.4	231.6±13.49
Tiempo medio de inducción (min)	0.179 ± 2.79	4.52 ± 0.45	4.34 ± 0.38	3.89 ± 0.16	1.52 ± 0.25
Tiempo medio de recuperación (min)	0.186 ± 3.65	3.26 ± 0.49	4.08 ± 0.26	4.64 ± 0.08	7.84 ± 0.18

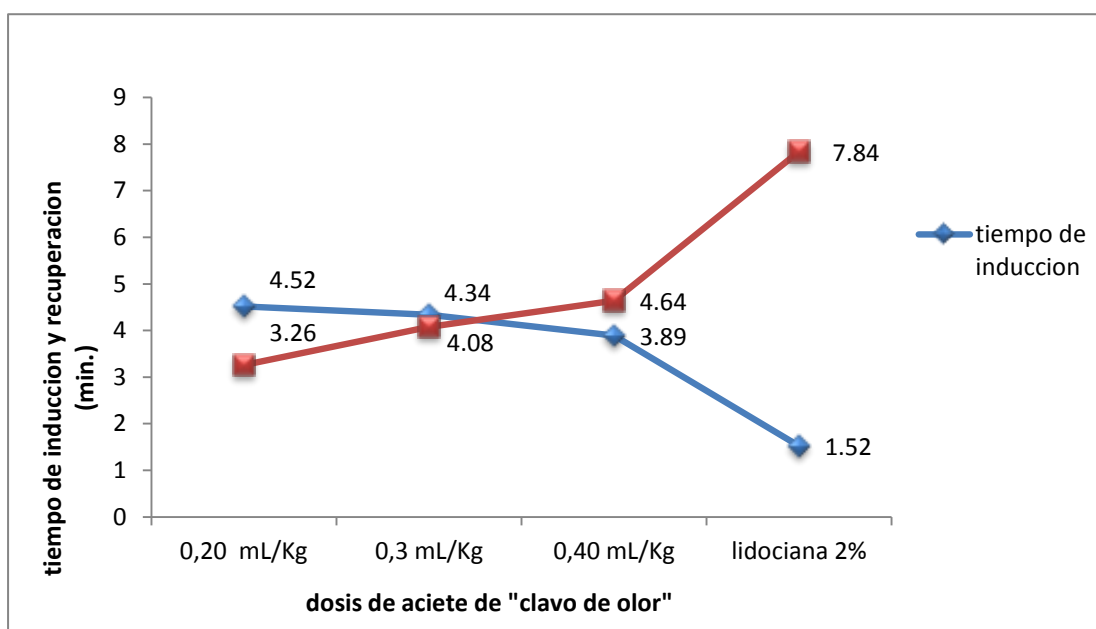


Fig. 1. Tiempo de inducción (celeste) y recuperación anestésica media (rojo) en las diferentes dosis del aceite de clavo de olor, comparado con el anestésico local lidocaína el 2%.

Tabla 2. Determinación de grupos homogéneos mediante el método 95,0 porcentaje HSD de Tukey para el tiempo de inducción según tratamientos.

Tratamientos	Frec.	Media	Grupos homogéneos
control(-)	5	0.179	X
dosis 1	5	4.52	X
dosis 2	5	4.34	X
dosis 3	5	4,64	X
control(+)	5	7,84	X

p < 0.05

El valor de $p < 0.05$, indica que éstos muestran diferencias estadísticamente significativas entre el grupo formado por las dosis 1 y dosis 2 con respecto a los demás, con un nivel de confianza 95,0%. Así mismo en la parte superior, se identifican 5 grupos homogéneos según la alineación del signo X en la columna, es así que para aquellos que tengan los signos correctamente alineados se dice que son homogéneos, mientras que para los que no se encuentran alineados correctamente se dice que son heterogéneos. Dentro de cada columna, los niveles que tienen signo X forman un grupo de medias entre las cuales no hay diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 3. Determinación de grupos homogéneos mediante HSD de Tukey para el tiempo de recuperación según tratamientos.

Tratamientos	Frec.	Media	Grupos homogéneos
control(-)	5	0,186	X
dosis 1	5	3,26	X
dosis 2	5	4,08	X
dosis 3	5	4,64	X
control(+)	5	7,84	x

$p < 0.05$

El valor de $p < 0.05$ indica que éstos muestran diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza 95,0%. Así mismo en la parte superior, se identifican 5 grupos homogéneos según la alineación del signo X en la columna, es así que para aquellos que tengan los signos correctamente alineados se dice que son homogéneos, mientras que para los que no se encuentran alineados correctamente se dice que son heterogéneos. Dentro de cada columna, los niveles que tienen signo X forman un grupo de medias entre las cuales no hay diferencias estadísticamente significativas.

DISCUSIÓN

Al analizar el comportamiento de los animales expuestos a diferentes concentraciones de aceite de “clavo de olor” se ha observado que este compuesto determina el proceso de anestesia en *R. rattus* var. Albina, en dosis superiores a 0.30 mg./Kg, ya que a pesar de que entre todas las dosis en estudio existen diferencias estadísticamente significativas para el tiempo de recuperación (Tabla 3), el tiempo necesario para la inducción anestésica de las ratas fue significativamente menor en la dosis de 40 mg./Kg. en comparación con otras dosis en estudio ($P < 0,05$) (fig. 1 y Tabla N. 2). Las concentraciones de aceite de “clavo de olor” de 20 mg./Kg y 30 mg./Kg, son también satisfactorias, aunque el tiempo para inducir la anestesia local de los animales sea más elevado e incluso mayores que el tiempo de recuperación (fig. 1). Lo que según Oliveira y col., (2007 y 2008), en su trabajo realizado en peces sostiene que la eficacia anestésica se consigue cuando la sedación se debe lograr en un periodo menor o igual a tres minutos y la recuperación del nado normal en un periodo no mayor a 10 minutos, poniendo en evidencia que una droga es eficiente cuando el tiempo de inducción anestésica es menor que el tiempo de recuperación. Por otro lado, Hikasa y col. (1986) señalan que el periodo de recuperación es más corto a temperaturas altas, de allí la importancia de brindar atención especial a la temperatura del medio (Iversen y col., 2003).

El aceite de clavo ha sido introducido en la odontología. Conforme evolucionó el conocimiento de las propiedades farmacológicas, su uso se hizo más común; específico y selectivo hasta la actualidad, utilizado principalmente para la supresión del dolor. A través de un análisis GC/MS de aceite esencial de clavo de olor, se identificaron componentes; la mayor concentración fue de eugenol (88,58%), acetato de eugenyl (5.62%) y B-cariophyllena (1.38%) (Daniel y col., 2009.).

El efecto anestésico y analgésico del eugenol ha sido atribuido a su acción inhibitoria sobre los canales de sodio (Park y col., 2006) y calcio, especialmente los canales tipo N-calcio o High voltage activated calcium channel (HVACC), dado que bloquea la generación del potencial de

acción y produce una disminución en la liberación de neurotransmisores dependientes de calcio en las terminaciones presinápticas neuronales (Lee y col., 2005). Estudios *in vitro* han demostrado el efecto bloqueante del eugenol sobre los receptores vaniloides (TRPV1- Transient receptor potential vanilloid 1), inhibiendo así la transmisión del dolor (Yang y col., 2003); sin embargo, Lee y col. (2005) indican que la acción del eugenol no es dependiente de TRPV1. Ohkubo y Kitamura (1997) reportan que el eugenol puede activar los receptores de capsaicina, y sugieren, además, que el eugenol posee una acción de tipo específica, mediante la inducción de corriente en la membrana de las neuronas sensoriales y también puede activar de forma reversible canales permeables al Ca^{2+} y canales de Cl^- dependientes de calcio. Adicionalmente, a este anestésico se le ha atribuido el incremento en la liberación de sustancia P de las neuronas nociceptivas polimodales (Bevan y Szolcsányi, 1990). Otros autores sustentan que el efecto analgésico del eugenol está directamente mediado por la inhibición de la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos (Dohi y col., 1991).

De igual manera, se ha descrito que el isoeugenol, componente del eugenol, bloquea la transmisión de la información sensorial al hipotálamo a partir de la interacción con neurotransmisores relacionados con la sensibilidad al dolor, el efecto agonista en GABA (ácido gamma-amino butírico) y antagonista de glutamato (NMDA) (Aoshima y Hamamoto, 1999; Yang y col., 2003).

A pesar que la dosis 40 ml/kg es eficiente, se ha observado que dicha dosis produce daños en el tejido expuesto, presentándose como llagas. Lo que corrobora lo expuesto por Gonzales (2002), el cual afirma que el eugenol presente en el aceite de clavo de olor puede llegar a provocar lesiones cáusticas o quemaduras superficiales en altas concentraciones en los tejidos blandos. La severidad del daño es proporcional al tiempo de exposición, a la dosis y a la concentración. Se ha visto que el eugenol puede llegar a mostrar tanto *in vivo* como *in vitro* diferentes tipos de toxicidad, tales como daño directo al tejido, dermatitis, reacciones alérgicas, disfunciones hepáticas, coagulación intravascular diseminada, hipoglicemia severa, e incluso la muerte por falla orgánica múltiple. (Garza y Toranzo, 1998.). Pero a su vez se hace resaltar la desventaja de los anestésicos locales suministrados por infiltración, en los cuales se hace necesaria la utilización de cantidades relativamente grandes de una droga para anestésicar áreas relativamente pequeñas.

CONCLUSIÓN

Se determinó que todas las dosis empleadas tiene un efecto anestésico local en *R. rattus* var. *albinus*, siendo la dosis de 40 mL./Kg en la que se obtuvo el mayor efecto anestésico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe S., Marvyams D., Heffner S.** 1995, intravenos eugenol causes, hemorrhagic. Lung edema in rats: proposed oxidant. Mechanisms. J lab den Med. 125: 257 – 264.
- Agra M., Silva K., Basilio I., Franca., Barbosa-Filho J.** 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. Rev Bras Farmacogn 18: 472 – 508.
- Aoshima H, Hamamoto K.** 1999. Potentiation of GABA A receptors expressed in *Xenopus* oocytes by perfumes and phytoncid. Biosci Biotechnol Biochem 63: 743-748.
- Bevan S, Szolcsányi J.** 1990. Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications. Trends Pharmacol Sci 11: 330-333.
- Daniel A., Sartoretto S., Schmidt G., Caparroz-Assef S., Bersani-Amado C., Cuman R** 2009. Antiinflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. Rev. bras Farmacogn. 19: 212 – 217.
- Dohi T, Anamura S, Shirakawa M, Okamoto H, Tsujimoto A.** 1991. Inhibition of lipoxygenase by phenolic compounds. Jpn J Pharmacol 121: 146 -147.
- González R.** 2002. Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. Rev. Cubana Estomatología. 39 (2):139-156 pg.
- Hikasa Y, Takase K, Ogasawara T, Ogasawara S.** 1986. Anesthesia and recovery with tricaine methanesulfonate, eugenol and thiopental sodium in the carp, *Cyprinus carpio*. Jpn J Vet Sci 48: 341-351.

- Iversen M, Finstand B, Mackinley R, Eliassen R.** 2003. The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-S and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. *Aquaculture* 221: 549-566.
- Lane B., Ellenhorn M., Hulbert T., Mc Carron M.** 1991. Clove oil ingestion in an infant. *Hum Exp Toxicol* 10: 291-294.
- Lee M, Yeon K, Park C, Li H, Fang Z, Kim MS, Choi SY, et al.** 2005. Eugenol inhibits calcium currents in dental afferent neurons. *J Dent Res* 84: 848-851.
- Ohkubo T, Kitamura K.** 1997. Eugenol activates Ca²⁺ permeable currents in rat dorsal root ganglion cells. *J Dent Res* 76: 1737-1744.
- Oliveira F., Gobira B., Guimarães C., Batista J., Barreto M., Souza M.** 2007. Espécies vegetais indicadas na odontologia. *Rev Bras Farmacogn* 17: 466-476.
- Oliveira L, Branco R, Luscher A, Lira A, Rocha T, Santos G.** 2008. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. *Pesq Agropec Bras* 43: 1069-1074.
- Oliveira L, Massamitu W, Sakaguti T, Rodrigues C, Dena dos Santos L, Martins C.** 2007. Concentrações de Eugenol para anestesia profunda e toxicidade aguda em juvenis de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*). *Acta Sci* 29: 357-362.
- Park C, Ki H, Yeon K, Jung S, Choi S, Lee SJ, Lee S, et al.** 2006. Eugenol inhibits sodium currents in dental afferent neurons. *J Dent Res* 85: 900-904
- Rothenstein A., Booman K., Dorsky J., Kohrman K., Schwoeppe E., Sedlak R., Steltenkamp R.** 1983. Eugenol and clove leaf oil. A survey of consumer patch-test sensitization. *Food Chem Toxicol* 21: 727-733.
- Wright S., Baron D., Heffner J.** 1995. Intravenous eugenol causes hemorrhagic lung edema in rats: proposed oxidant mechanisms. *J Lab Clin Med* 125: 257-264.
- Yang, B.H.; Piao, Z.G.; Kim, Y.B.; Lee, C.H.; Lee, J.K.; Park, K.; Kim, J.S.; Oh, S.B.** 2003. Activation of vanilloid receptor 1 (VR1) by eugenol. *Journal of Dental Research*, v.82, p.781-785

