

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL

Jovanni Plata Rivera

Jovanniplata19@gmail.com

Matricula: 2172043642

Lugar: Edificio "N", laboratorio 302: Química de productos naturales.
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

Realizado del 27 de junio del 2022 al 27 de diciembre del 2022

Ciencias Biológicas y de la Salud

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Proyecto: Efecto antiinflamatorio y antinociceptivo de *Verbena officinalis*
en el modelo de edema plantar en ratones CD-1 y formalina 1% en ratas
wistar.

Asesor interno:

Dr. Miguel Ángel Zavala Sánchez

No. Económico: 17767



Asesor externo:

M.C.F. Estanislao Jiménez Pérez

Cédula: 9953458



INDICE

2	Resumen.....	3
3	Introducción.....	4
4	Marco teórico.....	5
4.1	Inflamación.....	5
4.2	Inflamación crónica.....	6
4.3	Inflamación aguda.....	7
4.3.1	Fases de la inflamación.....	7
5	Dolor.....	8
5.1	Tipos de dolor.....	10
6	Tratamiento de la inflamación y dolor.....	11
7	Productos naturales.....	12
8	Metabolitos secundarios.....	13
9	Genero Verbenaceae (<i>officinalis</i>).....	13
9.1	<i>Verbena officinalis</i>	14
10	Hipótesis.....	14
11	Objetivos.....	15
12	Materiales y métodos.....	15
12.1	Obtención de extracto etanólico.....	15
12.2	Evaluación farmacológica de la actividad antiinflamatoria.....	15
12.3	Edema plantar inducido por carragenina en ratón CD1.....	16
12.4	Evaluación farmacológica de la actividad antinociceptiva.....	16
	Prueba de formalina al 1 % en ratas Wistar.....	16
12.5	Evaluación de Pruebas fitoquímicas.....	17
12.6	Análisis estadístico.....	17
13	Resultados y discusión.....	17
13.1	Obtención de los extractos.....	17
13.2	Efecto antiinflamatorio (edema auricular).....	17
13.3	Efecto antiinflamatorio (Edema plantar inducido por carragenina).....	19
13.4	Efecto antinociceptivo (Formalina 1%).....	21
13.5	Análisis fitoquímico.....	23
14	Conclusión.....	25
15	Recomendaciones.....	25
16	Referencias.....	25

1 Resumen

El presente estudio de diseño experimental tuvo como objetivo determinar el efecto antiinflamatorio y antinociceptivo, de la planta *Verbena officinalis*, la cual se encuentra ampliamente distribuida en el centro y sur de México; esta fue recolectada en San Antonio pueblo nuevo en el Estado de México. Se obtuvo el extracto etanólico el cual se evaluó su actividad antiinflamatoria en dos modelos distintos (edema auricular inducido por aceite de crotón y edema plantar inducido por carragenina) y el efecto antinociceptivo en el modelo de formalina al 1 %.

La actividad antiinflamatoria se evaluó a través del modelo experimental edema auricular inducido por aceite de crotón en ratones machos CD1 en los cuales se utilizó como fármaco de referencia indometacina, la vía de administración para los extractos fueron tópica, presentando actividad antiinflamatoria del extracto etanólico con un 60.24, 70.64 y 78.08% de inhibición del edema a tres dosis 1.77, 3.16 y 5.62 mg/oreja.

El modelo del edema plantar con carragenina es un modelo experimental estándar de inflamación aguda (Winter et al. 1962). El modelo es elegido para ensayar agentes antiinflamatorios (Kale et al. 2007) por vía oral. Los grupos evaluados (carragenina 1 %, extracto [56.23 mg/kg] e indometacina [10 mg/kg]), mostraron un % de inhibición del edema del 48.85 ± 7.87 y 68.25 ± 3.18 % respectivamente, por lo que el extracto etanólico de *V. officinalis* demostró tener efecto antiinflamatorio al ser utilizado por vía oral.

El modelo para evaluar la actividad antinociceptiva fue mediante la prueba de formalina al 1 %, los grupos (formalina 1%, vehículo [sol. salina + DMSO al 5%], extracto a tres dosis crecientes (56.23, 177.8, 562.3µg/pata) y diclofenaco [100 µg/pata]) fueron administrados vía subcutánea en el dorso de la pata derecha de la rata, los resultados se expresaron en % de inhibición: fase I (19.78 ± 1.86 , 22.76 ± 2.51 , 29.66 ± 1.57) y el % de inhibición fase II (21.82 ± 1.47 , 25.03 ± 2.50 , 39.96 ± 4.30) y del grupo control positivo (diclofenaco) fase I ($30.22 \pm 5.57\%$), fase II ($61.24 \pm 10.05\%$) mostrando actividad nociceptiva en ambas fases del modelo, teniendo mayor similitud con el fármaco de referencia.

Por otro lado se realizó un análisis fitoquímico preliminar del material vegetal previamente colectado a partir de extracto etanólico de dos de sus órganos: hojas y tallos, y así mismo se realizaron pruebas cualitativas para identificar los principales metabolitos secundarios: flavonoides, alcaloides, triterpenos y esteroides, cumarinas, saponinas, lactonas, heterósidos cardiotónicos, taninos y fenoles, los cuales podrían contribuir al efecto antiinflamatorio.

2 Introducción

La inflamación es una compleja respuesta integrada de los vertebrados, diseñada para eliminar cualquier estímulo nocivo introducido al huésped desde el entorno interno y externo, por lo que una respuesta inflamatoria normal se caracteriza por la infiltración de leucocitos y la liberación de otros mediadores inflamatorios (AINE, IL-8, IL-6 e IL-12) activados en el sitio de lesión/ infección y, eventualmente, se resolverá o regulará con la liberación de mediadores antiinflamatorios, por otra parte el dolor es una percepción sensorial, localizada y subjetiva con intensidad variable que puede resultar molesta y desagradable en una parte del cuerpo, por lo que el resultado del dolor es una estimulación por parte de las terminaciones nerviosas sensitivas de la zona.

Los procesos inflamatorios se caracterizan por vasodilatación, exudación de un fluido rico en proteínas (además de prostaglandinas, histaminas, citoquinas, entre otros) y migración celular (polimorfonucleares, especialmente neutrófilos) causando influjo celular y/o extravasación en el lugar de la injuria (Castardo et al. 2008).

Por otro lado los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) reducen el dolor y la inflamación al bloquear el metabolismo del ácido araquidónico mediante la enzima ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2) y, por lo tanto, reducen la producción de prostaglandina, ya que los efectos adversos de estos mediadores antiinflamatorios pueden ser, fiebre, ataque cardíaco, por lo que la investigación continua sobre los productos naturales así como la determinación de los extractos para la observación farmacológica de los mismos (Calvo M., 2006).

De acuerdo con la tendencia de la población al hacer uso de medicamentos de origen natural, para los investigadores en productos naturales, se hace indispensable la profundización en el conocimiento de las plantas medicinales, analizar su composición química y los factores que puedan hacerla variar, conocer la estructura y las propiedades de los principios activos con miras para poder determinar su posible actividad farmacológica, determinar las indicaciones, contraindicaciones, efectos secundarios entre otros, con el fin de utilizarlas en el tratamiento y prevención de los problemas de salud.

Actualmente se ha despertado el interés científico por la búsqueda de nuevos fármacos con actividad antiinflamatoria y analgésica, con menos efectos colaterales, en este sentido, las plantas medicinales pueden ser una fuente natural alternativa, que se emplea en la medicina tradicional como antiinflamatorio, cicatrizante, analgésica, así mismo podemos mencionar que un producto natural es un compuesto químico o sustancia producida por un organismo vivo, encontrado en la naturaleza que tiene generalmente una actividad farmacológica o biológica para su uso en el descubrimiento de fármacos farmacéuticos y drogas de diseño. Los productos naturales pueden ser extraídos de los tejidos de las plantas terrestres, organismos marinos o caldos de fermentación de microorganismos” entre otros. (Tomazela, D., Pupo, M.2000)

Se observó el efecto secundario de diferentes fármacos utilizados para el tratamiento del dolor y la inflamación por las diferentes desventajas que le

causaban a los humanos al ingerir fármacos, por lo que se tiene la necesidad constante de investigar otras alternativas terapéuticas como lo son la medicina tradicional ya que las plantas medicinales han demostrado un gran valor como fuente de moléculas con potencial terapéutico, y en la actualidad siguen representando un grupo importante para la identificación de nuevas moléculas de interés farmacéutico (Thomford N., *et al*, 2018).

La presente investigación busca incentivar y valorar el uso de las plantas medicinales sobre su potencial para el tratamiento de diferentes padecimientos, se ha comprobado que la planta *Verbena officinalis*, produce un efecto antiinflamatorio, analgésico local y sedante, útil en cefaleas y migrañas, además señala la presencia de taninos los mismos que tienen una cierta acción astringente, los carbohidratos (mucílagos) le confieren una actividad antiinflamatoria, por lo cual el extracto etalonico fue expuesto a un análisis fitoquímico donde se encontraron diferentes metabolitos secundarios. (García Barriga H., 1975; Gupta M., 1995; Germosén-Robineau L., 1995; Cáceres A., 1996).

3 Marco teórico

La inflamación y el dolor se manifiestan como sensaciones desagradables que pueden estar asociados con una amplia gama de lesiones y enfermedades, los fármacos utilizados para el tratamiento del dolor y la inflamación cuentan con ciertas desventajas que se manifiestan en efectos secundarios, por lo que se tiene la necesidad constante de investigar otras alternativas terapéuticas como lo es la medicina tradicional, ya que las plantas medicinales han demostrado un gran valor como fuente de moléculas con potencial terapéutico, por lo que son de interés farmacéutico. Los compuestos bioactivos derivados de plantas pueden ejercer sus efectos ya sea por el incremento de enzimas antioxidantes, disminución de peróxidos lipídicos y/o modulación de vías que conlleven al daño celular, entre otros. En base a evidencias que respaldan lo anterior, se busca alternativas a los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), debido a que éstos presentan efectos secundarios dañinos para el tejido. Además, estudios previos refieren que el pretratamiento con indometacina abolió completamente la inducción de COX-2 en el edema de la pata (Nantel et al. 1999).

3.1 Inflamación

La inflamación es una respuesta inmunológica del cuerpo a una lesión o una infección, por patógenos bacterianos y por cualquier otro agresor de naturaleza biológica, química, física o mecánica. Diferentes tipos de células inmunes, incluyendo basófilos, neutrófilos, monocitos y macrófagos, monocitos y macrófagos contribuyen en la llegada de moléculas e inmunes al lugar de la inflamación. Además, cada uno de estas células tienen funciones específicas, como la fagocitosis, liberación de factores tóxicos, presentación del antígeno, regulación de la respuesta inmunológica y la reparación del tejido dañado. Los linfocitos T y B también tienen funciones importantes en la inflamación. Los linfocitos T producen linfoquinas para prolongar la respuesta inmunológica y los linfocitos B producen anticuerpos que pueden potenciar la inflamación. Aunque dolorosa, la inflamación es, normalmente, una respuesta reparadora; un proceso que implica un enorme gasto de energía metabólica.(

Pedro García 2008) por lo que las prostaglandinas y otros derivados del ácido araquidónico en los procesos inflamatorios, diversas citocinas como la IL-1b y el TNFa, entre otros, inducen la producción de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2), con una subsecuente liberación de eicosanoides entre los que se encuentran las PGE2, la PGI2 y el leucotrieno B4 (LTB4), los cuales participan de manera importante en la sensibilización de las terminaciones nociceptivas ante estímulos dolorosos.(Bley KR, Hunter JC)

Así mismo la respuesta inflamatoria (RI) está estrechamente relacionada con el proceso de reparación. La RI es útil para destruir, atenuar o mantener localizado al agente lesivo, y simultáneamente inicia una serie de acontecimientos que pueden determinar la cura o reconstrucción del tejido lesionado, (Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN 2007) por esta razón se afirma que la inflamación es fundamentalmente una respuesta de carácter protector, y de no existir este proceso, las infecciones se propagarían de manera incontrolada, las heridas no se curarían nunca y los órganos lesionados presentarían lesiones supurativas de forma permanente. Sin embargo, en ciertas situaciones, como en reacciones alérgicas y enfermedades crónicas, el proceso inflamatorio constituye el mecanismo patogénico básico. (Cook JM, Deem TL 2005)

La inflamación presenta dos fases bien diferenciadas: aguda y crónica. La inflamación aguda tiene una evolución relativamente breve; sus características fundamentales son la exudación de líquido y de proteínas plasmáticas (edema), y la migración de leucocitos (principalmente neutrófilos). La inflamación crónica tiene una duración mayor y se caracteriza por la proliferación de vasos sanguíneos, fibrosis y necrosis tisular

3.2 Inflamación crónica

Las inflamaciones crónicas se producen por una enfermedad autoinmune. Esto ocurre cuando el sistema inmune del organismo no puede diferenciar de las células sanas y los gérmenes amenazantes, como virus o bacterias.

Las bacterias invaden la glándula grasosa y dan comienzo al proceso inflamatorio. El sistema inmune de nuestro organismo identifica las bacterias invasoras y envía sus primeras defensas como respuesta (los leucocitos o glóbulos blancos) al sitio de la infección. Los leucocitos rodean y aseguran la infección en su lugar, de forma muy similar a como se acordona la escena de un crimen con una cinta amarilla. Su trabajo consiste en impedir que el daño se difunda, matando las bacterias y reparando el tejido. Todo este proceso produce inflamación, que incluye los siguientes síntomas:

Vasodilatación: El aumento del tamaño de los vasos sanguíneos cerca del área afectada, lo que permite que el flujo sanguíneo y los glóbulos blancos (que combaten las infecciones) lleguen con más facilidad a la zona.

Calor: El aumento de la temperatura en el área afectada, lo que ayuda a matar a los gérmenes y a reducir la inflamación.

Rubor: El enrojecimiento de la piel cerca del área afectada, debido a la vasodilatación.

Dolor: El dolor es un síntoma clásico de inflamación, debido a la liberación de sustancias químicas que irritan los nervios.

Hinchazón: El aumento del volumen en el área afectada, debido a la acumulación de líquido y células inflamatorias.

Rigidez en el área inflamada también puede presentarse y puede variar dependiendo del tipo de lesión o enfermedad

3.3 Inflamación aguda

La inflamación aguda constituye una respuesta natural, de carácter protector, que pretende librar al organismo de la causa inicial de la lesión celular y de las consecuencias que esta provoca. La alteración de la permeabilidad constituye la característica principal y de mayor especificidad, provoca el exudado profuso hacia el intersticio. La pérdida de proteínas del plasma reduce la presión osmótica intravascular y el incremento en el intersticio; secundario a la vasodilatación aumenta la presión hidrostática intravascular, lo que conduce a una importante salida y acumulación de líquido en el tejido intersticial, formándose finalmente el edema ofensor. (Regal M, Borges A, Armas J, Alvarado M, Cedeño V, Cuesta J 2015)

3.3.1 Fases de la inflamación

Fase aguda: comienza de forma rápida después de la lesión o la infección. Se caracteriza por vasodilatación, aumento de la permeabilidad capilar y migración de células inflamatorias al sitio de la lesión. Son liberadas o sintetizadas por leucocitos polimorfonucleares (PMN) especialmente los neutrófilos los cuales actúan en las primeras fases de la inflamación (6-24 h), luego acuden los macrófagos y finalmente los linfocitos, por medio de la actuación de determinados estímulos, sin embargo, aunque en este proceso se liberan una gran cantidad de mediadores diferentes, las prostaglandinas, los leucotrienos y el óxido nítrico han sido considerados como las moléculas más activas durante este proceso

Fase de proliferación: que se desarrolla en las primeras 48-72 horas después de la lesión. Los fibroblastos y los vasos sanguíneos nuevos comienzan a crecer en el sitio de la lesión y las células inflamatorias comienzan a reparar los tejidos dañados. Comienza una vez que el cuerpo ha combatido y controlado el agente agresor. Durante esta fase, el cuerpo comienza a reparar los tejidos dañados y a regenerar los tejidos nuevos. Esto incluye la formación de un coágulo en el área dañada para detener la pérdida de sangre, la migración de células para limpiar el área dañada y la producción de colágeno para fortalecer y reparar los tejidos. La duración de esta fase varía dependiendo del tipo y gravedad de la lesión. Favorecen la llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio, las células involucradas son: Basófilo que contribuye junto con el mastocito la liberación de mediadores, Neutrófilo que eliminan gérmenes mediante fagocitosis o liberando factores tóxicos, Monocito y Macrófago que presenta funciones similares a los neutrófilo, pero también actúan como célula presentadora del antígeno a las células específicas T y B, iniciando de esta forma

respuestas específicas, también sintetizan la interleucina 1 (IL-1) que determina la aparición de fiebre, probablemente induciendo la síntesis de prostaglandinas que actúan sobre el centro termorregulador, también activa la proliferación de fibroblastos y producción de colágeno, fenómenos incluidos en la fase de reparación de la inflamación, Linfocitos B que sintetizan IgE que unidas al mastocito o basófilo pueden potenciar la inflamación, los linfocitos T comienzan a producir linfoquinas que prolongan la inflamación en una respuesta inmune más elaborada y los Eosinófilo que actúan en la función reguladora de la inflamación.

Fase de resolución: en donde se reducen los síntomas de la inflamación, la función del tejido se restablece y se alcanza el estado pre-injuria. Esta fase comienza una vez que el cuerpo ha reparado los tejidos dañados y se ha controlado el agente agresor. Durante esta fase, el cuerpo comienza a disminuir la inflamación y a restaurar el estado normal del tejido. En esta fase, los agentes antiinflamatorios naturales del cuerpo, como las prostaglandinas y los leucotrienos, comienzan a equilibrar la respuesta inflamatoria, lo que ayuda a reducir el enrojecimiento, la hinchazón y el dolor. También se producen cambios en la vasculatura para ayudar a la restauración de la función normal del tejido. Los tejidos dañados son reemplazados por tejido nuevo y las células inflamatorias son eliminadas. La fase de resolución es esencial para el proceso de curación ya que permite la restauración del estado normal del tejido, previene el desarrollo de una inflamación crónica y reduce el riesgo de cicatrices o fibrosis en el lugar de la lesión.

Fase de remodelación: los tejidos dañados son reparados por células como los fibroblastos y los macrófagos, los cuales producen y depositan nuevo colágeno y otros componentes del tejido conjuntivo para reconstruir y fortalecer las estructuras dañadas. Además se activan ciertas citoquinas que ayudan a iniciar esta fase, como la IL-1 donde se aumenta la producción de colágeno y la cicatrización del tejido dañado. El proceso de cicatrización se completa en los siguientes días o semanas. La duración de estas fases puede variar dependiendo de la gravedad de la lesión o la infección, y puede continuar por un tiempo prolongado en caso de enfermedades crónicas. (García, L., Martínez, M. & González, H. 2001; Cervantes, R., Cervantes, A., & Presno J. 2014; García, P., 2008; González, R., et al,1994)

4 Dolor

El dolor es una sensación desagradable que puede ser física o emocional. Es una señal de advertencia del cuerpo que indica que algo no está funcionando correctamente. El dolor puede ser agudo o crónico, temporal o continuo, y puede variar en intensidad.

El dolor agudo es un dolor breve y intenso que se produce después de una lesión o enfermedad, y suele ser una señal de que el cuerpo está tratando de curarse. El dolor crónico es un dolor que dura más de tres meses y puede ser causado por una variedad de condiciones médicas, como el dolor de espalda o la fibromialgia.

Existen diferentes teorías acerca de cómo ocurre el dolor, pero en general, se cree que es un proceso complejo que involucra la interacción entre varios sistemas del cuerpo, incluyendo el sistema nervioso, el sistema endocrino y el sistema inmunológico. El tratamiento del dolor puede incluir analgésicos, terapia física, cambios en el estilo de vida, y en casos graves, cirugía. El dolor se puede clasificar en dos categorías, dependiendo de su duración: dolor fisiológico (agudo) y dolor patológico (crónico). El dolor fisiológico o nociceptivo es transitorio y ayuda a proteger al organismo de un daño tisular, mientras que el dolor patológico es persistente e innecesario para la supervivencia del individuo (Nakagawa y Kaneko, 2010). El dolor patológico es la consecuencia de un daño y/o disfunción del sistema nervioso periférico o central (dolor neuropático), de un daño al tejido periférico o inflamación (dolor inflamatorio) (Gao y Ji, 2010). Además, el dolor patológico se caracteriza por generar respuestas de dolor espontáneo como alodinia e hiperalgesia.

Dolor agudo: es un tipo de dolor intenso y temporal que ocurre repentinamente, como el dolor causado por una herida o una quemadura.

Dolor crónico: es un tipo de dolor que dura por más de seis meses. Puede ser causado por una afección médica subyacente, como la artritis o la fibromialgia.

Dolor neuropático: es un tipo de dolor causado por daño o enfermedad en los nervios. Puede causar sensaciones de quemazón, hormigueo o adormecimiento.

Dolor muscular: es un tipo de dolor causado por un esfuerzo físico excesivo o una lesión en los músculos.

Dolor referido: es un tipo de dolor que se siente en una parte del cuerpo diferente a su origen. Puede ser causado por un problema en un órgano interno, como el corazón o los riñones.

Dolor psicológico: es un tipo de dolor que se relaciona con problemas emocionales o mentales, como el estrés o la ansiedad. (Woolf, 2010)

Por lo tanto, el dolor no es un fenómeno pasivo de transferencia de información desde la periferia a la corteza, sino un proceso activo generado en parte en la periferia y en parte en el SNC, y susceptible de cambios en relación a múltiples modificaciones neuronales. Desde un punto de vista clínico, el sistema somatosensorial alerta al individuo frente a un daño real o potencial. (MARTA FERRANDIZ 2007)

4.1 Tipos de dolor

El dolor agudo es la consecuencia inmediata de la activación de los sistemas nociceptivos por una noxa. Tiene función de protección biológica (alarma a nivel del tejido lesionado). Los síntomas psicológicos son escasos y limitados a una ansiedad leve. Es un dolor de naturaleza nociceptiva y aparece por la estimulación química, mecánica o térmica de nociceptores específicos.

El dolor crónico, no posee una función protectora, y más que un síntoma se considera como una enfermedad. Es un dolor persistente que puede autoperpetuarse por un tiempo prolongado después de una lesión, e incluso, en ausencia de ella. Suele ser refractario a los tratamientos y se asocia a importantes síntomas psicológicos.

El dolor nociceptivo es el causado por la activación de los receptores del dolor (nociceptores) en respuesta a un estímulo (lesión, inflamación, infección, enfermedad). Como ocurre con el dolor agudo, suele haber una relación directa entre su intensidad y la gravedad de la agresión. Un dolor de alto umbral que solo se activa en presencia de estímulos intensos. El aparato neurobiológico que genera el dolor nociceptivo evolucionó a partir de la capacidad de incluso el más primitivo de los sistemas nerviosos para señalar daño tisular inminente o real por estímulos ambientales.

El dolor inflamatorio está asociado con el daño tisular y la infiltración de células inmunitarias y puede promover la reparación al causar hipersensibilidad al dolor hasta que se produce la curación. Si bien este dolor es adaptativo, aún debe reducirse en pacientes con inflamación continua, como con artritis reumatoide o en casos de lesiones graves o extensas. Su principal característica por ser agudo, intenso, continuo y a menudo acompañado de enrojecimiento, calor, hinchazón y sensibilidad al tacto. Por otro lado si la lesión perdura en el tiempo, se producen cambios bioquímicos que repercuten en una mayor hipersensibilidad de las neuronas que detectan el dolor. Este tipo de mal suele venir asociado a cuadros de artrosis, artritis y dolor de espalda.

El dolor neuropático se origina por un estímulo directo del sistema nervioso central (SNC) o una lesión de los nervios periféricos. No se relaciona, por tanto, con la estimulación de las terminales sensitivas y suele acompañarse de disestesias y parestesias. Es habitual que sea desproporcionado para el estímulo que lo produce (hiperalgesia) y que aparezca sin que haya una causa identificable. Se considera un dolor patológico, ya que no tiene ninguna utilidad como mecanismo de alerta o defensa. Por lo tanto es en gran medida la consecuencia de señales sensoriales amplificadas en el sistema nervioso central y es un dolor de bajo umbral. Por analogía, si el dolor fuera u

Una gran diferencia entre el dolor inflamatorio y patológico es que el primero representa hipersensibilidad en reacción a una patología periférica definida, mientras que el segundo es el resultado de un procesamiento neural alterado. Sin embargo, definir cuáles son los cambios en el sistema, cuándo y cómo ocurren, y qué mecanismos moleculares son responsables brinda una enorme oportunidad para la intervención terapéutica, aunque esto aún no ha sido

aprovechado con éxito por la industria farmacéutica. (Burgess G, Williams D 2010), (Clifford J. Woolf 2010)

5 Tratamiento de la inflamación y dolor

- Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs): Estos incluyen medicamentos como el ibuprofeno y el naproxeno, que funcionan bloqueando la síntesis de prostaglandinas, sustancias químicas que contribuyen a la inflamación y el dolor.
- Corticosteroides: Estos medicamentos, como el prednisona, son esteroides sintéticos que actúan reduciendo la inflamación al inhibir la producción de ciertas citoquinas.
- Inhibidores de COX-2: Estos medicamentos, como el celecoxib, también bloquean la producción de prostaglandinas, pero a diferencia de AINEs, tienen un menor riesgo de efectos secundarios gastrointestinales.
- Analgésicos: Estos medicamentos, como el paracetamol y los opiáceos, se utilizan para aliviar el dolor y pueden ser útiles en combinación con antiinflamatorios.
- Inhibidores del TNF-alfa: Estos medicamentos, como el infliximab y el adalimumab, se utilizan para tratar enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis reumatoide y la enfermedad inflamatoria intestinal.
- Interleucinas inhibidores: son otra clase de medicamentos biotecnológicos que se utilizan para tratar enfermedades inflamatorias crónicas como la psoriasis y la artritis reumatoide.

Los antiinflamatorios no esteroideos o también conocidos como AINES son un grupo químicamente heterogéneo de fármacos que además de sus propiedades antiinflamatorias actúan también como analgésicos y antipiréticos, por este motivo constituyen la primera línea en el tratamiento farmacológico del dolor y son el grupo de fármacos de mayor consumo empleándose tanto solos como combinados con otros analgésicos. Sin embargo, con el avance del conocimiento científico, la clasificación también se ha modificado en función de su selectividad para inhibir las enzimas ciclooxigenasa/prostaglandina-endoperoxidasa sintasa (PGHS), que son los principales objetivos de estos fármacos. Además, también se ha formulado un sistema de clasificación de los AINE en función de su vida media. Sin embargo, a pesar de la diversidad, sus funciones son relativamente similares. Los AINE se utilizan principalmente para el tratamiento de pacientes que padecen dolor y afecciones inflamatorias, ya que actúan aliviando el dolor por su acción analgésica, reducen la inflamación por su acción antiinflamatoria y disminuyen la fiebre por su acción antipirética, en comparación de los antiinflamatorios esteroideos los efectos secundarios más comunes de los AINE son de tipo gastrointestinal como puede ser malestar estomacal, acidez estomacal y náuseas, esto se debe a que el principal mecanismo de acción de los AINE es la inhibición competitiva y reversible de la enzima ciclooxigenasa (COX), encargada de la síntesis de prostaglandinas (Pgs) las cuales intervienen de manera específica en los procesos inflamatorios como mediadores biológicos, a la vez que ejercen, entre otras, actividades biológicas en la zona gastrointestinal que van a permitir la citoprotección. Esta inhibición competitiva y reversible de la enzima ciclooxigenasa (COX), encargada de la síntesis de Pgs que cataboliza el paso del ácido araquidónico de las membranas celulares a

endoperóxidos cíclicos (Pgs y tromboxanos), de esta manera, los AINE no sólo inhiben la acción proinflamatoria de las Pgs (efecto farmacológico buscado), sino que alteran de forma importante la citoprotección gastrointestinal mediada por las Pgs y dan lugar a la aparición de reacciones adversas en el tubo digestivo (David, P; Bailey, PJ; Glodenberg, MM 1984, Sebastián, J. 2002; Dinarello C. 2010; Bindu, S., Mazumder, S., & Bandyopadhyay, U. 2020).

6 Productos naturales

La medicina natural es una alternativa para la cura de diferentes enfermedades, aún no tiene suficiente auge para su consumo como la medicina alópata, debido a múltiples factores, uno de los más importantes es la falta de la investigación fitoquímica y farmacológica de las plantas tradicionalmente usadas, por esta razón, es necesario que los consumidores dispongan de información que les permitan llevar tratamientos adecuados, seguros y eficaces, así mismo el uso alternativo de productos naturales y en específico de plantas medicinales en la terapia contra la inflamación y el dolor que puedan reducir el proceso sintomático y patológico y en algunos casos resolverlo sin llegar a producir efectos indeseados

Los productos naturales pueden contribuir a la búsqueda de nuevos medicamentos de tres modos diferentes:

- Como nuevos medicamentos que pueden ser empleadas sin modificarse.
- Proporcionando componentes básicos químicos para sintetizar moléculas más complejas.
- Como nuevos modos de acción farmacológica que permiten la síntesis completa de análogos nuevos. (Gray. IA, Lafit Z, Sarker SD 2006)

En los últimos años ha aumentado el interés por el uso de terapias alternativas y el uso de productos naturales en el tratamiento de diversos padecimientos, debido a que desde la antigüedad se conocen las propiedades curativas de las plantas en los tratamientos de muchas afecciones médicas las cuales han sido utilizadas como extractos de plantas. Las plantas han demostrado un gran valor como fuente de compuestos con potente actividad biológica, y en la actualidad continúan representando un grupo importante de estudio para identificar nuevos compuestos de interés farmacéutico (Thomford et al., 2018).

De esta manera las plantas se utilizan en 2 diferentes formas que van desde decocciones e infusiones en zonas rurales y países en vía de desarrollo hasta productos fitoterapéuticos, principios activos y medicamentos en países desarrollados. Esto ha llevado a una expansión en el área fitoquímica y por lo tanto a la utilización de extractos, producción y aislamiento de sustancias puras naturales, extraídos de plantas medicinales cuyo mercado aumentó en un 2000%, desde 1980 en Europa, Norte América y Asia, en parte debido a la creciente demanda y preferencia de productos de origen natural (Sharapin 2002; Calixto 2000).

7 Metabolitos secundarios

Los principios activos, generalmente son producto del metabolismo secundario de la planta, algunos actúan como antibióticos, antisépticos, sedantes, analgésicos, otros operan como estimulantes sobre el sistema nervioso, tienen actividad neuromuscular o muscular, entre otros efectos. Actualmente se tienen desarrollados una serie de métodos para la detección preliminar de los diferentes constituyentes químicos de una planta, consistente en una reacción química que produce alteración rápida en la estructura molecular del compuesto como la modificación de un grupo funcional, la apertura de un sistema anular o la formación de un complejo, lo cual da por resultado una manifestación sensible como el cambio de color, la formación de un precipitado o el desprendimiento de un gas, lo que se conoce como una prueba fitoquímica preliminar. (Carlos Andrés, Jorge Parra, Luis Enrique 2014)

El desarrollo de la planta y la cantidad de metabolitos secundarios son determinados por factores ambientales. Los factores se pueden dividir en dos grandes grupos: Físicoquímicos o abióticos y biológico: Factores físicoquímicos o abióticos. Los factores físicoquímicos que afectan una planta medicinal son: El clima, determinado principalmente por la precipitación (lluvia, granizo, nieve y niebla); la temperatura; la luz; el viento; la atmósfera; el suelo (incluyendo el sustrato geológico); la topografía; latitud; longitud y presión atmosférica.

Los avances en comprensión de fitoquímica están relacionados directamente con la explotación acertada de técnicas conocidas y el desarrollo continuo de nuevas técnicas. La investigación fitoquímica de una planta puede implicar lo siguiente: identificación y extracción del material vegetal; separación y aislamiento de los componentes de caracterización de interés de los compuestos aislados y evaluaciones cuantitativas. (Harbone JB , Gilbert JC, Martin SF 1998)

8 Genero Verbenaceae (*officinalis*)

Se refiere a un grupo de plantas pertenecientes a la familia Verbenaceae. Estas plantas son conocidas como verbena o hierba sagrada y se caracterizan por tener flores pequeñas y delgadas en racimos, hojas opuestas y un tallo delgado y ramificado. Muchas especies de Verbena son perennes, pero algunas son anuales o bienales. Son comunes en ambientes húmedos, como praderas, riberas de ríos y ciénagas, y también se cultivan como plantas ornamentales en jardines y parques. Algunos estudios sugieren que hay alrededor de 250 especies, en general, esta planta está distribuida en las regiones templadas y tropicales del mundo, las especies con una mayor presencia se encuentran en América del Norte, Sudamérica y África. Algunas de las aplicaciones más comunes son:

Estimulante y calmante del sistema nervioso: se ha utilizado para tratar problemas de insomnio, ansiedad, depresión y estrés debido a sus propiedades relajantes y sedantes.

Digestivo: se ha utilizado para aliviar problemas estomacales como indigestión, flatulencia y dolores abdominales.

Diurético: se ha utilizado para aumentar la producción de orina y ayudar en la eliminación de líquidos del cuerpo.

Antiinflamatorio y analgésico: se ha utilizado para tratar dolores reumáticos, ciáticos, dolores menstruales y otras afecciones inflamatorias. (Gloria Patricia, María Clara 2008)

8.1 *Verbena officinalis*

También conocida como hierba de la alegría o hierba luisa, es una planta herbácea perenne perteneciente a la familia Verbenaceae. Originaria de Europa, Asia y América del Norte, y se cultiva ampliamente en todo el mundo. La planta tiene tallos delgados y ramificados con hojas opuestas y pequeñas, flores azules, moradas o rosadas agrupadas en racimos terminales.

La planta tiene una larga historia de uso medicinal en la medicina tradicional. Se ha utilizado para tratar una variedad de afecciones, incluyendo dolores de cabeza, dolores menstruales, insomnio, ansiedad, y para reducir la inflamación y aliviar el dolor en enfermedades reumáticas y artritis.

Los compuestos químicos presentes en la planta incluyen flavonoides, ácidos triterpénicos, taninos y aceites esenciales. Los estudios in vitro y en animales han demostrado que los extractos de *Verbena officinalis* tienen propiedades antiinflamatorias y analgésicas. Además, se ha observado que los compuestos presentes en la planta tienen actividad antioxidante, antiviral y antibacteriano. (Gloria Patricia, María Clara 2008), el Verbenalol produce este efecto, además de analgésico local y sedante. (García Barriga H., 1975; Gupta M., 1995; Germosén-Robineau L., 1995; Cáceres A., 1996).

9 Hipótesis

El extracto etanólico de *Verbena officinalis* tiene propiedades antiinflamatorias y antinociceptivas significativas en modelos animales de inflamación y dolor, debido a la presencia de compuestos antiinflamatorios y analgésicos, tales como los flavonoides y ácidos triterpénicos, los cuales actúan mediante la inhibición de diferentes cascadas inflamatorias.

10 Objetivos

Objetivo General

- Evaluar el efecto antiinflamatorio y antinociceptivo del extracto etanólico de *Verbena officinalis*.

Objetivos específicos

- Obtener el extracto etanólico de *Verbena officinalis* por maceración en etanol.
- Evaluar el efecto de antiinflamatorio en el modelo de edema auricular inducido con aceite de croton en ratones CD-1.
- Evaluar el efecto antinociceptivo en el modelo de formalina al 1% en ratas Wistar.
- Determinar el tipo de compuestos químicos presentes en la *Verbena officinalis*

11 Materiales y métodos

Materia vegetal

Verbena officinalis se colecto en el municipio de pueblo nuevo estado de México.

11.1 Obtención de extracto etanólico

Se pesaron 300 g de planta seca y molida, en un matraz bola de 5 L, se agregó 2 L de disolvente (etanol al 98%) dejándose en maceración durante 7 días a temperatura ambiente para su extracción, posteriormente la mezcla se filtró y se recuperó el disolvente por medio de un rotavapor a presión reducida, el residuo se colocó en un desecador para la eliminación total del disolvente.

11.2 Evaluación farmacológica de la actividad antiinflamatoria Edema auricular en el modelo antiinflamatorio

Se utilizaron ratones macho CD-1 de un peso entre (20-25 g), (8-10) semanas de edad. Para inducir inflamación se utilizó una solución de aceite de croton al 5 % v/v, y con una micropipeta se aplicaron 10 µL de solución aceite de croton disuelto en acetona en ambas caras de la oreja derecha de 6 grupos de ratones, 30 minutos después se administró vía tópica en ambas caras de la oreja derecha de los ratones: 2 mg/oreja de indometacina, las dosis crecientes del extracto etanólico a evaluar (1.77, 3.16, 5.62 mg/oreja) y el resto de los grupos recibió el respectivo disolvente como vehículo. Cuatro horas después de haber administrado el aceite de croton se sacrificaron los animales por dislocación cervical y se horadaron ambas orejas con un sacabocados de 3 mm de diámetro y se colocaron dentro de tubos eppendorf previamente pesados. La inflamación de los grupos se determinó con la diferencia del peso entre la oreja con tratamiento y la oreja no tratada y se calculó el porcentaje de inflamación de los

lotes que recibieron el tratamiento de acuerdo con lo descrito por Young y col., 1983, Williamson y col., 1996.

% de inhibición

$$= \left(\frac{(\bar{x} \text{ diferencia control } (-) - (\text{diferencia gpo tratado}))}{\bar{x} \text{ diferencia control } (-)} \right) * 100$$

Se consideró como actividad antiinflamatoria moderada la inhibición del edema del 35-65% y como buen efecto antiinflamatorio un valor mayor al 65% (González et al., 2011).

11.3 Edema plantar inducido por carragenina en ratón CD1

Se emplearon ratones CD1 de un peso entre (20-25 g), (8-10) semanas de edad. Se administró por vía oral un volumen de 300 µL de los tratamientos a evaluar a los 3 grupos de 4 ratones cada uno, indometacina (10 mg/kg), el extracto (5.62 mg/kg) y vehículo (solución salina más tween 2 %) y 30 min después se administraron 30 µL de una solución de carragenina al 1 % como agente inductor de inflamación en solución salina en la aponeurosis plantar de la pata derecha trasera, y se realizó la evaluación del efecto antiinflamatorio a los 30, 60, 90, 120, 180, 240 y 300 minutos. Tras la aplicación del irritante, se realizaron 3 mediciones del desplazamiento de volumen que producen las patas de los animales en un pletismómetro digital. Se calculó la diferencia de desplazamientos entre la pata derecha irritada (tratada) con la izquierda (no tratada). Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición del edema aplicando la fórmula:

$$\text{Inhibición (\%)} = (\text{Ct} - \text{C0}) \text{ control} - (\text{Ct} - \text{C0}) \text{ tratado} / (\text{Ct} - \text{C0}) \text{ control}$$

Donde Ct es el volumen desplazado en un tiempo t después de la administración de la carragenina y C0 es el volumen desplazado antes de la administración de la carragenina

Se consideró como actividad antiinflamatoria la inhibición del edema del 50 al 65 % y como buen efecto antiinflamatorio un valor mayor de 65 %. (Velázquez y col., 2014; Williamson y col., 1996.) Winter CA, Risley EA, Nuss GW (1962)

11.4 Evaluación farmacológica de la actividad antinociceptiva

Prueba de formalina al 1 % en ratas Wistar

Se utilizaron ratas Wistar de un peso de entre 180-200 g. Se colocaron las ratas en una cámara de observación de acrílico de 20 cm de diámetro y 30 cm de altura durante 30 minutos, para que se aclimaten a su entorno; 10 minutos antes de administrar el agente inductor de dolor nociceptivo se administraron 50 µL de las sustancias a evaluar, diclofenaco (100 µg/pata), el extracto a evaluar fue a dosis crecientes (56.23, 177.8, 562.3 µg/pata) y el vehículo (solución salina + DMSO 5%) por medio de una inyección subcutánea en el dorso de la pata trasera derecha, una vez pasando este tiempo se administraron 50 µL de una solución de formaldehído al 1 % por medio de una inyección subcutánea en la misma pata

y se regresó al animal a la cámara para observar la conducta nociceptiva. La conducta nociceptiva se cuantificó como el número de sacudidas de la pata inyectada durante períodos de 1 minuto cada 5 minutos, hasta 60 minutos después de la inyección (las sacudidas de la pata se caracterizan como una retirada rápida y breve o como una flexión de la pata inyectada). La actividad antinociceptiva se consideró como una disminución en el número de sacudidas (Ortiz M. & Castañeda G. 2008. Tjølsen A. y col., 1992)

11.5 Evaluación de Pruebas fitoquímicas

El análisis fitoquímico preliminar se realizó siguiendo una metodología basada en los protocolos propuestos por; Chávez (1997) Calderón (1963), Domínguez (1985), Bilbao (1997) la guía de farmacognosia de la universidad de Antioquia (2013, 2009) y la guía de fitoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana. Se realizaron pruebas cualitativas en tubo de ensayo para los siguientes grupos de metabolitos secundarios: Flavonoides, Alcaloides, Saponinas, Cumarinas, Lactonas, Quinonas, taninos, esteroles y triterpenos.

11.6 Análisis estadístico

Los valores obtenidos en la evaluación del extracto etanólico se expresan como media \pm error estándar de la media (SEM). Los datos fueron analizados por medio de un análisis de varianza (ANOVA) por medio del programa estadístico Prism – GraphPad, Los resultados con una $p < 0.05$ se consideran estadísticamente significativos.

12 Resultados y discusión

12.1 Obtención de los extractos

A partir de 300 g de material vegetal seco y molido de *Verbena officinalis* (hojas, flores, y tallo) se obtuvieron 13.71 g de extracto etanólico con un rendimiento de 4.57 %.

12.2 Efecto antiinflamatorio (edema auricular)

En la figura 1 se muestra los datos obtenidos en la evaluación del efecto antiinflamatorio del extracto etanólico de *Verbena officinalis* en el modelo de edema auricular inducido con aceite de crotón.

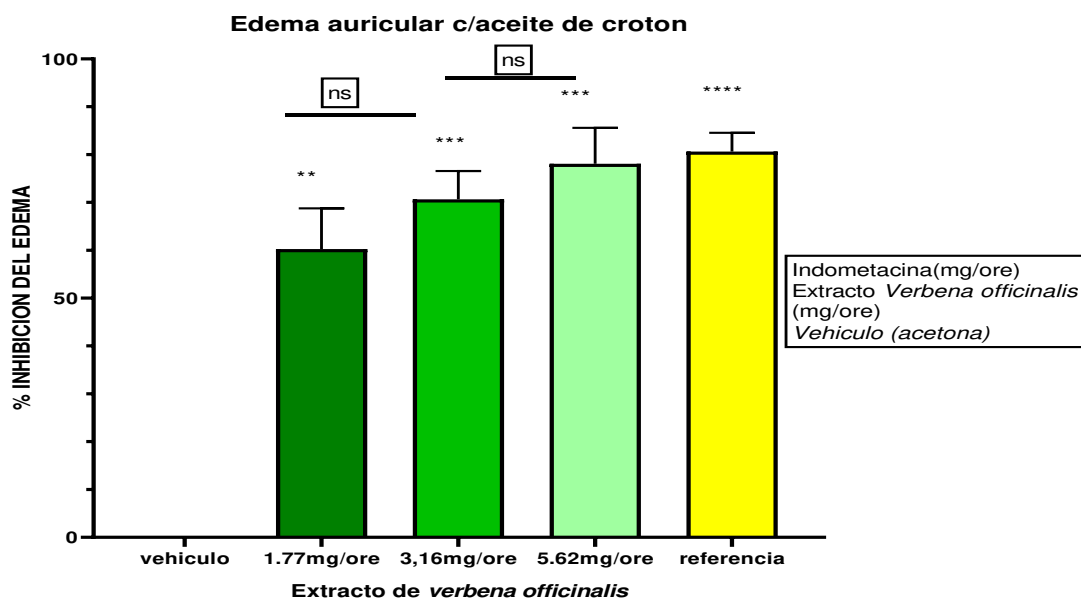


Fig. 1 Efecto antiinflamatorio del extracto etanólico e indometacina en el modelo del edema auricular con aceite de croton en ratones; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ con respecto al grupo vehículo; los datos se muestran como la media \pm error estándar, $n = 6$, ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples Tukey

En la evaluación del efecto antiinflamatorio, las orejas de los animales que recibieron únicamente el aceite de croton (control negativo) desarrollaron un edema de 16.35 ± 0.54 mg 4 horas después de la administración del aceite, mientras que los animales que recibieron vehículo (acetona) desarrollaron un edema 14.72 ± 0.17 muy similar al grupo control negativo, por lo cual se puede observar que la acetona no interfiere en la formación del edema auricular, por otro lado, el grupo que recibió indometacina (2 mg/oreja) desarrollo un edema de 6.85 ± 1.32 mg con un porcentaje de inhibición del 80.65 ± 3.9 % mostrando el efecto antiinflamatorio del fármaco de referencia para la inhibición del proceso inflamatorio causado por el aceite de croton en el edema auricular.

Los grupos tratados con el extracto etanólico administrados por vía tópica de *Verbena officinalis* a las dosis de 1.77, 3.16 y 5.62 mg/oreja, mostraron un desarrollo del edema de 6.50 ± 1.39 , 4.80 ± 0.97 , 3.58 ± 1.22 con un porcentaje de inhibición del edema de 60.24 ± 8.51 , 70.64 ± 5.94 , 78.08 ± 7.52 % respectivamente; Tomando en cuenta estos resultados (figura 1) podemos decir que el extracto vía tópica del extracto etanólico tiene actividad antiinflamatoria.

El modelo de edema auricular inducido por aceite de croton, es un modelo de inflamación local o tópica ampliamente utilizado para evaluar la actividad antiinflamatoria en extractos y fracciones de productos naturales. Se utiliza farmacológicamente para provocar una inflamación localizada en las orejas de los animales de laboratorio, inflamación que responde a los antiinflamatorios no esteroideos. (Hetter, 2000), por lo que se liberan mediadores de tipo eicosanoides y se induce la desgranulación de mastocitos, por lo que los compuestos inhibidores de la biosíntesis y/o liberación de prostaglandinas y

leucotrienos o los fármacos antagonistas de sus respectivos receptores, pueden atenuar el proceso inflamatorio inducido (Núñez et al., 2007).

Así mismo la indometacina empleada como control positivo también disminuyó significativamente el edema auricular inducido por aceite de croton, pertenece al grupo de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) actuando sobre la Inhibición competitiva y reversible de la enzima ciclooxigenasa, la cual al ser bloqueada se inhibe la cascada de ácido araquidónico encargada de la síntesis de prostaglandinas (Pgs) las cuales están relacionadas con los procesos inflamatorios, este fármaco es mayormente utilizado en este modelo ya que como se reporta en la literatura es el fármaco que presenta un mayor porcentaje de inhibición del edema.

Sí, los resultados obtenidos en los porcentajes de inhibición son altos, indican que el extracto es capaz de reducir significativamente la inflamación en el modelo edema auricular utilizado, sin embargo se sugiere evaluar el modelo edema plantar inducido por carragenina al 1% vía oral y poder determinar mejor el efecto antiinflamatorio del extracto etanólico de *Verbena officinalis*.

Es importante tener en cuenta que el efecto antiinflamatorio se puede evaluar en modelos diferentes, ya sea por vía tópica u oral.

12.3 Efecto antiinflamatorio (Edema plantar inducido por carragenina)

En el modelo de carragenina en ratones CD-1, se evaluó solo una dosis como se muestra en la Figura 2, en el modelo se mide el grado de inflamación de las patas a través de un transductor que registra las diferencias de nivel del fluido por medio de electrodos (pletismómetro), con ayuda de esto se realizó un curso temporal en el que se observa el volumen del edema generado con respecto al tiempo para los grupos de carragenina 1%, vehículo (Sol. Salina+tween 2%), indometacina (10 mg/kg) y la dosis del extracto etanólico de *Verbena officinalis* (56.23 mg/kg).

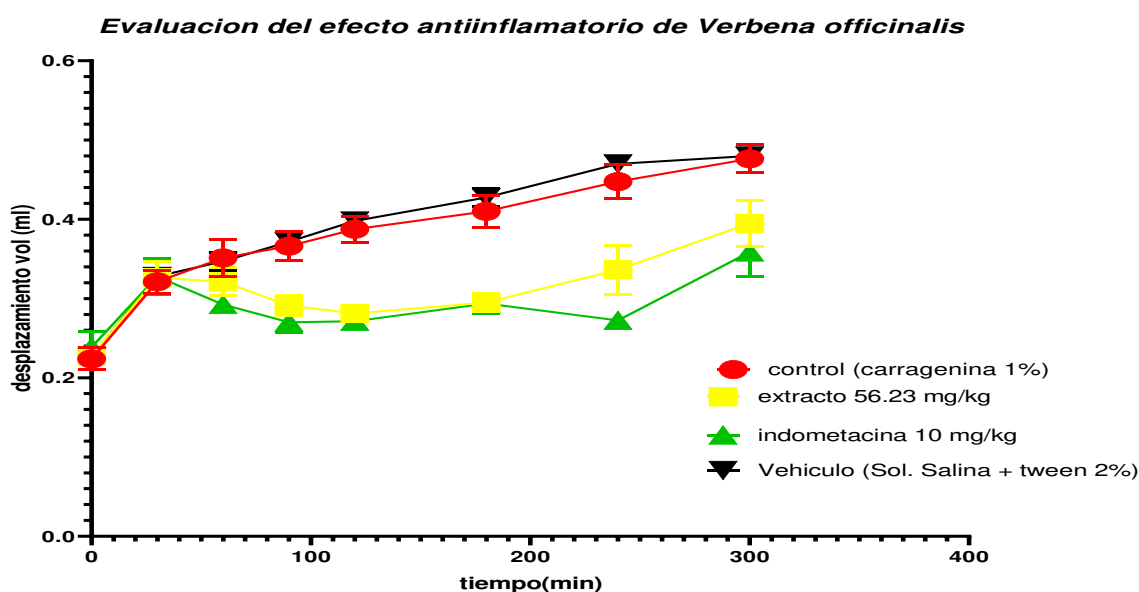


Figura 2. Curso temporal del efecto antiinflamatorio del extracto etanólico de *Verbena officinalis*, indometacina y carragenina.

Considerando los resultados obtenidos con el curso temporal, se evaluó el efecto global de los tratamientos y se realizó el cálculo para obtener los porcentajes de inhibición del edema (Figura 3).

El extracto etanólico se administró vía oral a una sola dosis (56.23 mg/kg), mostrando una Inhibición de edema de 48.85 ± 7.87 %, mientras que el grupo de indometacina un porcentaje de inhibición de 68.25 % y con una estadística significativa entre estos grupos observados en el curso temporal (fig 2), así mismo podemos decir que el extracto etanólico de *V. officinalis* tiene efecto antiinflamatorio al ser utilizado por administración vía oral, esto se puede deber a que después de ser administrado y metabolizado el extracto se activan los metabolitos responsables del efecto antiinflamatorio.

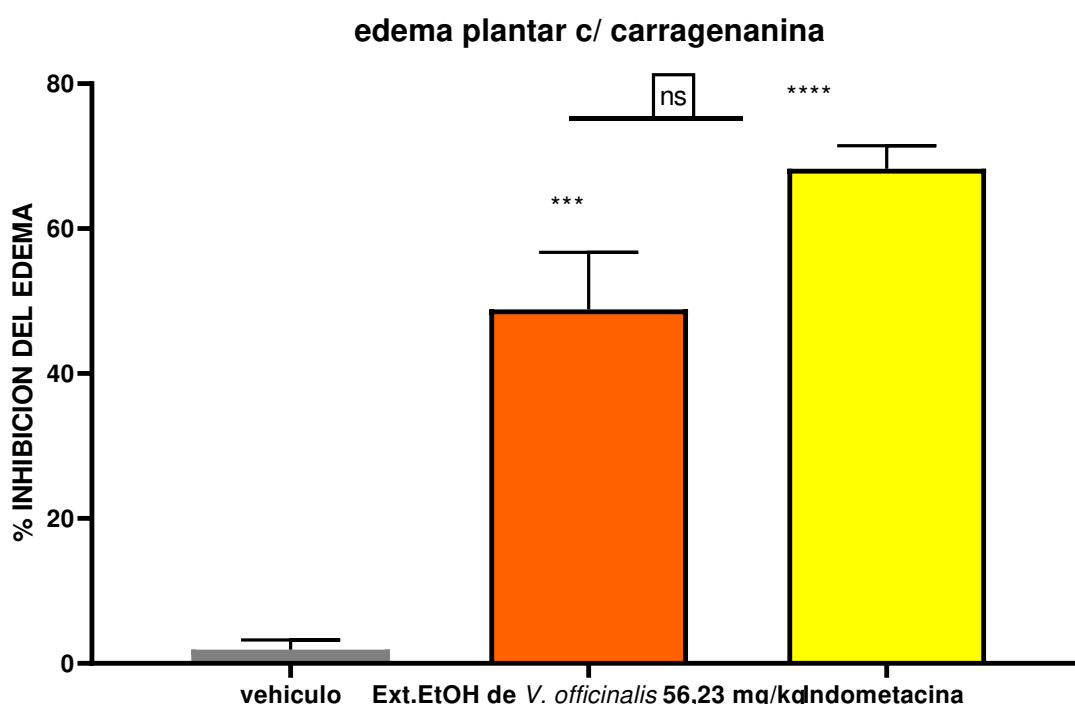


Figura 3. Porcentaje de inhibición del extracto *Verbena officinalis*, Indometacina y vehículo en el modelo edema plantar inducido por carragenina : **** $p < 0.0001$ la comparación se realizó con respecto al vehículo (n=3).

La carragenina es considerado un agente flogístico. En ratones, se ha descrito que durante las primeras tres horas después de la administración vía plantar de la carragenina tipo lambda se produce un comportamiento bifásico en la formación del edema plantar. En la primera fase, se registra un incremento gradual del edema en el transcurso de la primera hora, seguido de una segunda fase que dura hasta tres horas después de la administración de la carragenina, y que se caracteriza por un incremento abrupto del edema a partir de los 90 minutos. (Vinegar, Schreiber, H.1969) (Winter CA, Risley EA, Nuss GW 1962)

La respuesta inflamatoria generalmente se cuantifica por el aumento del tamaño de la pata (edema), que es máximo alrededor de las 5 h y la respuesta es modulada por inhibidores de moléculas específicas dentro de la cascada

inflamatoria. El fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) indometacina es un ejemplo clínicamente útil como referencia debido a que es inhibidor de las ciclooxigenasas, por lo que se bloquea la cascada de ácido araquidónico disminuyendo la formación de prostaglandinas las cuales intervienen en los procesos inflamatorios (Sebastián, J. 2002; del Arco, J. 2015).

Se procedió a realizar otro modelo diferente para evaluar el efecto antinociceptivo del extracto etanólico, esto debido a que la inflamación tiene mecanismos moleculares que la vinculan con el dolor, esto es desencadenado por lesiones tisulares que dan lugar a una respuesta inflamatoria a través de la transducción en señales eléctricas y estos estímulos nocivos son detectados por las terminaciones nerviosas (nociceptores) los cuales responden a los estímulos nociceptivos, por lo que requiere el modelo de formalina al 1% utilizada para medir la nocicepción (Frias, B., & Merighi, A. 2016; Woolf, C. 2010).

12.4 Efecto antinociceptivo (Formalina 1%)

Los resultados de la evaluación del extracto etanólico de *V. officinalis* en el modelo de formalina al 1% en rata, se puede observar en la (Figura 4). Después de la administración subcutánea de formalina al 1 % se produce una respuesta dolorosa caracterizada por la sacudida en el dorso de la pata posterior derecha inyectada, en este modelo de dolor, la disminución en el número de sacudidas se interpreta como efecto analgésico o antinociceptivo. En la fig. 4 se aprecia la respuesta bifásica comúnmente en la prueba (la primera fase de 0-10 min y la segunda fase de 11-60 min, después de la inyección del irritante) por lo que la respuesta nociceptiva se representó en un curso temporal .

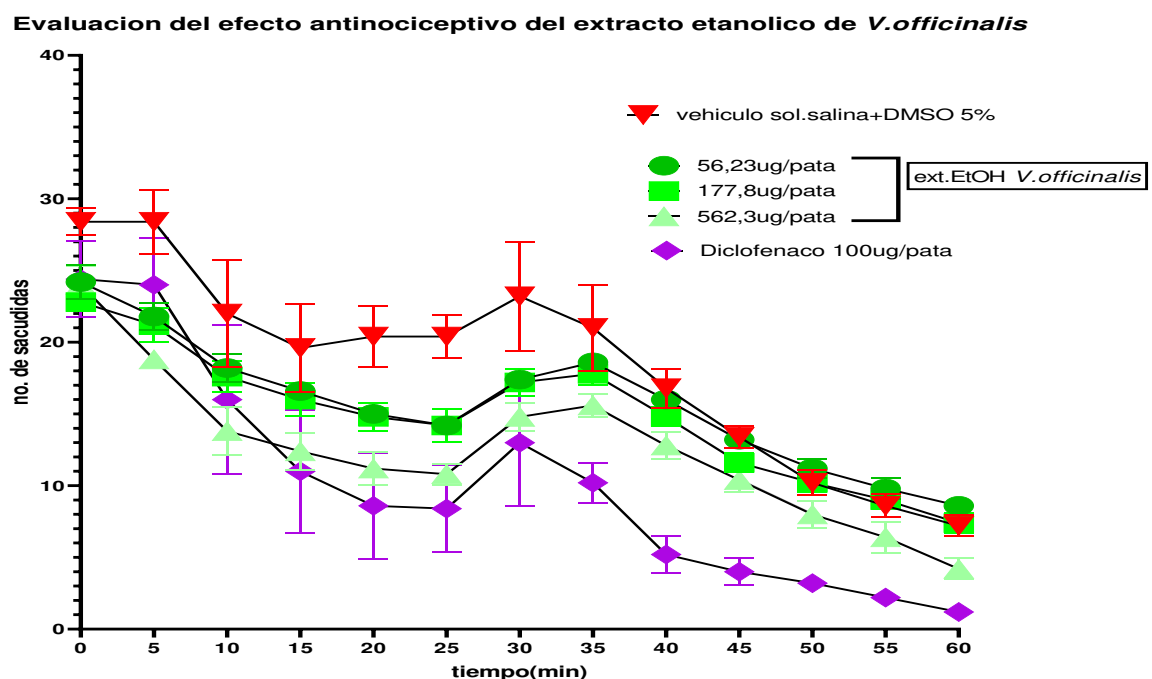


Figura 4. Curso temporal (efecto antinociceptivo) inducida por la inyección subplantar de formalina al 1 %, vehículo (sol.sal+DMSO 5%), diclofenaco (100ug/pata) y el extracto etanólico de *Verbena officinalis* en dosis crecientes (56.23, 177.8, 562.3µg/pata). Los datos se representan colmo la media ± el error estándar (n=5).

En la Fig 4, se muestran los resultados del curso temporal obtenidos del extracto etanólico de *Verbena officinalis* en dosis crecientes (56.23, 177.8, 562.3 µg/pata), grupo vehículo (sol,sal+DMSO 5%), diclofenaco (100ug/pata), en donde la administración local de diclofenaco disminuyó la respuesta en ambas fases de la prueba de formalina al 1% en comparación con el grupo vehículo, así mismo el extracto etanólico mostró una gran disminución del número de sacudidas similar al grupo de referencia(diclofenaco). El efecto antinociceptivo del extracto etanólico se observó con más claridad en mayor dosis 562.3µg/pata en comparación con la menor dosis 56.23 µg/pata, por lo que se determinó que el efecto antinociceptivo es dependiente de la dosis, conforme se incrementa la dosis mayor efecto.

Con los datos obtenidos del curso temporal se calculó el porcentaje de antinocicepcion de los tratamientos administrados mediante la fórmula reportada por Ortiz (2018), por lo que los resultados se muestran en la fig 5. La administración subcutánea de diclofenaco produjo efecto antinociceptivo en ambas fases del modelo, con un porcentaje de antinocicepcion del 30.22±5.57 % en la fase I y del 61.24±10.05 % en la fase II, por lo que el mayor efecto antinociceptivo del diclofenaco fue en la fase II.

Los resultados en la evaluación del extracto etanólico a dosis crecientes (56.23, 177.8, 562.3µg/pata), se obtuvo un porcentaje de antinocicepcion del 19.78±1.86, 22.76±2.51, 29.66±1.57 en la fase I respectivamente, mientras que en la fase II fue de 21,82±1.47, 25.03±2.50, 39.96±4.30 respectivamente; con los resultados obtenidos mostrados en la Fig 5 podemos decir que el extracto etanólico tiene actividad antinociceptiva en ambas fases del modelo, y su efecto es independiente de la dosis.

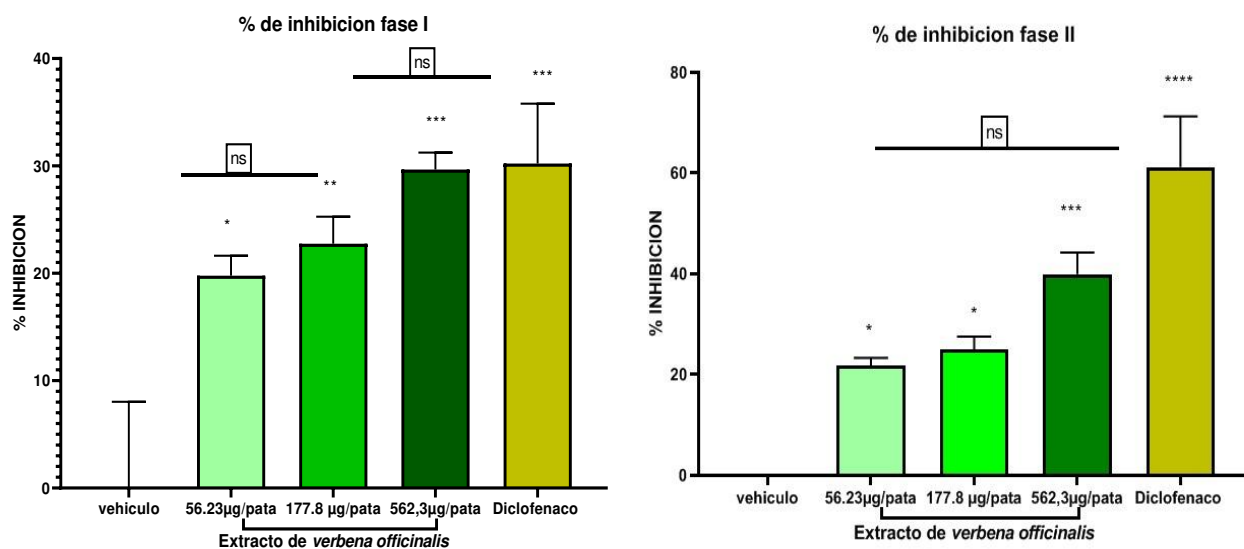


Figura 5. Efecto antinociceptivo del extracto etanólico de *Verbena officinalis* en dosis crecientes y grupos controles (formalina 1%, Diclofenaco y vehículo) (µg/pata). Fase I, dolor nociceptivo, Fase II, dolor inflamatorio: ****p<0.0001 la comparación se realizó con respecto al vehículo; (n=5), ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples (Tukey).

La respuesta a la formalina muestra una fase temprana y otra tardía. La fase temprana parece estar causada predominantemente por la activación de la fibra C debida al estímulo periférico, mientras que la fase tardía parece depender de la combinación de una reacción inflamatoria en el tejido periférico y cambios funcionales en la asta dorsal de la médula espinal. La prueba de la formalina es un modelo útil para el estudio del dolor (WeelerAceto et al., 1990). La conducta dolorosa después de la inyección intraplantar de formalina fue bifásica: la fase 1 inició inmediatamente después de la inyección del irritante (0-10 min), mientras la fase 2 comenzó después de los 10 minutos, con una respuesta máxima entre los 20-35 minutos. La fase 1 y 2, se consideran dolor neurogénico e inflamatorio, respectivamente. A la fecha, la evidencia experimental farmacológica y electrofisiológica, sugiere que la fase 1 es por una acción directa de la formalina sobre los nociceptores y la liberación inmediata de mediadores químicos. La fase 2 es el resultado de una combinación de eventos periféricos y centrales. Se ha descrito que hay cambios en la actividad neuronal en la asta dorsal de la médula espinal con evolución temporal similar a la conducta dolorosa observada.(Dickenson y Sullivan, 1987; Puig y Sorkin 1995). Sin embargo, se requiere del estímulo periférico para el desarrollo de la segunda fase y está asociado con la liberación de diferentes mediadores inflamatorios.

La administración de AINEs (diclofenaco) producen analgesia durante la fase 2 con poca o nada de efecto en la fase 1 (Shibata et al., 1989, Malmberg y Yaksh, 1992). Entonces, es posible asumir la participación de las PGs en la respuesta dolorosa de la fase 2. En general se acepta que las PGs son mediadores importantes en el proceso doloroso. En el caso del dolor inducido por inflamación, las PGs "sensibilizan" las terminales nerviosas periféricas localizadas en el sitio de la inflamación (Ferreira, 1972). Además, el estímulo inflamatorio periférico induce la liberación o síntesis de PGs en la médula espinal facilitando la transmisión de la respuesta dolorosa (Malmberg y Yaksh, 1995). Sin embargo, a la fecha existe controversia en torno a la participación de cada una de las COXs como responsable de la síntesis, tanto en la periferia como espinal.

Una vez comprobado el efecto antiinflamatorio y antinociceptivo del extracto etanólico de *Verbena officinalis* en modelos diferentes, se realizó un análisis fitoquímico para determinar la presencia de diferentes metabolitos secundarios, ya que se afirma que diferentes compuestos como flavonoides, alcaloides, saponinas, fenoles y taninos etc, son conocidos por tener propiedades antiinflamatorias y antinociceptivas. (César A Villena N , Jorge L Arroyo A, Domínguez, XA. (1973)

12.5 Análisis fitoquímico

En cuanto al análisis fitoquímico preliminar, se logró determinar la posible presencia de metabolitos secundarios presentes (tabla 1) en el extracto etanólico de *Verbena officinalis*, las pruebas se realizaron con los diferentes reactivos en tubos de ensayo con los diferentes controles de cada reactivo de acuerdo con la metodología reportado por Chávez (1997) Calderón (1963), Domínguez (1985), Bilbao (1997).

Informe del análisis fitoquímico de *Verbena officinalis*

Metabolitos	Reactivos	Resultado	control	resultado
1- Alcaloides	Dragendorff	(-)	cafeina	(+)
	Mayer	(-)		
	Wagner	(-)		
	Hager	(+)		
	Bertrand	(-)		
2- Fenoles y taninos	Fecl3	(+)	Acido galico	(+)
3- Flavonoides Compuestos fenolicos	Shinoda Fecl3	(-)	Quercetina	(-)
		(+)	vainillina	(+)
4- Saponinas	Rosenrhale Espuma	(+)	Acido tánico	(+)
		(-)	Agua destilada	(-)
5- Cumarinas	Hidróxido de sodio (NaOH)	(+)	cumarina	(+)
6- Azucares reductores lactonas	Balje	(+)	glucosa	(+)
	Fehling	(+)		
	Benedict	(+)		

Tabla 1. Determinación de las pruebas fitoquímicas preliminares con diferentes reactivos para la identificación de metabolitos secundarios.

Se realizaron pruebas cualitativas de tubo para identificar los principales metabolitos secundarios, como: flavonoides, alcaloides, triterpenos y esteroides, cumarinas, saponinas, lactonas, heterósidos cardiotónicos, taninos y fenoles.

Se sabe que los flavonoides y triterpenos contribuyen con el efecto antiinflamatorio debido a inhibición de la prostaglandina sintetasa, reduciendo el nivel de prostaglandinas en el proceso inflamatorio. Domínguez, XA. (1973). Los saponósidos (saponinas) son heterósidos cuya genina puede ser esteroídica (hespirostano o furostano) o triterpénica (oleonano, ursano, damarano); se conoce que las especies vegetales con saponinas y triterpenoides son antiinflamatorios. (César A Villena N , Jorge L Arroyo A)

Este estudio da una idea de los metabolitos secundarios que se podrían encontrar en esta especie, ayudando a buscar los principios activos presentes, tales como fenoles, taninos, alcaloides, triterpenos y esteroides, flavonoides; pueden estar relacionados con la actividad anti-inflamatoria encontrada entre otras, por lo que se reporta seguir investigando que otras propiedades tiene la planta. (Cabrera et al., 2012).

13 Conclusión

Los estudios iniciales sugieren que la planta *Verbena officinalis* posee propiedades antiinflamatorias y antinociceptivas, lo que refuerza su uso dentro de la medicina tradicional mexicana, por otro lado, se determinaron los posibles metabolitos responsables de las actividades evaluadas.

Se necesitan más estudios para encontrar al o los metabolitos responsables del efecto farmacológico.

14 Recomendaciones

Se recomienda continuar con el estudio del extracto etanólico de *Verbena officinalis* fraccionando el extracto en la búsqueda de los metabolitos con actividad antiinflamatoria y antinociceptiva.

15 Referencias

- Alfaro, R., & Davis, D. (2021). Diclofenac. In StatPearls. StatPearls Publishing.
- Vinegar, Schreiber, H. Biphasic development of carrageen in edema in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1969;166(1):99-103.
- Lopes-Martins R.A.B, D.H. Pegoraro, R. Woisky, et al. 2002. The anti-inflammatory and analgesic effects of a crude extract of *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae). *Phytomedicine.* 9: 245 – 248.
- Domínguez, XA. (1973). Métodos de investigación fitoquímica. 1ª. ed. LIMUSA, Mexico D.F. pp. 281
- Torres López, J. E., & Granados Soto, V. (2001). Participación de las ciclooxigenasa-1 en el dolor inflamatorio. *Universidad y Ciencia.*
- Gábor, M. (2003). Modelos de inflamación aguda en el oído. *Protocolos de inflamación,* 129-137.
- Gan TJ. Diclofenaco: una actualización sobre su mecanismo de acción y perfil de seguridad. *Curr Med Res Opin.* 2010 julio; 26 (7):1715-31
- García Rodríguez LA, Williams R, Derby LE, Dean AD, Jick H. Lesión hepática aguda asociada con fármacos antiinflamatorios no esteroideos y el papel de los factores de riesgo. *Arch Intern Med.* 14 de febrero de 1994; 154 (3):311-6.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN. Acute and chronic inflammation. En: Saunders (Elsevier). *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease.* 8th. ed. New York: McGraw-Hill Interamericana; 2007: p. 58-31
- Regal M, Borges A, Armas J, Alvarado M, Cedeño V, Cuesta J. Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares. *Rev Finlay.* 2015;5(1):47-62.

- Cervantes, R., Cervantes, A., & Presno J. (2014). Mecanismos de señalización involucrados en la resolución de la inflamación. *Gaceta Médica de México*. 150: 440-9
- García, L., Martínez, M. & González, H. (2001). Inflamación y dolor: cambios en el sistema nervioso periférico y central. *Revista MedUNAB*. vol. 4, No. 10,1-14
- García, P., (2008). INFLAMACIÓN. *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat*. Vol. 102, No. 1, 91-159. ISSN 1137-2141
- González, R., Martínez, M., García, E., & Guisado, R. (1994). El proceso inflamatorio.
- Dinarello C. (2010). Anti-inflammatory Agents: Present and Future. *Cell*, 140(6), 935–950. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.04>
- David, P; Bailey, PJ; Glodenberg, MM; Ford-Hutchinson, AW. The role of the arachidonic acid products in pain and inflammation. *Ann. Rev. Immunol*. 1984; 335 (2)
- Cook JM, Deem TL. Active participation of endothelial cells in inflammation. *J Leukoc Biol*. 2005;77(4):487-95
- Munford RS. Severe sepsis and septic shock: the role of gram-negative bacteremia. *Annu Rev Pathol*. 2006;1(1):467-96
- Arango Gutiérrez, Gloria Patricia; Vásquez Villegas, María Clara Efecto tóxico de *Verbena officinalis* (familia verbenaceae) en *Sitophilus granarius* (coleoptera: curculionidae) *Revista Lasallista de Investigación*, vol. 5, núm. 2, julio-diciembre, 2008, pp. 74-82
- Larsen, GL; Herison, PM. Mediators of inflammation. *Ann. Rev. Immunol*. 1983; 335 (1) 7.
- Male, DK; Champion, B; Cooke, A; Owen, M. Cell traffic and inflammation. En: *Advance Immunology*. 2ª ed. Ed Gower London-New York 1991
- Bindu, S., Mazumder, S., & Bandyopadhyay, U. (2020). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochemical pharmacology*, 180, 114-147. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114147>
- Sebastián, J. (2002). Gastropatía por AINE. Efectos adversos. *Farmacia profesional*, 16 (7), 48-53.
- Munjal, A., & Allam, A. (2021). Indomethacin. In *StatPearls*. StatPearls Publishing
- Lucas S. (2016). The Pharmacology of Indomethacin. *Headache*, 56(2), 436–446. <https://doi.org/10.1111/head.12769>
- Summ, O., & Evers, S. (2013). Mechanism of action of indomethacin in indomethacin-responsive headaches. *Current pain and headache reports*, 17(4), 327. <https://doi.org/10.1007/s11916-013-0327-x>

- Edwin Enciso· Jorge Arroyo(2011)Efecto antiinflamatorio y antioxidante de los flavonoides de las hojas de *Jungia rugosa* Less (matico de puna) en un modelo experimental en ratas
- Núñez, Y., Montero, C., Agüero, S. & Muñoz, A. (2007). Efecto Antiinflamatorio Preclínico del Polvo Seco de Caléndula officinalis. Latin American Journal of Pharmacy, 26(4), 548-552. ISSN 0326-2383
-
- Bruneton J.: Farmacognosia Fitoquímica – plantas medicinales. 2a edición. Editorial ACRIBIA. Zaragoza España. (2001)
- Harbone JB. Phytochemical Methods. London. 3° ed. Chapman & Hall 1998:1-11. 19.
- Gilbert JC, Martin SF. Experimental Organic Chemistry. Florida. 2° ed. Saunders College Publishing. 1998: 156.
- Gray. IA, Lafit Z, Sarker SD. Natural Products Isolation. New Jersey. 2°ed. Human Press. 2006:1-73.
- Thomford N., Senthebane D., Rowe A., Munro D., Seele P., Maroyi A., & Dzobo, K. (2018). Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. International journal of molecular sciences, 19(6), 1578.
- Woolf, C. (2010). What is this thing called pain? The Journal of Clinical Investigation, 3742-3744.
- Woolf, C., (2010). What is this thing called pain?. The Journal of clinical investigation, 120(11), 3742–3744. <https://doi.org/10.1172/JCI45178>
- Burgess G, Williams D. El descubrimiento y desarrollo de analgésicos: nuevos mecanismos, nuevas modalidades. *J Clin Invest.* 2010;120(11):3753–3759.
- Torres López, J. E., & Granados Soto, V. (2001). Participación de las ciclooxigenasa-1 en el dolor inflamatorio. Universidad y Ciencia.
- FERREIRA, S.H., 1972. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nature.* 240: 200-203, 1972.
- WEELER-ACETO H, F. PORRECA and A. COWAN A, 1990. The paw formalin test: comparison of noxious agents. *Pain,* 40: 229-238
- DICKENSON, H. and A.F. SULLIVAN, 1987. Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurones in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin. *Pain,* 30: 349-360.
- TORRES-LÓPEZ, J.E., V. GRANADOS-SOTO y F.J. LÓPEZ-MUÑOZ, 1994. Evaluación del curso temporal del efecto antinociceptivo del diclofenac con el modelo de disfunción inducida por dolor en la rata. *Universidad y Ciencia.* 11: 125-131.
- MALBERNG, A.B. and T.L. YAKSH, 1992. Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. *J. Pharmacol, Exp, Ther.* 263: 136-146.
- MALMBERG, A.B. and T.L. YAKSH, 1995. Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E2 and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. *J Neurosci.*15: 2768-76.

- Frias, B., & Merighi, A. (2016). Capsaicin, Nociception and Pain. *Molecules* (Basel, Switzerland), 21(6), 797. <https://doi.org/10.3390/molecules21060797>
- Winter, C.A., E.A. Risley & G.W. Nuss (1962) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111: 544-7. 3.
- Ferreira, S.H. (1979) *J. Pharm Pharmacol.* 31: 648
- Akihisa, T., K. Yasukawa, H., Oinuma, Y. Kasahara, S. Yamanouchi, M. Takido, K. Kumaki & T. Tamura (1996) *Phytochemistry* 43: 1255- 60.
- Regalado, A., Sánchez, L. & Mancebo B. (2015). Actividad anti-inflamatoria de los extractos metanólicos de hojas y de tallos de *Tabebuia hypoleuca* (C. Wright) Urb. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 3(5), 109-117. ISSN 0719-4250
- Hetter GP (2000) An examination of the phenol-croton oil Peel: Part I. Dissecting the formula. *Plast Reconstr Surg* 105: 227-239.
- Cabrera HR, Morón FJ, Victoria MC, García AI, Acosta L (2012) Composición fitoquímica de partes aéreas frescas de *Phania matricarioides*. *Rev Cubana Plant Med* 17: 268- 278.
- Winter CA, Risley EA, Nuss GW (1962) Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc. Soc Exp Biol Med* 111: 544-547.
- EFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Oenothera rosea* (YAWAR SOCCO) EN RATAS CON INDUCCIÓN A LA INFLAMACIÓN AGUDA Y CRÓNICA.
- Nantel F., D. Denis, R. Gordon, et al. 1999. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *British Journal of Pharmacology.* 128: 853 – 859.
- Nakagawa T, Kaneko S (2010) Spinal astrocytes as therapeutic targets for pathological pain. *J Pharmacol Sci* 114:347–353.
- Pedro Garcia *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp)* Vol. 102, Nº. 1, pp 91-159, 2008 IX Programa de Promoción de la Cultura Científica y Tecnológica
- Bley KR, Hunter JC, Eglen RM, Smith JA. the role of IP prostanoid receptors in inflammatory pain. *Trends Pharmacol Sci* 1998;19:141-7
- Rastogi, R.P. y B.M. Mehrotra (1990). *Compendium of Indian Medicinal Plants*, vol. 1. (Eds.). CD RI Lucknow and PID, New Delhi, India, pp. 441-443.
- González, Guevara, M., C., Ospina, Giraldo, L., F., Rincón, Velandia, J., (2011). Actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones de *Myrcianthes leucoxila*, *Calea prunifolia*, *Curatella americana* y *Physalis peruviana* en los modelos de edema auricular por TPA, edema plantar por carragenina y artritis inducida por colágeno. Universidad Nacional de Colombia.

- Quesada, A., (2010). Plantas al servicio de la salud 1: plantas medicinales de Costa Rica y Centroamérica. Museo Nacional de Costa Rica. Costa Rica
- González, A.E., A. Gómez, L.S. Cortés, T. Hernández, A. Ramírez y A. Nieto C. (2009). Heptacoordinate Tin (IV) Compounds Derived from Pyridine Schiff Bases: Synthesis, Characterization, in Vitro Cytotoxicity, Anti-inflammatory and Antioxidant Activity. Chemical and Pharmaceutical Bulletin.
- Tomazela, D., Pupo, M., Passador, M., da Silva, M., Vieira, P., Fernandes, J., et al. (2000). Pyrano chalcones and a flavone from *Neoraputia magnifica* and their *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-inhibitory activities. *Phytochemistry*.
- Ortiz MI, Castañeda-Hernández G. Examen de la interacción entre lumiracoxib periférico y opioides en la prueba de formalina al 1% en ratas. *Eur J Dolor*. 2008;12(2):233-41. ISSN:1090-3801.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN. Acute and chronic inflammation. En: Saunders (Elsevier). *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*. 8th. ed. New York: McGraw-Hill Interamericana; 2007: p. 58-31
- Regal M, Borges A, Armas J, Alvarado M, Cedeño V, Cuesta J. Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares. *Rev Finlay*. 2015;5(1):47-62.
- Cook JM, Deem TL. Active participation of endothelial cells in inflammation. *J Leukoc Biol*. 2005;77(4):487-95
- Munford RS. Severe sepsis and septic shock: the role of gram-negative bacteremia. *Annu Rev Pathol*. 2006;1(1):467-96
- Arango Gutiérrez, Gloria Patricia; Vásquez Villegas, María Clara Efecto tóxico de *Verbena officinalis* (familia verbenaceae) en *Sitophilus granarius* (coleoptera: curculionidae) *Revista Lasallista de Investigación*, vol. 5, núm. 2, julio-diciembre, 2008, pp. 74-82