



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**“Búsqueda de Especies Vegetales con Actividad  
Analgésica Mediante la Prueba de Inducción de  
Contracciones Abdominales en Ratón e  
Identificación y Estudio Docking de Metabolitos  
de *Matricaria chamomilla*.”**

Tesis que para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA  
SALUD**

Presenta:

**ISAAC MISAEL LUCAS GÓMEZ**

Director de Tesis

**Dr. JOSÉ ROBERTO VILLAGÓMEZ IBARRA**

Codirectora

**Dra. RAQUEL CARIÑO CORTÉS**

San Agustín Tlaxiaca Hgo. a 29 de noviembre de 2014



Instituto de Ciencias de la Salud

Durante el desarrollo de estos estudios, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de beca 274720.

Un agradecimiento especial al personal en general del Bioterio de la UAEH, quienes siempre dieron todas las facilidades para que las pruebas in vivo se realizaran de manera correcta y con la inocuidad adecuada.

## *Dedicatorias*

*A mis padres Juan y Delia por brindarme siempre su apoyo y amor incondicional, ahora sé que no fue fácil pero no se rindieron nunca, se los agradezco y los quiero mucho.*

*A mi hermano Juan por estar conmigo y brindarme momentos de alegría.*

## *Agradecimientos*

*A mis profesores y asesores: Dr. José Roberto Villagómez Ibarra y Dra. Raquel Cariño Cortez, gracias por compartir su conocimiento, brindarme su guía y consejos, nunca fui el mejor alumno pero ahora veo que no es fácil ser asesor y les agradezco que me guiaran en este trabajo.*

*A todos los amigos que conocí en el laboratorio: Olivia, Saúl, Yazmín ... gracias por brindarme su amistad.*

*A todos mis amigos y compañeros de laboratorio por todos los momentos que vivimos en el trabajo de laboratorio.*

*A todos los profesores del área académica de la Maestría en ciencias biomédicas y de la salud y en especial a mis coasesores: Dr. Mario Isidoro Ortiz Ramírez Dr. Héctor Ponce Monter y Dr. Luis Enrique Soria Jasso; por darme la oportunidad de ignorar menos.*

*“Los éxitos y los errores nos acompañan por toda la vida y por eso nos volvemos más sabios, siempre hay que tenerlo presente”*

## ÍNDICE GENERAL

<b>Índice General</b>	3
<b>Índice de Figuras</b>	7
<b>Índice de Tablas</b>	9
<b>Abreviaturas</b>	10
<b>Resumen</b>	11
<b>Abstract</b>	12
<b>I    Introducción</b>	13
<b>II    Antecedentes</b>	14
<i>II.1     Generalidades</i>	14
<i>II.1.1    Productos naturales</i>	14
<i>II.1.2    La medicina tradicional</i>	15
<i>II.1.3    Dolor</i>	15
<i>II.1.3.1   La clasificación del dolor</i>	16
<i>II.1.3.2   Mecanismo del dolor.</i>	19
<i>II.1.3.3   Tratamientos para el dolor.</i>	28
<i>II.1.3.4   Mecanismos de los AINES.</i>	30
<i>II.1.3.5   Clasificación de los AINES.</i>	31
<i>II.2.     Antecedentes del problema.</i>	33

II.2.1	<i>Herbolaria y la medicina tradicional.</i>	33
II.2.2	<i>Especies vegetales seleccionadas.</i>	35
II.2.3	<i>Metabolitos bioactivos</i>	38
II.2.4.	<i>Bases estructurales de la inhibición de la ciclooxigenasa (COX)</i>	40
II.2.4.1.	<i>La COX y su funcionamiento</i>	40
II.2.4.2.	<i>Características de la COX</i>	42
II.2.4.3.	<i>Inhibidores de la COX</i>	43
II.2.5.	<i>Técnicas para estudio de productos naturales.</i>	45
II.2.5.1	<i>Cromatografía.</i>	46
II.2.5.2	<i>Espectroscopía.</i>	46
II.2.5.3	<i>Resonancia Magnética Nuclear.</i>	47
II.2.5.4	<i>Determinación de dosis letal media (DL<sub>50</sub>).</i>	48
II.2.5.5	<i>Modelos de evaluación de dolor.</i>	48
II.2.6.	<i>Química teórica</i>	50
II.2.6.1.	<i>Química cuántica</i>	51
II.2.6.2.	<i>Acoplamiento Teórico Ligando-Proteína</i>	52
<b>III</b>	<b>Justificación</b>	56
<b>IV</b>	<b>Hipótesis</b>	57
<b>V</b>	<b>Objetivos</b>	57
V.1.	<i>Objetivo general.</i>	57
V.2.	<i>Objetivos específicos.</i>	57
<b>VI.</b>	<b>Material y Métodos</b>	58
VI. 1	<i>Recolección y preparación de la muestra.</i>	58

VI.2	<i>Obtención de extractos vegetales</i>	59
VI.2.1	<i>Extracto hexánico</i>	59
VI.2.2	<i>Extracto de acetato de etilo</i>	60
VI.2.3	<i>Extracto etanólico</i>	60
VI.2.4	<i>Extracto etanólico de Matricaria chamomilla</i>	60
VI.3.	<i>Dosis letal media (DL<sub>50</sub>)</i>	60
VI.4.	<i>Prueba de Writhing reflex o prueba de contracciones abdominales.</i>	61
VI.5.	<i>Cromatografía en columna</i>	62
VI.6.	<i>Cromatografía en capa fina</i>	62
VI.7.	<i>Determinación y elucidación de los componentes químicos por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)</i>	63
VI.8.	<i>Estudio de acoplamiento molecular (docking) para COX-1 y COX-2</i>	63
VI.8.1.	<i>Obtención de modelo molecular del ligando (fármaco o producto natural)</i>	63
VI.8.2.	<i>Obtención de modelo de la molécula diana ( ciclooxigenasa 1 y 2)</i>	64
VI.8.3.	<i>Realización del estudio docking.</i>	65
VI.9.	<i>Análisis estadístico</i>	66
<b>VII</b>	<b>Resultados</b>	66
VII.1.	<i>Extractos</i>	66
VII.2.	<i>Dosis letal media (DL<sub>50</sub>)</i>	67
VII.3.	<i>Prueba de contracciones abdominales (prueba de Writhing reflex)</i>	67
VII.3.1.	<i>Aceitilla (Bidens odorata)</i>	68
VII.3.2	<i>Tepozan (Buddleja cordata)</i>	69

VII.3.3.	<i>Limpia tunas (Zaluzania augusta)</i>	69
VII.4.	<i>El estudio de Matricaria chamomilla.</i>	70
VII.5.	<i>Estudio de tipo docking de Matricaria chamomilla.</i>	84
<b>VIII</b>	<b>Discusión</b>	86
VIII.1.	<i>Análisis de Prueba de contracciones abdominales (prueba de Writhing reflex)</i>	86
VIII. 2.	<i>Metabolitos aislados de Matricaria chamomilla.</i>	88
VIII. 3.	<i>Estudio tipo docking de Metabolitos aislados de Matricaria chamomilla.</i>	95
<b>IX</b>	<b>Conclusiones</b>	106
IX.1.	<i>Pruebas de Writhing reflex.</i>	106
IX.2.	<i>Identificación de metabolitos de Matricaria chamomilla.</i>	107
IX.3.	<i>Estudio tipo docking de Metabolitos aislados de Matricaria chamomilla</i>	107
<b>X</b>	<b>Recomendaciones</b>	108
<b>XI</b>	<b>Referencias</b>	109

## Índice de Figuras

Figura II.1. Los tipos primarios de dolor	17
Figura II.2 Contribuciones Primarias de las neuronas sensoriales del dolor.	22
Figura II.3 Tratamientos para el dolor	28
Figura II.4 Inconvenientes de AINE	29
Figura II.5 Inconvenientes de analgésicos opiáceos y opioides	30
Figura II.6 <i>Bidens odorata</i> .	35
Figura II.7 <i>Buddleja cordata</i> .	36
Figura II.8 <i>Zaluzania augusta</i> .	37
Figura II.9 <i>Matricaria Chamomilla</i>	38
Figura II.10 Cuadro de procedimiento de algoritmo de software EADock.	55
Figura VI.1 Secuencia de obtención de extractos vegetales.	59
Figura VII.1 Grafica de Prueba Writhing reflex para <i>Bidens odorata</i>	68
Figura VII.2 Grafica de Prueba Writhing reflex para <i>Buddleja cordata</i> .	69
Figura VII.3 Grafica de Prueba Writhing reflex para <i>Zaluzania augusta</i> .	69
Figura VII.4 Estructura de $\alpha$ -Bisabolol	70
Figura VII.5. Espectro RMN $^1\text{H}$ experimental de $\alpha$ -Bisabolol	72
Figura VII.6 Espectro RMN $^1\text{H}$ simulado de $\alpha$ -Bisabolol (MestRenova 8.1)	72
Figura VII.7. Espectro RMN $^1\text{H}$ reportado en literatura de $\alpha$ -Bisabolol (Molbase).	73
Figura VII.8 Estructura de Óxido de Bisabolol-A	73
Figura VII.9. Espectro RMN $^1\text{H}$ experimental de Óxido de Bisabolol-A	75
Figura VII.10 Espectro RMN $^1\text{H}$ simulado de Óxido de Bisabolol-A (MestRenova 8.1)	75
Figura VII.11. Espectro RMN $^1\text{H}$ reportado en literatura de óxido de Bisabolol	76

(Molbase).

Figura VII.12 Estructura de Guayazuleno	76
Figura VII.13. Espectro RMN <sup>1</sup> H experimental reportado en literatura de Guayazuleno	77
Figura VII.14. Espectro RMN <sup>1</sup> H experimental de Guayazuleno	78
Figura VII.15 Espectro RMN <sup>1</sup> H simulado de Guayazuleno (MestRenova 8.1)	78
Figura VII.16 Estructura RMN <sup>1</sup> H de Chamazuleno	79
Figura VII.17. Espectro RMN <sup>1</sup> H simulado experimental de Chamazuleno	80
Figura VII.18 Espectro RMN <sup>1</sup> H simulado de Chamazuleno (MestRenova 8.1)	80
Figura VII.19. Espectro RMN 1H reportado en literatura de Chamazuleno (Molbase).	81
Figura VII.20 Estructura de Verbascósido	8
Figura VII.21. Espectro RMN <sup>1</sup> H experimental de Verbascósido	83
Figura VII.22 Espectro RMN <sup>1</sup> H simulado de Verbascósido (MestRenova 8.1)	83
Figura VII.23. Espectro RMN 1H reportado en literatura de Verbascósido (Molbase).	84
Figura VIII.1 Estructura de $\alpha$ -Bisabolol	88
Figura VIII.2 Estructura de Óxido de Bisabolol-A	90
Figura VIII.3 Estructura de Guayazuleno	91
Figura VIII.4 Estructura de Chamazuleno	92
Figura VIII.5 Estructura de Verbascósido	93
Figura VIII.6. COX-1 de rata	96
Figura VIII.7. COX-2 de humano	97
Figura VIII.8 Interacciones de la COX-1 y COX-2 con fármacos inhibidores	98

## Índice de Tablas

Tabla II.1 Clasificación de AINES según su estructura química	31
Tabla II.2 Clasificación de AINES en base a su mecanismo de Acción.	32
Tabla II.3 Clasificación de AINES según su capacidad de inhibición de la COX.	32
Tabla II.4 Algunos de los tés más usados y sus propiedades medicinales.	34
Tabla II.5 Compuestos químicos con actividad analgésica presentes en los géneros propuestos para estudio	38
Tabla II.6 IC <sub>50</sub> de todos los compuestos ensayados como inhibidores de la formación de PG, determina en el ensayo de la COX-1 y COX-WHMA-2.	44
Tabla VII.1. Rendimientos de extractos vegetales.	66
Tabla VII.2 Resultados de evaluación de DL <sub>50</sub>	67
Tabla VII.3 Desplazamientos químicos de $\alpha$ -Bisabolol RMN <sup>1</sup> H	71
Tabla VII.4 Desplazamientos químicos de óxido de Bisabolol-A RMN <sup>1</sup> H	74
Tabla VII.5 Desplazamientos químicos de Guayazuleno RMN <sup>1</sup> H	77
Tabla VII.6 Desplazamientos químicos de Chamazuleno RMN <sup>1</sup> H	79
Tabla VII.7 Desplazamientos químicos de Verbascósido RMN <sup>1</sup> H	82
Tabla VII.8 Energías de estabilidad de ocho moléculas activas de fármacos actuales.	85
Tabla VII.9 Energías de estabilidad de ocho moléculas activas de fármacos actuales y tres productos naturales.	86
Tabla VIII.1 Desplazamientos químicos de $\alpha$ -Bisabolol RMN <sup>1</sup> H	89
Tabla VIII.2 Desplazamientos químicos de Óxido de Bisabolol-A RMN <sup>1</sup> H	90
Tabla VIII.3 Desplazamientos químicos de Guayazuleno RMN <sup>1</sup> H	91
Tabla VIII.4 Desplazamientos químicos de Chamazuleno RMN <sup>1</sup> H	93
Tabla VIII.5 Desplazamientos químicos de Verbascósido RMN <sup>1</sup> H	94

Tabla VIII.6 los valores de la relación de la $CI_{50}$ para las moléculas químicas bioactivas según los ensayos completos de sangre y el ensayo modificado de William Harvey.	101
Tabla VIII.7 Energías <i>simplefitness</i> y <i>fullfitness</i> de complejo Inhibidor-COX 1 y 2	103
Tabla VIII.8 Valores de energía total de complejo para moléculas activas de fármacos, metabolitos de <i>Matricaria chamomilla</i> y el sustrato endógeno de la ciclooxigenasa.	105

## ABREVIATURAS

<b>AINE</b> :	Antiinflamatorio no esteroideo
<b>ATP</b> :	Adenosin Trifosfato
<b>ARNm</b> :	Ácido ribonucleico mensajero
<b>BDMTM</b> :	Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana
<b>C</b> :	Carbono
<b>CIB</b> :	Centro de Investigaciones Biológicas
<b>CO<sub>2</sub></b> :	Dióxido de carbono
<b>COX</b> :	Ciclooxigenasa
<b>DMSO</b> :	Dimetilsulfoxido
<b>DL<sub>50</sub></b> :	Dosis Letal media
<b>H</b> :	Hidrógeno
<b>CI<sub>50</sub></b> :	Concentración inhibitoria media
<b>ICSa</b> :	Instituto de Ciencias de la Salud
<b>MHz</b> :	Mega Hertz
<b>N</b> :	Nitrógeno
<b>NCBI</b> :	Centro Nacional de Información de Biotecnología
<b>OH</b> :	Hidróxilo
<b>PG</b> :	Prostaglandina
<b>ppm</b> :	partes por millón
<b>Rf</b> :	radio de frontera
<b>RMN</b> :	Resonancia Magnética Nuclear
<b>TMS</b> :	Tetrametilsilano
<b>UAEH</b> :	Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
<b>UV</b> :	ultravioleta

**WHMA** : Ensayo modificado de William Harvey

**VHTS**: selección de alto rendimiento virtual.

**RDD**: Diseño racional de fármacos.

## **Resumen:**

El dolor es una sintomatología la cual se encuentra presente en la gran mayoría de los malestares, una vía de tratamiento económica y muy usada por la población en general, es el uso de plantas medicinales, principalmente como té o agua de tiempo, estas presentan principios activos con efectos terapéuticos, algunos de los cuales ya han sido reportados en la literatura científica, sin embargo muchas especies vegetales ya usadas en la medicina tradicional aún no han sido estudiadas a profundidad. En el presente trabajo se seleccionaron especies vegetales de los géneros *Bidens*, *Buddleja*, *Zaluzania* y *Matricaria* del estado de Hidalgo, con usos terapéuticos en la medicina tradicional, de las cuales existe información de sus metabolitos secundarios bioactivos reportados en la literatura científica, a estas especies vegetales se les hicieron extractos con disolventes orgánicos en orden creciente de polaridad (hexano, acetato de etilo y etanol), se determinó la toxicidad aguda por el método de Lorke para cada extracto, posteriormente se evaluó su efecto analgésico a nivel gástrico con la prueba de contracciones abdominales y finalmente se identificaron metabolitos bioactivos en la especie de *Matricaria chamomilla* con el uso de RMN <sup>1</sup>H y se realizó un estudio tipo docking que indica su posible efectividad comparando con principios activos de fármacos actualmente disponibles y el estudio docking propone una propuesta de mecanismo de acción de estos metabolitos de *Matricaria chamomilla*.

## Abstract:

Pain, is a symptomatology that it is possible to find in the majority of the physical discomfort, one way of economical treatment is by using medical plants to prepare teas and drinking it like fresh water. These infusions, have active principles with therapeutic effects, some of them have already reported and quoted on scientific research. However, in traditional medicine there are many species of vegetable already used in the same custom but have not been studied deeply. In this research, endemic vegetal specie from Hidalgo State of the variety *Bidens*, *Buddleja*, *Zaluzania* y *Matricaria* were selected due to its therapeutic uses in traditional medicine the ones, already exist information around its bioactive secondary metabolisms and reported in scientific researches. In this particularly investigation at first, extracts were made by using organic solvents in polarity growth order (hexane, ethyl acetate and ethanol), afterwards its sharp toxicity was determined by the Lorke method for each extract subsequently, its analgesic effect was evaluated in a gastric level with the test abdominal contraction and finally, bioactive metabolisms were identified in *Matricaria chamomilla*. By using RMN  $^1\text{H}$  it was made a study type Docking that indicates its possible effectiveness compared with drugs active principles currently available and the Docking study suggest and propose an action mechanism of *Matricaria chamomilla*'s metabolism.

## I. Introducción

El dolor, es un mecanismo de defensa que alerta del posible daño a un organismo, es un síntoma frecuente dentro de la gran mayoría de las enfermedades y lesiones, en especial cuando la enfermedad es crónica y sus causas son fisiológicas, psicológicas y sociales. Con lo anterior un gran gasto económico se da en el tratamiento de la sintomatología del dolor (1, 2).

En la actualidad, existen opciones para regular o disminuir el dolor, como los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) sin embargo muchos de estos fármacos presentan efectos no deseados, pueden causar desde molestias gastrointestinales, hipersensibilidad, así como riesgo potencial de infarto al miocardio (3). Por lo tanto, es necesario seguir investigando opciones de tratamiento. Las plantas medicinales en México son un potencial importante como fuente de nuevos principios activos analgésicos y desinflamatorios.

Las especies vegetales seleccionadas de los géneros de *Bidens*, *Buddleja*, *Zaluzania* y *Matricaria*, presentados en este trabajo han sido reportadas en la medicina tradicional para tratar el dolor, del mismo modo los antecedentes experimentales indican la presencia de sustancias químicas con efecto analgésico en especies cercanas taxonómicamente a estas, por lo que son usadas en el tratamiento de la sintomatología del dolor, sin embargo aparte de los metabolitos responsables del efecto terapéutico, estas especies vegetales presentan un gran número de sustancias con actividad biológica, en diferentes concentraciones, las cuales podrían causar efectos de sinergismo o incluso efectos no deseados.

Por lo anterior en el presente trabajo se evaluó la dosis letal media ( $DL_{50}$ ), de los extractos obtenidos a partir de las especies vegetales seleccionadas como remedios tradicionales contra el dolor. Con el fin de identificar la existencia de algún efecto analgésico se realizó la prueba de contracciones abdominales (Prueba de Writhing réflex para especies de *Bidens*, *Buddleja*, *Zaluzania*), para posteriormente la identificación de los metabolitos secundarios de *Matricaria chamomilla* y realizar un estudio de tipo docking, con el objetivo de comparar la posible eficacia de los metabolitos secundarios frente a los principios activos presentes en los fármacos disponibles actualmente (Tales como indometacina,

diclofenaco, etc). Con lo anterior se da una idea de su posible mecanismo como principio activo de tipo analgésico.

## **II. Antecedentes**

### *II.1 Generalidades*

#### *II.1.1 Productos naturales*

Un producto natural es todo compuesto de origen orgánico o inorgánico, que se encuentre en la naturaleza y que pueda ser procesado y utilizado por el hombre (4, 5). Generalmente, en el área de química orgánica, se consideran como productos naturales a aquellos provenientes principalmente de plantas, hongos, bacterias y organismos marinos, los cuales llevan a cabo dos tipos de metabolismo, el primario y el secundario. El metabolismo primario es aquél en el cual los organismos sintetizan y convierten sustancias para sobrevivir a partir de compuestos simples como el CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub> y algunos metales, que son transformados en polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos, los cuales son considerados los bloques fundamentales de la materia viva. Este tipo de metabolismo lo llevan a cabo todos los organismos vivos. Otro proceso que generalmente se presenta en las plantas, dando diferentes productos de acuerdo al tipo de especie, es el llamado metabolismo secundario. Los productos formados por este metabolismo se conocen como productos naturales y como ejemplos se pueden mencionar a los terpenos, los alcaloides y los pigmentos. Aunque estos metabolitos en principio no son esenciales para la existencia del organismo, juegan un rol importante en la supervivencia o prevalencia de unas especies sobre otras, ya que se piensa que tienen funciones de defensa, como atrayentes sexuales, marcadores territoriales, etc. (6-8).

## *II. 1.2 La medicina tradicional*

El uso de la Medicina Tradicional es ancestral y data desde que el hombre descubrió que podía emplear los recursos que le rodeaban para curar sus enfermedades y dolencias. Dicha información ha sido transmitida en forma oral o en códices y otros escritos. Por esta razón, se conoce que las plantas contienen principios activos de acción terapéutica, que pueden emplearse para tratar los trastornos patológicos y contribuir a la conservación de la salud (1, 9, 10).

Las plantas se presentan como una fuente importante de productos naturales con actividad biológica y se consideran una vía prometedora para el descubrimiento de nuevos fármacos debido al fácil acceso y coste relativamente bajo (1, 2, 10). El desarrollo de las hierbas medicinales con eficacia probada y seguridad, brinda una fuente importante para aumentar el acceso de la población a los medicamentos y ofrecer nuevas opciones terapéuticas.

Uno de los malestares más comunes es el dolor, con diferente grado de intensidad, localización y características (10), este malestar ha sido y es uno de los principales objetivos de tratamiento por la medicina tradicional como por la medicina moderna, así que no debe sorprender que una vez más se recurra a la medicina tradicional para buscar nuevas soluciones a este padecimiento, ya que esta ha tratado estos males con éxito en el pasado.

### *II.1.3 Dolor*

El dolor es una experiencia sensorial multidimensional que es intrínsecamente desagradable y se asocia con daño y sufrimiento, el dolor es un componente presente en la mayoría de enfermedades y dolencias, con diferencia en su intensidad, localización y tipo. Lo anterior hace que el dolor sea uno de los principales síntomas al ser tratados en los pacientes. Las características en las que puede variar el dolor son: intensidad (leve, moderada o grave), la calidad (ardor agudo o sordo), la duración (transitoria, intermitente o persistente), y la derivación (superficial o profunda, localizada o difusa). Aunque es básicamente una

sensación, el dolor tiene componentes cognitivos y emocionales fuertes y está vinculado en términos de sufrimiento (9-15).

El dolor se asocia con reflejos motores para evasión de daño o posibilidad de peligro. Aunque tendemos a pensar en el dolor como una entidad homogénea sensorial, existen varios tipos distintos: nociceptivo, inflamatorio, neuropático y funcional (Figura II.1). Los mecanismos neurobiológicos responsables de estas variedades de dolor están empezando a ser definidos lo cual proporciona información sobre cómo distintos tipos de dolor se generan por diversos factores etiológicos, en los pacientes (1, 11, 15-17). Además, ahora podemos esperar pasar de un enfoque terapéutico empírico a uno que está dirigido específicamente a los mecanismos particulares del tipo de dolor experimentado por un paciente individual. Aunque el tratamiento analgésico actual se dirige a suprimir o controlar los síntomas, las intervenciones futuras tienden a abordar el desarrollo del dolor desde los mecanismos que lo originan a nivel molecular (11).

#### *II.1.3.1 La clasificación del dolor.*

El dolor se puede dividir básicamente en dos grandes categorías: adaptativos y desadaptativos. Dolor de adaptación contribuye a la supervivencia mediante la protección del organismo de una lesión o la promoción de la curación cuando se ha producido la lesión. Dolor desadaptativo, en el otro extremo es una expresión patológica del sistema nervioso, el dolor se convierte en la enfermedad. La experiencia sensorial del dolor agudo causado por un estímulo nocivo está mediada por un sistema sensorial especializado de alto umbral, el sistema nociceptivo. Este sistema se extiende desde la periferia a través de la médula espinal, el tronco cerebral y el tálamo a la corteza cerebral, donde se percibe la sensación. Para evitar daños en el tejido y órganos, nosotros como seres vivos hemos aprendido a asociar ciertas categorías de estímulos con el peligro que hay que evitar si es posible. Esta asociación se forma mediante la vinculación de los estímulos nocivos con una sensación que es intensa y desagradable, es decir, el dolor. La sensación de dolor debe ser lo suficientemente fuerte que exige la atención inmediata y en consecuencia derive en una acción inmediata (11, 14, 16, 17).

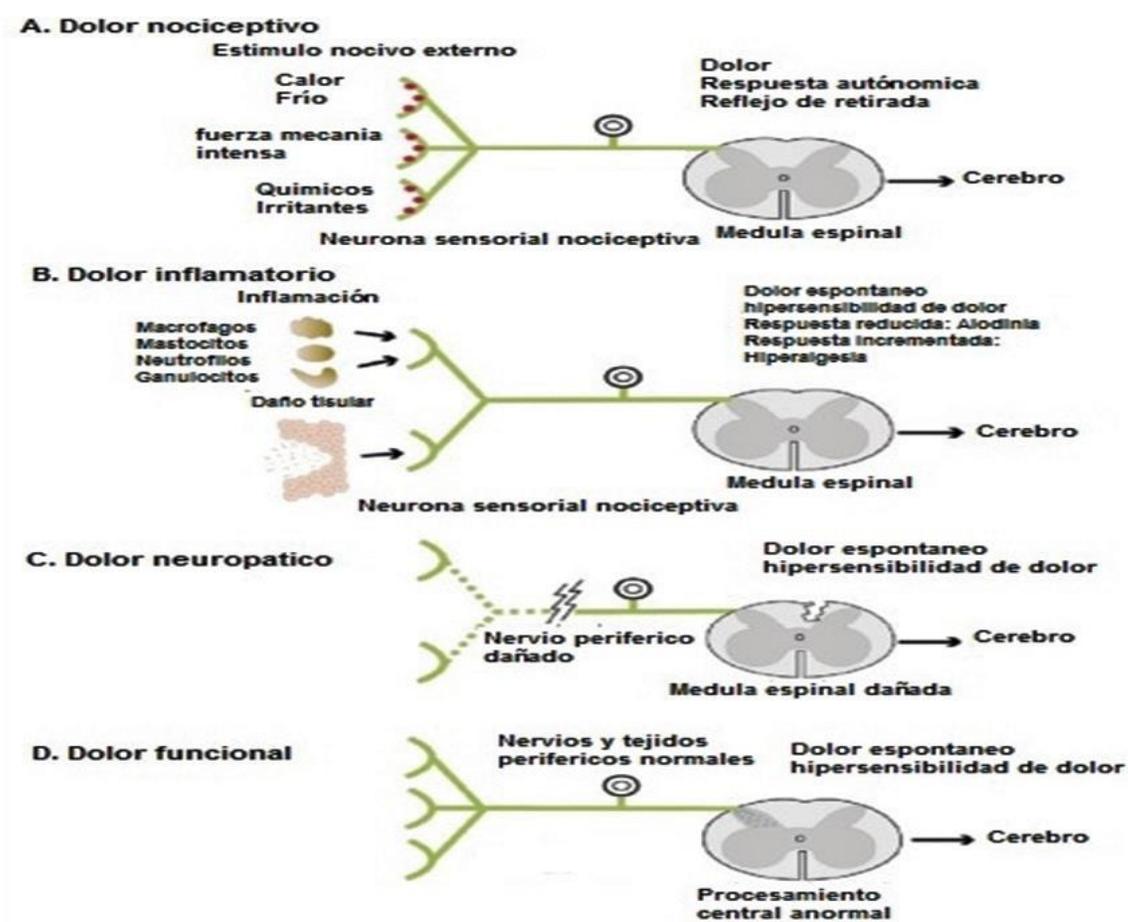


Figura II.1. Los tipos primarios de dolor.(11)

Este sistema de dolor nociceptivo es un dispositivo clave de alerta temprana, un sistema de alarma que anuncia la presencia de un estímulo potencialmente dañino. El dolor nociceptivo se debe controlar sólo en situaciones clínicas específicas, como durante la cirugía o procedimientos médicos que dañan el tejido y después de un trauma. Es importante que este sistema no pueda desactivarse crónicamente, porque la pérdida de su función de protección conduce inevitablemente a daños en los tejidos, como ejemplo la mutilación auto-inducido de la lengua y los labios, la destrucción de las articulaciones, pérdida de la punta de los dedos, y las úlceras por presión. Por lo tanto el dolor nociceptivo es una sensación fisiológica vital (11, 17, 18).

En los pacientes con insensibilidad congénita al dolor debido a una mutación de la tirosina del factor de crecimiento del nervio receptor de quinasa A, resulta en una pérdida de las neuronas sensoriales de alto umbral, esto reduce la esperanza de vida (2). Si se produce daño a los tejidos, no hay cambios necesarios del cuerpo para la protección contra estímulos nocivos, tampoco promoción de la curación del tejido lesionado. El dolor inflamatorio se usa para llevar a cabo este objetivo. En un estado de inflamación, se aumenta la sensibilidad de tal manera que los estímulos a la parte afectada que normalmente no causan dolor, ahora lo hacen. Como resultado de ello, evitamos el contacto o movimiento de la parte lesionada hasta que la reparación esté completa, minimizando daños mayores. El dolor inflamatorio generalmente disminuye a medida que el daño es reparado (11).

Aunque el dolor inflamatorio es adaptativo, la evolución no ha tenido en cuenta la capacidad de infligir lesiones selectivas (ejemplo, someterse a cirugía) o sobrevivir un trauma severo. Tenemos que ser capaces de gestionar activamente el dolor inflamatorio después de la cirugía o trauma, así como en pacientes con enfermedades inflamatorias, como la artritis reumatoide, sin necesidad de retirar o activar severamente el sistema de alerta del dolor nociceptivo o menoscabar el proceso de curación, permitiendo excesiva inflamación o dañando tejido en formación. El objetivo es normalizar la sensibilidad al dolor, no eliminarla (11, 16).

El dolor neuropático puede ser el resultado de lesiones en el sistema nervioso periférico, como en pacientes con polineuropatía diabética o el SIDA, como en pacientes con lesión de la médula espinal, la esclerosis múltiple, o un accidente cerebrovascular (11). Dolor funcional es un concepto que se ha desarrollado durante la evolución, siendo una forma de sensibilidad al dolor, sin déficit neurológico o anormalidad periférica que puedan ser detectados. El dolor se debe a una respuesta anormal de la función del sistema nervioso, en el que aumentaba la intensidad o la sensibilidad del aparato sensorial amplificando estímulos que normalmente serían inofensivos. Varias condiciones comunes tienen características que pueden colocarse en esta categoría: por ejemplo, la fibromialgia, el síndrome del intestino irritable, algunas formas de dolor torácico no cardíaco, y la cefalea

tensional. No se sabe por qué el sistema nervioso central de los pacientes con dolor funcional muestra la sensibilidad anormal o hiperreactividad (11, 16).

Las causas son diferentes en el inflamatorio, neuropático y funcional, comparten algunas características. El dolor en estos síndromes puede surgir de forma espontánea en la aparente ausencia de cualquier estímulo periférico, o puede ser evocada por estímulos que generalmente no presentan riesgo al tejido u órganos. El dolor evocado puede surgir a partir de un estímulo normalmente inocuo, como un toque de luz a la piel en un paciente con neuralgia, o puede ser una respuesta exagerada y prolongada a un estímulo nocivo. La primera condición se llama alodinia e hiperalgesia este último. El dolor espontáneo y cambios en la sensibilidad a los estímulos son características fundamentales de la clínica del dolor, que lo distinguen de dolor nociceptivo, en la que el dolor se produce sólo en la presencia de un estímulo intenso o nocivo. Dado que el dolor nociceptivo constituye nuestra experiencia cotidiana del dolor, la falta de un estímulo periférico identificable en algunos pacientes puede llevar a la suposición de que su dolor es "histeria" en su origen. Sin embargo, el aumento de la sensibilidad del sistema nervioso durante el dolor inflamatorio, neuropático, o funcional puede conducir a dolor en ausencia de cualquier estímulo periférico nocivo (11, 16, 19).

### *II.1.3.2 Mecanismo del dolor.*

Múltiples mecanismos que producen dolor han sido identificados; incluyendo a la nocicepción, sensibilización periférica, interruptores fenotípicos, la sensibilización central, reorganización estructural y disminución de la inhibición. En el caso de la nocicepción es el único mecanismo que causa dolor nociceptivo y comprende los procesos de transducción, conducción, transmisión, y percepción. *Transducción* es la conversión de un estímulo térmico, mecánico, o químico nocivo en actividad eléctrica en las terminales periféricas de las fibras sensoriales nociceptivas. Este proceso está mediado por los canales iónicos de los receptores específicos expresados sólo por los nociceptores (Figura II.2). La *conducción* es el paso de potenciales de acción de la terminal periférica a lo largo de los axones a la terminal central de los nociceptores en el sistema nervioso central, la

*transmisión* es la transferencia sináptica y modulación de la señal del estímulo de una neurona a otra. En el caso de una reorganización estructural y la disminución en la inhibición, son casos únicos para el dolor neuropático, mientras que la sensibilización periférica ocurre en los procesos inflamatorios y algunas formas de dolor neuropático (neuralgia postherpética, forma documentada). La sensibilización central, contribuye a un dolor inflamatorio, neuropático, y funcional. Debe quedar claro que lo anterior son mecanismos de generación de dolor y no son sinónimos de síndromes de dolor. Sin embargo los mecanismos pueden ser objeto de tratamiento, y por eso debemos desarrollar herramientas de diagnóstico para identificar las etapas de los mecanismos que hayan sufrido alteraciones, así como agentes farmacológicos específicos para ciertos mecanismos o fases puntuales de estos mecanismos (11, 14, 17).

#### A) La nocicepción (Figura II.2)

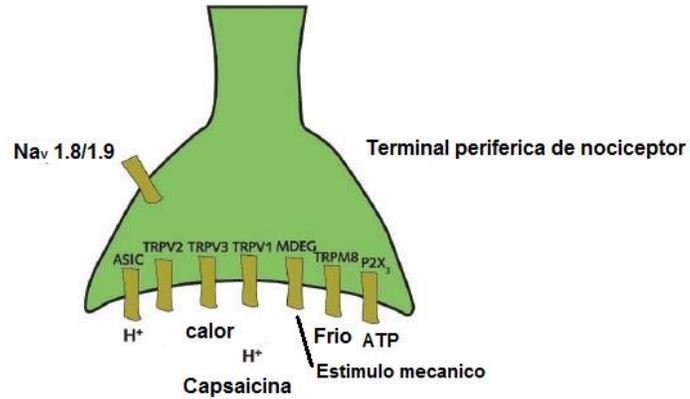
La nocicepción es la percepción de estímulos nocivos, se inicia por estímulos que activan las terminales periféricas de los nociceptores, un subconjunto altamente especializado de neuronas sensoriales primarias que responden sólo a los estímulos intensos. Los nociceptores no tienen mielina o están finamente mielinizadas en sus axones. Las propiedades receptoras de estas neuronas sensoriales están determinadas por su expresión de receptores de canales iónicos de transducción, los cuales tienen un alto umbral de activación a los estímulos externos. Muchos, pero no todos, de estos transductores se han identificado, incluyendo los que causan la respuesta al calor nocivo ( $> 42^{\circ} \text{C}$ ) y frío ( $< 10^{\circ} \text{C}$ ) e irritantes químicos directos, tales como la capsaicina (Figura II.2)(11, 13, 20).

Los canales iónicos de transducción son canales de cationes no selectivos que no dependen de voltaje pero que se activan por la temperatura, agentes químicos, y las fuerzas de tipo mecánico. Una vez que se activan los canales, los iones de sodio y de calcio fluyen en la terminal periférica de los nociceptores, produciendo una corriente hacia el interior que despolariza la membrana. Si la corriente de despolarización es suficiente para activar los canales de sodio dependientes de voltaje, ellos también se abren, despolarizando aún más la membrana y se da el inicio de una ráfaga de potenciales de acción, la frecuencia y la duración de estos reflejan la intensidad y duración del estímulo nocivo (11, 13).

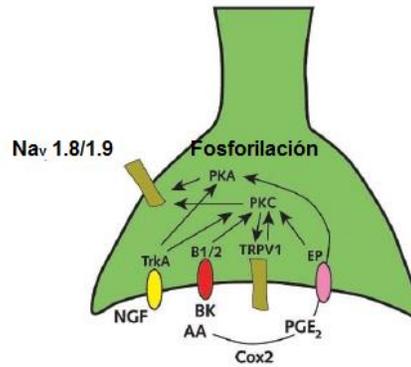
La presencia, especificidad, y el umbral de los transductores nociceptivos es el primer y más importante filtro en la activación de la nocicepción y define las diferentes clases de neuronas sensoriales primarias: unimodales, que reaccionan sólo a una forma de estímulo (ejemplo, calor nocivo) o polimodal, que reaccionan a varios tipos de estímulos. Las neuronas sensoriales primarias de tipo Polimodal son más comunes que la variedad unimodal. Algunas neuronas nociceptivas son efectivamente silenciosas, es decir, no son capaces de reaccionar en circunstancias normales ante cualquier estímulo que no dañe al tejido, porque el umbral basal de activación de los transductores es muy alto, solo frente a estímulos nocivos se verán activas (11, 21).

Si se inician los potenciales de acción por un estímulo nocivo aplicado a la terminal periférica de un nociceptor, que se llevan a cabo desde la periferia hacia el sistema nervioso central a lo largo del axón de la neurona sensorial, que corre a través de los nervios periféricos para el ganglio de la raíz dorsal y en la médula espinal a través de la raíz dorsal, donde las terminales centrales de las neuronas hacen contacto sináptico con las neuronas del asta dorsal. Si fuera posible bloquear selectivamente los canales de sodio, como es el caso de los anestésicos locales que bloquean solamente el dolor y dejan una sensación inocua, las respuestas motoras y la respuesta autonómica quedarían intactas y podrían desarrollarse. Todos los bloqueadores de los canales de sodio disponibles en la actualidad tienen un índice terapéutico pobre porque son no selectivos, actúa sobre los canales de sodio en el sistema nervioso central, periférico y el sistema cardiovascular (11, 19, 21).

**A. Transducción Nociceptiva**



**B. Sensibilización periférica**



**C. Cambio de transcripción en la raíz del ganglio dorsal**

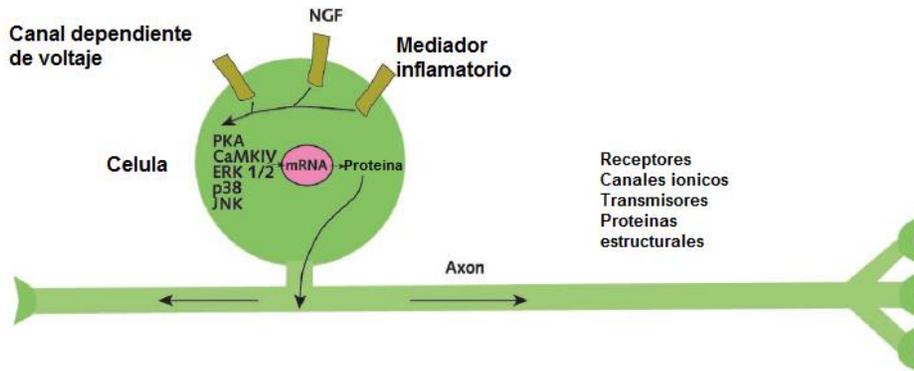


Figura II.2 Contribuciones Primarias de las neuronas sensoriales del dolor(11)

**B) La sensibilización periférica**

Una lesión con inflamación de los tejidos trae como consecuencia cambios profundos en el entorno químico de la terminal periférica de los nociceptores. Las células dañadas liberan contenidos intracelulares, tales como el ATP (Adenosin trifosfato) e iones  $K^+$ , el pH

disminuye, hay presencia de citocinas, quimocinas y factores de crecimiento, estos se producen por las células inflamatorias reclutadas en el sitio de la lesión. Algunos de estos factores actúan directamente en la terminal de nociceptores para activarlo y producir dolor (nociceptores activadores), y otros sensibilizan a la terminal de modo que se convierta en hipersensible a estímulos subsiguientes (nociceptores sensibilizados) El Adenosin trifosfato (ATP), por ejemplo, se libera en cantidades milimolares por las células dañadas en el espacio extracelular. La activación de los receptores P2X<sub>3</sub> en los nociceptores por el ATP permite la detección inmediata de daño a los tejidos. Los protones, por el contrario, se acumulan lentamente después del daño en el tejido y actúan sobre los canales iónicos sensibles a los ácidos. La prostaglandina E<sub>2</sub> y el factor de crecimiento del nervio se unen a receptores acoplados a proteínas G y receptores de la tirosina quinasa A, respectivamente, para alterar la sensibilidad de la terminal sin producir activación de los nociceptores de manera directa. La bradiquinina, activa y sensibiliza a la terminal a través de su receptor B<sub>2</sub>. Receptores de bradiquinina B<sub>1</sub> se expresan sólo después de la lesión o inflamación.(11, 18, 19)

La producción de prostaglandinas en el sitio de la lesión del tejido, es un elemento importante de la reacción inflamatoria, como resultado de la generación de ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana por la fosfolipasa A<sub>2</sub>. La ciclooxigenasa-2 (COX-2) convierte el ácido araquidónico en prostaglandina H, que se convierte en especies de prostanoides específicos, tales como la prostaglandina E<sub>2</sub>, por sintasas de prostaglandina. La ciclooxigenasa-2, la fosfolipasa A<sub>2</sub>, y sintasas de prostaglandina E son enzimas inducibles y que no se encuentran presentes en la mayoría de los tejidos no inflamados. Se induce la ciclooxigenasa-2 en respuesta a la interleucina-1 $\beta$  y el factor alfa de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ). Debido a que esta inducción ocurre varias horas después de la iniciación de la inflamación, AINES o agentes selectivos de la COX-2 no tienen efecto sobre el dolor nociceptivo inflamatorio o inmediato; Sin embargo, estos tienen una acción analgésica inmediata en condiciones tales como la artritis reumatoide, en donde la COX-2 se expresa de manera crónica como resultado de una inflamación constante (11, 13, 18, 19).

Ciertos agentes sensibilizantes, tales como la prostaglandina E<sub>2</sub>, reducen el umbral de activación de terminales del nociceptor y aumentan la capacidad de respuesta de la terminal mediante la unión a receptores específicos expresados en la membrana de la terminal de los nociceptores (ejemplo el receptor de la prostaglandina E). Estos receptores están acoplados a quinasas intracelulares en el citoplasma de la terminal. La activación de la adenilciclasa por la prostaglandina-E aumenta los niveles de monofosfato de adenosina cíclico, que activa el ciclo de adenosina monofosfato dependiente de la proteína quinasa-A. La liberación de las reservas de calcio a partir de los microsomas en la terminal, permitiendo la entrada de calcio a través de canales iónicos en la membrana, activa la proteína quinasa-C dependiente de calcio. La proteína quinasa-A y proteína quinasa-C fosforilan los aminoácidos serina y treonina en muchas proteínas. La fosforilación de proteínas constituye un proceso posterior a la traducción, un cambio en la composición química de una proteína producida después de su síntesis (o traducción) a partir de ARN mensajero. Tal fosforilación puede alterar drásticamente la actividad de los receptores y canales iónicos. El canal receptor transductor de potencial transitorio V1 sensible al calor, por ejemplo, normalmente tiene un umbral de activación de 42 ° C, la temperatura a la que comenzamos a experimentar una sensación térmica dolorosa. Después de su fosforilación, el umbral disminuye cerca de la temperatura normal del cuerpo. La producción de la prostaglandina E<sub>2</sub> después de la inducción de la COX-2, en casos como quemaduras de sol, hace que el umbral de dolor debido al calor disminuya. Este efecto, que se limita al sitio de la inflamación, explica el dolor ardiente experimentado en respuesta a una ducha caliente en las personas con quemaduras solares (9, 11, 17, 18).

El umbral y la cinética de los canales de iones de sodio dependientes de voltaje, como el Nav1.8, también se ven alterados por la fosforilación, causando un aumento de la excitabilidad de la membrana. Con esto más potenciales de acción se producen en la terminal de los nociceptores. Debido a que varios sensibilizadores están presentes (prostaglandina E<sub>2</sub>, el factor de crecimiento nervioso, y bradicinina), el bloqueo de la producción de una solo de estas sustancias en cualquier momento no eliminará la sensibilización periférica. Este factor contribuye al efecto techo de fármacos tales como los inhibidores de la COX-2. La sensibilización periférica disminuye el alto umbral y los

nociceptores silenciosos, además juega un papel importante en el aumento de la sensibilidad al dolor en el sitio de la lesión o inflamación(9, 11).

#### C) Regulación de las neuronas sensoriales en transcripción y post-transcripcional:

Las propiedades funcionales, la excitabilidad intrínseca, y la susceptibilidad a los agentes farmacológicos de las neuronas sensoriales no son fijos, sino más bien dependen de la naturaleza y los niveles de las diferentes proteínas expresadas por las neuronas sensoriales. Por ejemplo, después de la inflamación periférica, hay un aumento en el nivel del receptor de potencial transitorio de canal V1 sensible al calor en la terminal periférica de los nociceptores esto da un aumento de sensibilidad periférica al calor, también hay un incremento en los niveles de los moduladores sinápticos como: la sustancia P y el factor neurotrófico derivado del cerebro y la amplificación de la entrada central en la médula espinal. Estos cambios resultan en un aumento de la producción del factor de crecimiento nervioso en el tejido inflamado. Este factor de crecimiento se transporta desde la periferia hacia el cuerpo celular de la neurona sensorial en el ganglio de la raíz dorsal, donde activa vías de señalización intracelulares que incluyen a la proteína quinasa p38. Después de una lesión axonal periférica, el número de receptores  $\mu$  opiáceos disminuye y el número de  $\alpha 2\delta$  subunidades de canales de calcio aumenta, lo que contribuye a la reducción de la sensibilidad a la morfina y aumento de la sensibilidad a la gabapentina. Las alteraciones en la expresión y distribución de los canales de iones de sodio y potasio, después de la lesión del nervio, aumenta la excitabilidad de la membrana de tal manera que impulsos anormales comienzan a ser generados sin ningún estímulo periférico; esta excitabilidad sin causas externas es un factor importante para el dolor neuropático espontáneo (11, 20).

#### D) Sensibilización central

De la misma manera que las terminales periféricas de los nociceptor se pueden sensibilizar, las neuronas nociceptivas de transmisión centrales en el cuerno dorsal de la médula espinal o en el núcleo espinal del nervio trigémino también pueden ser sensibilizadas. La sensibilización central y periférica son las principales causas de la hipersensibilidad al dolor después de una lesión. La sensibilización central amplifica y facilita la transferencia sináptica de la terminal central de los nociceptores a las neuronas del asta dorsal.

Inicialmente, se activa en las neuronas centrales por la entrada de nociceptores en la médula espinal (es decir, que es dependiente de la actividad). Más tarde, se mantiene más allá del estímulo inicial por los cambios transcripcionales en la maquinaria molecular de la célula (es decir, se convierte en dependiente de la transcripción). En general, las alteraciones subyacentes de sensibilización central son similares a los que producen sensibilización periférica. Quinasas intracelulares se activan, lo que lleva a la fosforilación de los canales iónicos y de receptores, además ciertos genes se indujeron en consecuencia a los procesos antes mencionados y proceden a cambiar el carácter químico o fenotipo de la neurona. La sensibilización periférica y central son una expresión de la plasticidad o modificabilidad del sistema nervioso, que se amolda a las nuevas funciones en respuesta a las entradas de estímulos que son cambiantes (en este caso, la lesión tisular). Segundos después de un bombardeo masivo de entrada sensorial a partir de un tejido lesionado o un nervio dañado, las neuronas de la médula espinal que reciben este estímulo sensorial se vuelven hipersensibles. Después de esta reacción, los insumos que normalmente habría sido indetectables ahora evocan salidas, es decir, estímulos que normalmente son inocuos, como un toque de luz solar en la piel, ahora provocan dolor y áreas fuera del sitio de una lesión producen sensaciones de dolor (hiperalgesia secundaria) (11, 16, 18, 20).

Un ejemplo de cómo los genes activados modifican la química de una neurona es la inducción de la COX-2 a nivel central. La ciclooxigenasa-2, empieza a ser expresada en las neuronas en muchas áreas del sistema nervioso central varias horas después de una lesión en el tejido periférico localizado. Esta expresión no se inicia por flujo de entrada sensorial en la médula espinal, pero por un factor humoral circulante liberada por las células inflamatorias que actúa sobre las células endoteliales de la red vascular del cerebro para producir interleucina-1 $\beta$ . La interleucina-1 $\beta$  entra en el líquido cefalorraquídeo y actúa sobre las neuronas que expresan el receptor de la interleucina - 1 para producir la COX-2. El consiguiente aumento de la prostaglandina E<sub>2</sub> por efecto de la COX-2, tiene muchas acciones presináptica y en el caso de la postsináptica facilita la transmisión sináptica y aumentan la excitabilidad, lo que contribuye a un inicio tardío, prolongado y difuso de la fase de sensibilización central. La inducción central generalizado de la COX- 2 contribuye a los dolores generalizados, pérdida de apetito y cambios de estado de ánimo y el ciclo de

sueño que en conjunto constituyen el síndrome de la enfermedad, una característica de las enfermedades inflamatorias. Estos resultados tienen importantes implicaciones para el tratamiento. En primer lugar, los inhibidores de la COX-2 deben ser dirigidos a nivel central y regiones periféricas donde se ha inducido la COX-2. El sitio central de su acción parece ser un componente importante de su actividad analgésica. Además, el tratamiento dirigido a la reducción de flujo de entrada sensorial en el sistema nervioso central, tales como la anestesia local o regional durante una cirugía, no evitará la inducción centro humoral mediada por la COX-2 y se debe administrar un complemento de inhibidores de la COX-2 como parte de la terapia. La sensibilización central contribuye a las condiciones altamente responsivas (hiperresponsivas) de dolor postoperatorio, migraña, dolor neuropático, la fibromialgia y el dolor de tracto gastrointestinal (11, 16, 19).

La identificación de múltiples mecanismos responsables de la producción de los síndromes de dolor y el conocimiento de sus distintos componentes moleculares es un avance importante en la comprensión del dolor para un mejor tratamiento posterior. Un ejemplo de esto es el tratamiento con inhibidores de la COX-2 selectivos o no selectivos, estos tienen un papel claro si la inducción de la COX-2 es sustancialmente una causa del dolor de un paciente, como es el caso de la mayoría de las condiciones inflamatorias. Sin embargo, estos fármacos no ofrecen ningún beneficio a los pacientes cuyo dolor es debido principalmente a la excitabilidad aumentada causada por la actividad anormal de los canales de sodio después de una lesión del nervio. Al mismo tiempo no todos los pacientes con dolor persistente tienen mecanismos similares (por ejemplo, la osteoartritis es sensible a los inhibidores de la COX-2, mientras que el dolor de la lesión de la médula espinal no lo es). Del mismo modo, la intensidad del dolor no siempre refleja las causas neurobiológicas, da una idea de la medida en que se activan. Una respuesta o falta de la misma pueden ser debido a la presencia o ausencia del mecanismo de objetivo en un momento particular en la historia de un síndrome de dolor. Puesto que los mecanismos de dolor pueden coexistir, un enfoque con un tratamiento con diferentes dianas por parte de los fármacos, puede ser ventajosa para encargarse de cada causa del dolor, consiguiendo de esta manera efectos aditivos en el tratamiento y al final una mayor recuperación del paciente (11, 16, 18).

### II.1.3.3 Tratamientos para el dolor.

El tratamiento adecuado con fármacos (Figura II.3) del dolor depende del tipo de dolor que se experimenta; el tipo de dolor se clasifica generalmente en dos categorías dolor ligero o moderado y dolor intenso o crónico. El dolor ligero o moderado responde bien al tratamiento AINES, mientras que para el dolor crónico se prefieren los opiáceos y opioides (3, 4, 9)

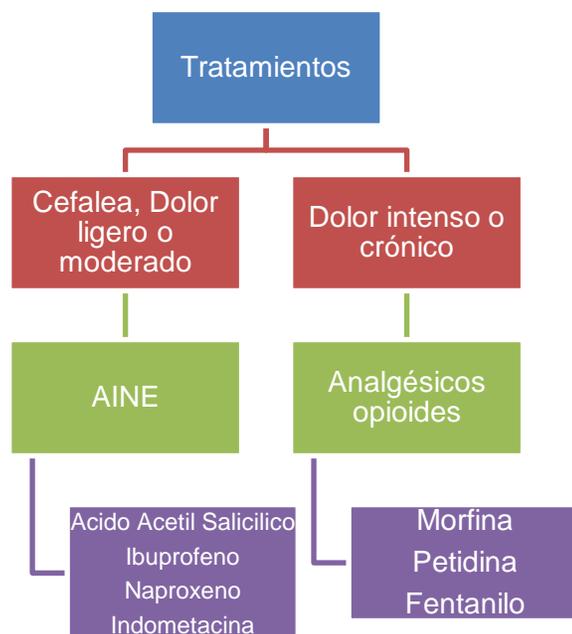


Figura II.3 Tratamientos para el dolor (3)

Los AINES son la primera elección en el tratamiento del dolor general y su distribución es amplia, alcanzando 32 millones de prescripciones de fármacos no opiáceos (principalmente paracetamol y sus combinaciones). Esto aunado a que muchas de las formas farmacéuticas de los AINES no requieren de prescripción médica para su venta, son el tratamiento general de patologías frecuentes que conlleven la presencia de dolor (9, 15).

Los AINES constituyen un grupo de drogas terapéuticas que se utilizan comúnmente para el control de dolor agudo y crónico, y son eficaces en pacientes con dolor de moderado a grave. Su mecanismo de acción es mediante la inhibición de las isoenzimas COX-1 y 2, que

catalizan la formación de las prostaglandinas que median el proceso de la inflamación y dolor (15, 22, 23).

Aunque los AINES son ampliamente descritos estos no están libres de inconvenientes o reacciones no deseadas, en la figura II.4 se describen algunos inconvenientes reportados. En el caso de los opiáceos y opioides su eficacia es muy alta sin embargo su principal inconveniente es la adicción que pueden llegar a causar, la cual está casi a la par de su eficacia (Figura II.4) (3, 23, 24).



Figura II.4 Inconvenientes de AINE(3)

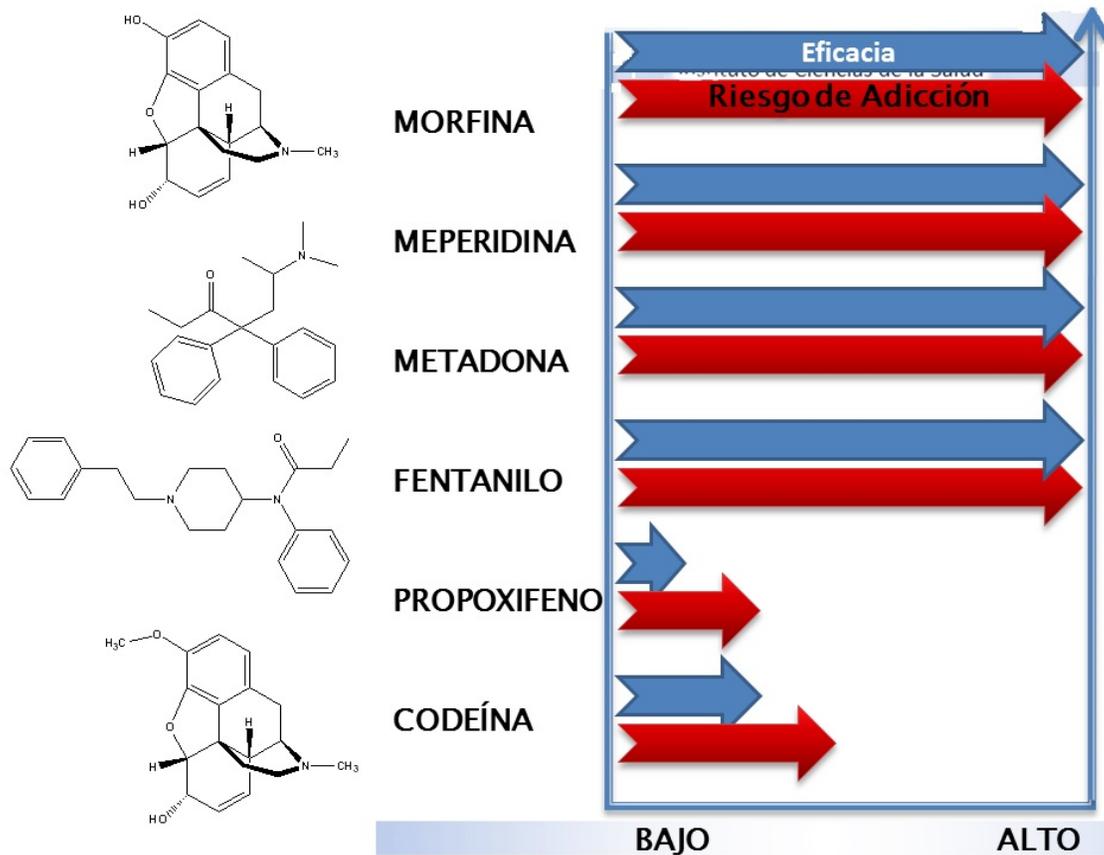


Figura II.5 Inconvenientes de Analgésicos opiáceos y opioides(3)

#### II.1.3.4 Mecanismos de los AINES.

Los AINES constituyen un grupo de drogas terapéuticas que se utilizan comúnmente para el control de dolor agudo y crónico, y son eficaces en pacientes con dolor de moderado a grave. Su mecanismo de acción es mediante la inhibición de las isoenzimas COX-1 y-2, que catalizan la formación de las prostaglandinas que median el proceso de la inflamación y dolor. Hay evidencia que sugiere que pueden tener efectos anti-nociceptivos mediadas por el sistema opioide endógeno. La formación de las prostaglandinas en la inflamación está mediada principalmente por la COX-2, la cual es inducible, mientras que la COX-1 generalmente se considera no inducible, se asocia con la resistencia gástrica a la agresión, la síntesis de tromboxano por las plaquetas, y a la transmisión de los estímulos dolorosos,

entre muchas otras acciones. Los AINE son rápidamente absorbidos y metabolizados por el hígado (15, 18, 22, 23, 25-27)

Los AINES son analgésicos efectivos sin ninguna diferencia clínicamente importante en la eficacia, comparándolos con los fármacos inhibidores específicos de la COX. Los AINES han demostrado ser más eficaces que el paracetamol para algunos tipos de dolor y en muchos entornos de dolor agudo que proporcionar analgesia igual a las dosis iniciales habituales de los opioides (15, 26, 28).

Las interleucinas (IL) activan a la COX-2, en especial las IL- $\alpha$  y IL- $\beta$  y al mismo tiempo estimulan la enzima óxido nítrico sintasa, incrementando los niveles de óxido nítrico (NO) a partir de la L-arginina, el cual actúa como proinflamatorio local de corta duración. Es aquí donde los AINES han mostrado efectividad primero inhibiendo la actividad de la COX-2, y en el caso de los AINES derivados de salicilatos los cuales aparte de tener como blanco a la COX-2 han mostrado capacidad para disminuir los niveles de ON. Esto es un ejemplo de que los AINES pueden tener más de un mecanismo de acción, sin embargo la inhibición de la COX-2 sigue siendo el objetivo terapéutico principal (28-30).

#### *II.1.3.5 Clasificación de los AINES.*

Las siguientes son tres de las principales formas de clasificar los AINES:

Tabla II.1 Clasificación de AINES según su estructura química (3, 29).

<b>Ácidos carboxílicos</b>	<b>Ácidos enólicos</b>
Ácidos / esteres salicílicos	Pirazolonas: Fenilbutasona
Ácidos acéticos	Oxicams: Piroxicam
Ácidos fenilacéticos: diclofenaco	
Ácidos acéticos heterocíclicos: indometacina.	
Ácidos propionicos: ibuprofeno, naproxeno	
Ácidos fenámicos: Flufenámico: Flufenámico	

Tabla II.2 Clasificación de AINES en base a su mecanismo de Acción (29).

<b>Tipo 1</b>	Fármacos que previenen la excitación de los nociceptores: antihistamínicos
<b>Tipo 2</b>	Fármacos que intervienen en la regulación a la alta de los nociceptores: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibidores de la enzima COX-2, AINES.</li> <li>• Antagonistas de la liberación de prostaglandinas: antagonistas de interleucina 1.</li> <li>• Inhibidores de fosfolipasa A<sub>2</sub>: glucocorticoides</li> <li>• Simpaticolíticos: beta bloqueadores, antagonistas de dopamina-1</li> </ul>
<b>Tipo 3</b>	Fármacos que regulan a la baja el nociceptor: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Analgésicos que directamente regulan a la baja el nociceptor: dipirona, opioides.</li> <li>• Analgésicos que indirectamente regulan a la baja el nociceptor: clonidina.</li> </ul>

Tabla II.3 Clasificación de AINES según su capacidad de inhibición de la COX (3, 25, 29).

<b>Inhibidores no selectivos de COX-2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Derivados del ácido salicílico: aspirina, salicilato de sodio, diflunisal, sulfasalazina, olsalazina.</li> <li>• Derivados del p-aminofenol: acetaminofén</li> <li>• Ácidos indól e indenacéticos: indometacina y sulindac.</li> <li>• Ácidos heteroarilacéticos: tolmetín, diclofenaco, Ketoprofeno.</li> <li>• Ácidos arilpropiónicos: ibuprofeno, naproxeno, flurbiprofeno, ketoprofeno.</li> <li>• Ácidos antranílicos (fenamatos): Ácidos mefenámico, ácidos meclofenámico.</li> <li>• Ácidos enólicos: piroxicam, meloxicam, tenoxicam, fenibutazona.</li> <li>• Alcanonas: nabumetanona.</li> </ul>
<b>Inhibidores selectivos de COX-2</b>	<p>Furanonas diaril-sustituidas: rofecoxib.</p> <p>Pirazoles diaril-substituidos: celecoxib.</p> <p>Ácido indolacético: etodolac</p> <p>Sulfonanilidas: nimesulida.</p>

## *II.2. Antecedentes del problema.*

### *II.2.1 Herbolaria y la medicina tradicional.*

La herbolaria estudia las propiedades curativas de plantas y hierbas medicinales que provee la naturaleza. Es una forma de medicina tradicional que desde hace siglos se ha practicado, la cual tiene su justificación, ya que las plantas poseen un gran número de compuestos biológicamente activos y con propiedades benéficas como dañinas (6, 7, 31-33).

Desde sus inicios las comunidades primitivas como los egipcios, griegos y romanos en su necesidad de curar sus dolores, padecimientos y enfermedades, tuvieron en las plantas medicinales la herramienta adecuada para cuidar su salud y tener una mejor calidad de vida, conocimiento que después se vio incrementado de manera clave por la contribución del Lejano Oriente y por la tradición herbolaria del Nuevo Mundo, y como parte importante de la medicina tradicional de México y sus múltiples especies vegetales (31-33).

Dependiendo de la planta y del tratamiento, toda la especie vegetal o parte de ella es utilizada para el remedio. En medicina tradicional, pueden utilizarse hierbas frescas, en forma de infusión, o se pueden secar, cortar y pulverizar para su uso (6).

Una de las formas de empleo de las especies medicinales es a manera de té, aunque también se usan en forma de cataplasmas, "pomadas", y en forma de aromas (aromaterapia). Como es bien conocido, en el mercado se venden varias plantas medicinales y es común encontrar en las tiendas y supermercados diversas marcas té que se usan para varios padecimientos, principalmente como tranquilizantes, antiinflamatorios, antipiréticos o simplemente por su olor y sabor agradable. El éxito de estos productos naturales es debido a que efectivamente contienen principios activos que ayudan en los padecimientos para los que son empleados, aparte de que son económicos y fáciles de usar (6, 32, 33).

Tabla II.4 Algunos de los tés más usados y sus propiedades medicinales (1, 6, 34, 35).

<b>Te (especie vegetal)</b>	<b>Propiedades atribuidas</b>
Anís ( <i>Pimpinella anisum</i> )	Evita trastornos digestivos, cólicos y gases estomacales.
Canela ( <i>Cinnamomun zeylanicum</i> )	Actúa como un suave astringente, ayuda a las molestias de la diarrea.
Hierbabuena ( <i>Menta viridis</i> )	Refuerza el estómago, es útil en la preparación de comidas, calma cólicos estomacales, trastornos de la digestión, cáncer de estómago; elimina parásitos intestinales y el reumatismo.
Jamaica ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> )	Favorece de buena manera el proceso digestivo, ligeramente laxante, diurético, antiparasitario y puede llegar a ser muy bueno para tratar el colesterol.
Limón ( <i>Citrus aurantifolium</i> )	Combate la hinchazón intestinal, favorece la digestión estomacal, descongiona el hígado y es un desintoxicante natural.
Manzanilla ( <i>Matricaria chamomilla</i> )	Estimula el apetito, la secreción de jugo gástrico, favorece la digestión, combate los gases intestinales, facilita y favorece la menstruación, alivia la conjuntivitis. Actúa contra enfermedades nerviosas, fiebres, calambres, inflamaciones, reumatismo e insomnio.
Naranja ( <i>Citrus aurantium</i> )	Sirve como calmante de los nervios.
Verde ( <i>Camellia sinensis</i> )	Tiene gran cantidad de antioxidantes.

### II.2.2 Especies vegetales seleccionadas.

Como se ha presentado antes, existe un gran número de plantas con principios activos y actividad biológica, los cuales pueden ser fuente de nuevos principios activos para tratar enfermedades, en este caso particular nos interesa el dolor, una de las afecciones más comunes y generalmente siempre presente a lo largo de la vida.

A pesar del gran número de especies vegetales con principios activos ya reportados, todavía existen muchas plantas descritas dentro de la medicina tradicional de las cuales aún no se ha confirmado su efecto terapéutico y mucho menos sus agentes biológicamente activos. Para este trabajo se seleccionaron 4 especies vegetales algunas descritas dentro de la medicina tradicional Mexicana y con estudios previos sobre efectos analgésicos (6, 35, 36).

Genero *Bidens*: Aceitilla (*Bidens odorata*):

Características: Es una hierba que mide de 10 a 80cm de altura y tiene tallos angulosos de color púrpura. Sus hojas suelen estar divididas como en cinco pequeños fascículos. Sus cabezuelas son parecidas a la margarita, las 5 flores de alrededor presentan lengüetas blancas con líneas púrpuras, mientras las centrales son flores tubulosas y amarillas.

Los frutos son largos y angostos, van del color café al negro (35).

Usos : Dentro de la medicina tradicional, las especies del género *Bidens* se usan para tratar malestares como: dolor de estómago, dolor de huesos, dolor de pulmones y dolor de cabeza (35).



Figura II.6 *Bidens odorata*.

Genero *Buddleja*: Tepozán (*Buddleja cordata*).

Características: Es una planta que mide 2 m de altura aproximadamente. La hoja es ancha, mide 30 cm x 15 cm de ancho, de color verde brillante, cuando todavía no está madura, cuando madura tiene las hojas grises y son más chicas, como de 8 cm de largo, el palo es más duro, puede alcanzar hasta los 3 m de alto. La flor es chica, se da en racimos en la punta de las ramas. Nada más crece en el arroyo, los aguajes, no crece en los montes (35).

Usos: En las especies del género *Buddleja* se le atribuyen las propiedades medicinales contra problemas dermatológicos como ronchas, heridas e inflamación de la piel (35).



Figura II.7 *Buddleja cordata*.

Genero *Zaluzania*: Limpia tunas (*Zaluzania augusta*)

Características: Es un arbusto con flores atractivas, planta común en regiones semiáridas, sobre superficies con suelos degradados o en matorrales xerófilos, y acompañando caminos. Tiene la superficie de la hoja verde oscura y el haz gris, el ápice agudo, las lígulas de las flores con dos lóbulos y las páleas con glándulas sésiles. El vilano de las flores liguladas generalmente consiste de 4 escamitas (36).

Usos: En las especies del género *Zaluzania* se reportan dentro de la medicina tradicional para tratar inflamaciones de la piel y dolores de estómago (6).



Figura II.8 *Zaluzania augusta*

Género: *Matricaria*: Manzanilla (*Matricaria Chamomilla*)

Características: Hierba anual que alcanza, de 25 a 50cm de altura y por lo general se ramifica. Las hojas están divididas en dos o tres partes, parecidas a encajes finos. Las cabezuelas son conjuntos de flores, con los centros amarillos y tienen florecillas de color blanco en la periferia, con pétalos largos caídos hacia afuera.(35)

La manzanilla es originaria de Europa y el Oeste de Asia. Habita en climas cálido, semicálido, semiseco y templado, desde los 200 y hasta los 2750 m sobre el nivel del mar. Es una planta silvestre, cultivada en huertos familiares y crece en terrenos de cultivo abandonados(35, 37).

Usos: Esta planta se emplea para atender trastornos de carácter digestivo como vómito, diarrea, cólicos, dispepsia, cólico biliar, empacho, reconfortar el estómago, estimular el hambre, en casos de cólicos con gas en niños, cólicos intestinales, malestar estomacal, espasmos, gastritis nerviosa, indigestión, disentería e infecciones en el estómago. En los padecimientos ginecobstétricos, se usa para la dilatación de la vagina durante el parto, para acelerar el alumbramiento. Es indicado en afecciones de los ojos, como inflamación, cansancio, irritación, lagañas, ardor y para lavados de ojos. Se le emplea para la picadura de alacrán, como desinfectante ligero, para lavar heridas, tejidos desplazados, fiebre, calentura y para aclarar el cabello. En el estado de Hidalgo se ocupa para aliviar el dolor de rodillas, tratar la parálisis, reumatismo, heridas y a los tullidos (35).

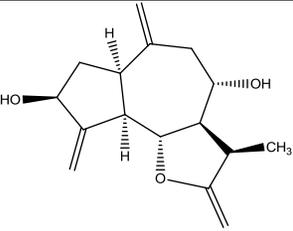
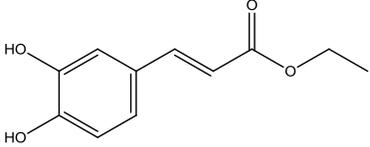


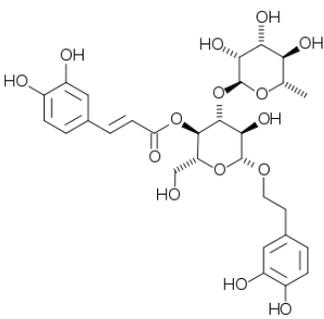
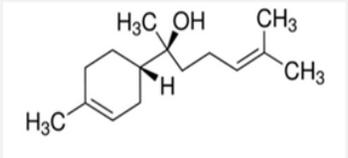
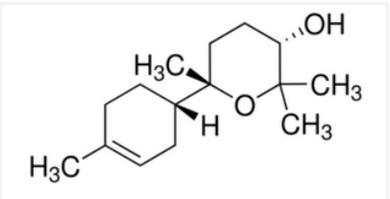
Figura II.9 *Matricaria Chamomilla*

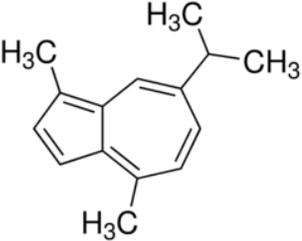
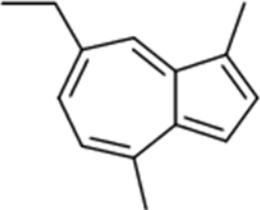
### II.2.3 Metabolitos bioactivos

Se han reportado en la literatura efectos analgésicos y antiinflamatorios presentes en metabolitos secundarios de especies pertenecientes a los géneros mencionados en este trabajo. En la tabla 1 se nombra la especie que se estudió, las pruebas que se aplicaron y los agentes químicos que se identificaron como causantes del efecto terapéutico.

Tabla II.5 Compuestos químicos con actividad analgésica presentes en los géneros propuestos para estudio

Especie vegetal	Componentes químicos	Efectos biológicos	Modelos utilizados	Dosis
<i>Zaluzania augusta</i>	 <p data-bbox="402 1465 695 1560">8[α]-Hydroxy-11[α],13-dihydrozaluzanin C (38-40)</p>	analgésico	Edema de pata en ratón inducido por carragenina.	10,20,30,50,100 y 300 mg/Kg
<i>Bidens odorata</i>	 <p data-bbox="500 1749 594 1808">(41) (42, 43)</p>	analgésico y antiinflamatorio	-----	0.1-20 µg/ml

<p><i>Buddleja globosa</i>, <i>Buddleja cordata</i></p>		<p>Actividad antinociceptiva</p>	<p>Prueba Writhing</p>	<p>200,100,50,25mg/Kg</p>
			<p>Prueba de formalina</p>	<p>5% Peso/volumen</p>
	<p>Verbascoside(44-49)</p>		<p>Tail-flick test</p>	<p>200,100,50,12.5mg/Kg</p>
<p><i>Matricaria Chamomilla</i></p>		<p>Antiinflamatoria</p>	<p>inflamación inducida por carragenina en ratas windstar</p>	<p>350–2000mg/kg</p>
	<p><math>\alpha</math>-Bisabolol(34, 37, 45, 50-53)</p>	<p>Actividad antinociceptiva</p>	<p>Test de plancha caliente</p>	<p>25, 50, 100 and 200 mg/kg.</p>
		<p>Actividad antinociceptiva</p>	<p>Prueba Writhing</p>	<p>25 y 50 mg/kg, p.o.</p>
<p><i>Matricaria Chamomilla</i></p>		<p>Antihiperalgésica y antiinflamatoria</p>	<p>inflamación inducida por carragenina en ratas windstar</p>	<p>25–100 mg/kg, p.o.</p>
	<p>Oxido de Bisabolol A(37, 45, 51, 52)</p>		<p>hiperalgesia : Edema de pata inducido por carragenina con un ensayo modificado 'pata-presión'</p>	<p>25–100 mg/kg, p.o. Efecto pico 40.2–44.7 mg/kg.</p>

Matricaria Chamomilla		Analgesia	Prueba de formalina	25 mg·kg, IP
Guayazuleno(34, 45)				
Matricaria Chamomilla		Antiinflamatori a	inflamación inducida por carragenina en ratas windstar	350–1400mg/kg
Camazuleno(37, 45, 51, 52)				

## II.2.4 .Bases estructurales de la inhibición de la ciclooxigenasa (COX)

### II.2.4.1 .La COX y su funcionamiento.

La COX se purificó en 1976. Un análisis de proteínas y los niveles de ARNm (Ácido ribonucleico mensajero) indican que la enzima está ampliamente distribuida en tejidos de mamíferos y en su mayoría esta expresada constitutivamente. El descubrimiento de la COX-2, fue publicado en informes durante el periodo 1990-1993. El descubrimiento de la COX-2 resultó de los esfuerzos complementarios de varios grupos de investigación que trabajan en áreas muy diferentes y el uso de enfoques muy diferentes. Las principales bases de su descubrimiento incluyen el descubrimiento de dos diferentes ARNm para COX y sus proteínas, una de las cuales se expresa constitutivamente y no se veía afectada por el tratamiento con glucocorticoides, la otra la cual es inducida por citosinas o lipopolisacáridos y su inducción si es inhibida por glucocorticoides ; ( b ) la expresión heteróloga del nuevo gen de la COX y la demostración de que es ciclooxigenasa y tiene actividades de peroxidasa. La nueva proteína de la COX (COX-2) es aproximadamente 60

% idéntica a la previamente conocida de la COX (COX-1), y exhibe un patrón muy diferente en cuanto a regulación y distribución en los tejidos ( 6 ). También existe un contraste con la expresión constitutiva de la COX-1 en relación con la COX-2, esta se expresa constitutivamente en una gama más estrecha de tejidos, pero es fuertemente inducible en respuesta al tratamiento de las células con una gama extremadamente amplia de agonistas , incluyendo citosinas, factores de crecimiento , promotores de tumores , virus, lipopolisacáridos bacterianos, y la tensión de flujo laminar entre otras cosas. La inducibilidad de la COX-2, en particular en macrófagos tratados con citosinas, y su inhibición por esteroides anti-inflamatorios surgieron que la COX-2 es la verdadera diana molecular para los efectos antiinflamatorios de los AINE. Además, la presencia de la COX-1 en el tracto gastrointestinal dio lugar a lo la hipótesis de que la inhibición de la COX-2 es responsable de los efectos antiinflamatorios de los AINES, mientras que la inhibición de la COX-1 es responsable de algunos de sus efectos secundarios no deseados, específicamente la toxicidad gastrointestinal. La última parte de la hipótesis es coherente con el hecho de que los AINE existentes inhiben ambas enzimas COX en distintos grados (18, 22, 24, 25).

La COX cataliza la doble di-oxigenación del ácido araquidónico a endoperóxidos de prostaglandina  $PGG_2$ , y  $PGH_2$ , y por esta razón también se llama prostaglandina G / H sintasa. La oxigenación de ácido araquidónico se produce en el sitio activo de la ciclooxigenasa, y la reducción de  $PGG_2$  a  $PGH_2$  se produce en el sitio activo de la peroxidasa. Ambos sitios activos están presentes en la proteína de la COX, aunque en lados opuestos de la molécula. El grupo prostético hemo conecta los dos sitios activos, espacial y funcionalmente. Los AINE se unen al sitio activo de la ciclooxigenasa y evitan la unión del ácido araquidónico. El punto de control importante en la biosíntesis de PG es la liberación del sustrato: ácido araquidónico proveniente de fosfolípidos, después de la estimulación celular. El tratamiento de células o tejidos con una amplia gama de agonistas o estímulos físicos provoca la activación de fosfolipasas que dan lugar a la liberación del ácido araquidónico; el ácido araquidónico se oxigena por la COX a  $PGH_2$ .  $PGH_2$  se difunde desde la proteína de la COX y es convertido por múltiples isomerasas o una reductasa a uno de los cinco metabolitos diferentes finales. Estos son  $PGE_2$ ,  $PGD_2$ ,  $PGF_2$  a, prostaglandina  $I_2$  ( $PGI_2$ ) , y el tromboxano  $A_2$  ( $TXA_2$  ). La mayoría de los tejidos convierten

PGH<sub>2</sub> a algunos de los productos finales pero no en los cinco. Por ejemplo, las plaquetas de la sangre hacen TxA<sub>2</sub> y PGD<sub>2</sub>, y el endotelio vascular hace PGI<sub>2</sub> y PGE<sub>2</sub>.

Existe un panel de complejos receptores para las PGs y TxA<sub>2</sub> que comprende una familia de receptores acoplados a proteínas G y sus variantes de empalme. Se han generado animales con deleciones específicas para muchos de estos receptores y han ayudado a definir las funciones de los PGs individuales y TxA<sub>2</sub> en una serie de respuestas fisiológicas y fisiopatológicas. Los AINE que inhiben el primer paso en esta cascada compleja, son agentes farmacológicos clave dadas las complejas redes de señalización que interrumpen. Es útil recordar que sus efectos benéficos en seres humanos aquejados de inflamación, dolor y fiebre, se han documentado durante miles de años (1, 23-25).

#### *II.2.4.2 .Características de la COX*

La COX es una hemoproteína, siendo un dímero de subunidades de 70 kDa. Los sitios activos de la ciclooxigenasa son altamente homólogos. Aunque la similitud global entre la COX-1 y COX-2 es de aproximadamente 60%, la similitud en el sitio activo es mayor ( ~ 85 % ), lo que limita las posibles interacciones que pueden dar lugar a la selectividad. Los sitios activos están situados en el extremo de un largo canal que se extiende desde el dominio de unión a membrana al interior de la proteína. La región proximal a la membrana se separa del sitio activo por una puerta que se debe abrir para permitir al sustrato o inhibidor la unión. Todos los inhibidores o sustratos de la COX, selectivos o no selectivos, se unen en el sitio activo por la misma localización. Primero existe un residuo puerta el cual es un aceptor de protón que adquiere una carga positiva y se une a las cargas negativas de sustratos e inhibidores de ácido carboxílico (por ejemplo, salicilatos, profenos, ácidos indolacéticos etc). Dos sitios activos más, ambos clave para la actividad de la ciclooxigenasa ya sea 1 o 2, la diferencia radica en que se sabe que uno de estos es susceptible de ser acetilado por el ácido acetyl salicílico con la consecuencia de que el sitio catalítico completo pierde actividad enzimática (23-25, 30).

Aunque la similitud entre los sitios activos de la COX-1 y COX-2 es grande, el sitio activo de la COX-2 es mayor en aproximadamente un 27%. Esto es debido a una mayor presencia

de residuos que funcionan como sitios de unión del sustrato, a la enzima, generalmente 2 o 3 sitios de unión, aunque estos sitios pueden o no unirse a los sustratos ya sean endógenos o exógenos, su presencia permite cierta selectividad, tal es el caso de los inhibidores selectivos de la COX-2; muchos inhibidores de la COX-2 presentan un grupo sulfona los cuales tienen preferencia por grupos funcionales electrodonadores como es el caso del residuo Valina, este tipo de residuos con grupos electrodonadores son los que generalmente se pueden hallar en los sitios de unión de sustrato-enzima que presenta la COX-2 (24, 25, 30).

#### *II.2.4.3 .Inhibidores de la COX*

Se ha sabido durante más de 30 años que ciertos inhibidores de la COX son inhibidores lentos, de unión fuerte. Sólo un complejo de AINE-COX es covalente, es cuando la enzima es acetilada por reacción con la aspirina. Los complejos enzima-inhibidor restantes no son covalentes, pero algunos son tan estables que se funcionalmente se consideran irreversibles (11, 23, 25, 30).

El ensayo predictivo más ampliamente utilizado para la selectividad *in vivo* de la COX-2 es el ensayo completo de sangre humana. Esto se desarrolló originalmente como una manera de supervisar la inhibición de la COX, después de la dosificación en vivo de fármacos. Se ha adaptado un ensayo *in vivo*, en el que estrictamente las muestras de sangre se utilizan como una fuente de plaquetas de la COX-1 y los macrófagos de la COX-2, puede haber versiones más completas del mismo estudio con el empleo de células cancerosas. Los diversos ensayos completos de sangre proporcionan una estimación de la potencia y la selectividad de la inhibición hacia las dos enzimas de COX, en el contexto de la unión a proteínas plasmáticas. La tabla (Tabla II.6) recoge algunos valores de  $CI_{50}$  y  $CI_{80}$  de AINE y Coxibs determinados en el ensayo de sangre. Una amortiguación general de relaciones de selectividad se observa para valores determinados en el ensayo de sangre en comparación con los reportados usando enzimas purificadas o fracciones microsomales. Además, se observan algunos cambios bastante sorprendentes en orden de rango de selectividad. Por ejemplo, el Celecoxib muestra menor selectividad por la COX-2 en el ensayo de sangre en

comparación con su selectividad frente a extractos de células de insecto que expresan enzimas recombinantes (25, 28, 30, 54).

De hecho el Celecoxib parece comparable a la del diclofenaco (AINE) en el ensayo de sangre, un resultado que se correlaciona con los resultados de toxicidad gastrointestinal en pruebas clínicas. Los datos de la Tabla (Tabla II.6) son útiles para la estimación de los efectos farmacodinámicos y toxicodinámicos de los diversos compuestos cuando se combinan con los niveles de plasma y para la vida media de los agentes individuales (25, 54).

Tabla II.6 IC<sub>50</sub> de todos los compuestos ensayados como inhibidores de la formación de PG, determina en el ensayo de la COX-1 y COX-WHMA-2(25).

Compuesto	COX-1		WHMA-COX-2		IC <sub>50</sub> Relación (cociente)	IC <sub>80</sub> Relación (cociente)
	IC <sub>50</sub> , μM	IC <sub>80</sub> , μM	IC <sub>50</sub> , μM	IC <sub>80</sub> , μM	WHMA/COX-1	WHMA/COX-1
Aspirina	1.7	8.0	7.5	30	4.4	3.8
Diclofenaco	0.075	1.0	0.020	0.23	0.3	0.23
Flufenamato	3.0	80	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Flurbiprofeno	0.075	1.0	0.77	51	10	51
Ibuprofeno	7.6	58	20	150	2.6	2.6
Indometacina	0.013	0.46	0.13	2.0	10	4.3
Ketoprofeno	0.047	1.0	0.24	6.0	5.1	6.0
Meclofenamato	0.22	3.0	0.2	1.0	0.91	0.3
Naproxeno	9.3	110	35	330	3.8	3.0
Piroxicam	2.4	15	0.17	7.0	0.1	0.47
Sulindac	1.9	3.8	1.21	11	0.64	0.29
Celecoxib	1.2	28	0.34	3.0	0.3	0.11
Meloxicam	5.7	22	0.23	2.0	0.040	0.091
Rofecoxib	63	>100	0.31	5.0	0.0049	<0.05
Salicilato de sodio	4956	49000	482	45000	0.10	0.92

### *II.2.5 Técnicas para estudio de productos naturales.*

La farmacognosia se encarga del estudio de la composición de los efectos de los principios activos de las sustancias de origen vegetal y animal. Este se concentra en realizar ensayos para la caracterización y valoración de estas sustancias, así como determinar la farmacología y las principales aplicaciones que podría tener. Las plantas elaboran en su metabolismo una serie de sustancias llamadas metabolitos secundarios, a los cuales también se les podría denominar principios activos. Cada una de estas sustancias es la responsable de los efectos farmacológicos y por ello se les puede otorgar un efecto (6, 55, 56).

La investigación fitoquímica utiliza métodos de separación, fundamentalmente cromatográficos, y métodos de elucidación estructural, principalmente espectroscópicos como Resonancia Magnética Nuclear (RMN) o espectroscopia de infrarrojo (IR) (8, 55, 56)

Para identificar los componentes que podrían estar presentes en las especies vegetales, es necesario implementar técnicas cromatográficas y espectroscópicas para su determinación y realizar extracciones reproducibles, cuantitativas, estables y eficientes para realizar los estudios necesarios y demostrar el efecto buscado. El tamizaje consiste en realizar una extracción de los metabolitos que se encuentran en el material vegetal, utilizando diferentes disolventes con polaridad creciente, generalmente comenzando con hexano, e ir aumentando la polaridad con cloroformo, acetato de etilo, metanol y etanol (6, 8, 56, 57). Este procedimiento ayuda a que la extracción con diferentes polaridades arrastre diferentes metabolitos secundarios y de esta forma poder purificarlos más fácilmente.

Existen varios métodos de separación e identificación de compuestos químicos. Entre los más usados para separar de compuestos se encuentran la sublimación, destilación, cromatografía y la cristalización fraccionada, el más utilizado es la cromatografía. Una vez separados los compuestos por alguna de estas técnicas, se recurre a métodos como espectroscopia y resonancia magnética nuclear para identificación de compuestos químicos (5, 6, 56).

### *II.2.5.1 Cromatografía.*

Esta técnica se usa para obtener los componentes individuales puros de una mezcla y determinar su proporción. En ésta técnica las moléculas se distribuyen entre dos fases distintas, y la separación tiene relación directa con la diferencia de solubilidad y polaridad que muestren las moléculas en cada fase. Las separaciones se obtienen al introducir una mezcla de compuestos orgánicos en una fase estacionaria, dejando luego que una fase móvil fluya a través de la muestra. Los diversos métodos cromatográficos varían respecto a la fase móvil (líquido o gas), la fase estacionaria (papel, gel o empaque sólido) y la fuerza que impulsa a la fase móvil (presión, gravedad o un campo eléctrico) (6, 56, 58, 59).

Existen diferentes métodos cromatográficos, uno de ellos es la cromatografía en papel que se aplica a productos polares como carbohidratos, aminoácidos, ácidos orgánicos y fenoles. En este método la separación se realiza sobre tiras de papel poroso, participando tanto fenómenos de partición como de adsorción. La cromatografía en capa fina se emplea para la separación de mezclas de toda clase de productos naturales y las condiciones de separación se eligen en función de las características de la mezcla a separar. Otro método es la cromatografía en columna que involucra la adsorción de un compuesto a una fase estacionaria y la elución con disolventes de diferente polaridad. También se emplea la cromatografía flash que tiene el mismo principio que la cromatografía en columna aplicando una presión en la parte superior, en función de aumentar el flujo de la fase móvil. La cromatografía de gases es un método que permite separar e identificar extractos que por su complejidad o cantidad de extracto, no es posible separar con las técnicas cromatograficas previamente descritas. Estos métodos y otros similares sirven para identificar principios activos, drogas, metabolitos secundarios, tinturas, entre otros compuestos químicos (6, 56, 58, 59).

### *II.2.5.2 Espectroscopia.*

La espectroscopia comprende un conjunto de técnicas que miden la respuesta de una molécula a la aportación de energía. El espectro resultante es una serie de bandas que muestran la magnitud de la respuesta en función de la longitud de onda de la energía incidente. La fuente de energía puede ser de fotones ópticos (espectroscopia ultravioleta,

visible e infrarroja) o de energía de radiofrecuencia (espectroscopia de resonancia magnética nuclear). Esta técnica se utiliza una vez que la mezcla se haya separado en sus componentes y de esta forma interacciona con la radiación electromagnética (56, 58, 59).

### *II.2.5.3 Resonancia Magnética Nuclear.*

Un núcleo que contiene un número impar de partículas subatómicas (Protones y neutrones) tiene espín nuclear y es magnéticamente activo. Estos núcleos se comportan como si giraran en torno a un eje y presentan un comportamiento de un imán diminuto. Cuando un núcleo con un espín activo se coloca en un campo magnético grande, su orientación con respecto al campo magnético extremo define estados de energía cuantizados para el núcleo, en el caso del hidrógeno ( $^1\text{H}$ ) la alineación puede ser a favor o en contra del campo externo. Los núcleos se pueden inducir a saltar de un estado de espín de baja energía a uno de mayor energía por medio de energía electromagnética de una frecuencia tal que coincida con la diferencia de energía entre los dos estados. A la inversa cuando un núcleo en el estado de mayor energía cae al estado de más baja energía, emite energía electromagnética en su frecuencia correspondiente frecuencia. El espín que da origen a ambos estados es una propiedad del núcleo del átomo, y la técnica se conoce como Resonancia Magnética Nuclear (RMN) (57, 59, 60).

Las señales de protones en los espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , como las de los carbonos en RMN  $^{13}\text{C}$ , se registran como máximo de absorción individuales correspondientes a los núcleos no equivalentes. Este tipo de espectro proporciona cuatro elementos de información importantes: el número de señales distintas, el desplazamiento químico, el patrón de desdoblamiento y la integración de la intensidad de señales (57, 58, 60).

La resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  es complementaria a la de  $^1\text{H}$ . Este espectro determina el entorno magnético de los átomos de carbono proporcionando dos elementos básicos de información: el número de señales distintas, que corresponde al número de tipos diferentes de átomos de carbono y el desplazamiento químico de cada señal, que está determinado por el entorno molecular de cada carbono (57, 60).

#### *II.2.5.4 Determinación de Dosis Letal media (DL<sub>50</sub>).*

Se define como la dosis de cierto compuesto o sustancia que provoca la muerte de la mitad de los organismos a experimentar. Uno de los métodos utilizados para tener una aproximación de la DL<sub>50</sub> es mediante el método de Lorke, el cual utiliza grupos pequeños considerando la vía de administración y el animal utilizado se puede establecer diferentes rangos de toxicidad (56, 61, 62).

Un estudio previo de toxicidad DL<sub>50</sub> en extractos vegetales utiliza las siguientes dosis 10, 100 y 1,000 mg/kg. En la segunda etapa con las dosis de 1,600 mg/kg, 2,900 mg/kg y 5,000 mg/kg. De esta manera, se pueden considerar un amplio número de dosis que pudieran causar toxicidad de acuerdo con el método de Lorke (56, 61, 62).

#### *II.2.5.5 Modelos de evaluación de dolor.*

Existe el problema de que el dolor no se puede medir directamente en los animales, pero puede ser estimado mediante el examen de sus respuestas a los estímulos nociceptivos. Los tipos de estímulos nociceptivos (eléctrico, térmico, mecánico o químico) que se han utilizado en los modelos de dolor, generan reacciones motoras que van desde acciones de reflejo a comportamientos complejos (32, 63, 64).

A) La prueba de la placa caliente (Test Hot plate): Esta prueba consiste en introducir una rata o un ratón en un espacio cilíndrico abierto con un piso que consiste en una placa metálica que se calienta por un control de temperatura o un líquido en ebullición. Una placa calentada a una temperatura constante produce dos tipos de comportamiento que se pueden medir, acción de lamer una pata y saltar, estos se cuantifican en tiempo de reacción. Ambos comportamientos se consideran respuestas integrales a nivel sistema nervioso central. En cuanto a sustancias analgésicas se refiere, el comportamiento de lamer una pata se ve afectado únicamente por los opioides. Por el otro lado, el tiempo de reacción de salto se ve incrementado por analgésicos menos potentes, como el ácido acetilsalicílico o el paracetamol (63-65).

B) Inyecciones intradérmicas prueba de la formalina (formalin test): La sustancia más utilizada para inyecciones intradérmicas es la formalina. El término formalina generalmente significa una solución al 37% de formaldehído. Una solución de 0.5 a 15% formalina en una inyección en la superficie dorsal de la pata del ratón o rata, provoca un comportamiento de dolor relacionado a la postura, que puede ser evaluada en una escala de cuatro niveles: 0, postura normal; 1, pata inyectada en el suelo pero no soporta el peso del animal; 2, pata inyectada claramente levantada del suelo, y 3, con la pata inyectada siendo lamida, mordisqueada, o sacudida. Cada comportamiento se considera como una marca de observación y los resultados se expresan en forma continua por unidad de tiempo o en intervalos regulares de tiempo (63-65).

El comportamiento nociceptivo consiste en dos fases, una primera fase, que se produce alrededor de 3 min después de la inyección, y después de un período de reposo, una segunda fase entre los 20 y 30 minutos después de la inyección. Los primeros resultados de la primera fase son la estimulación directa de los nociceptores, mientras que el segundo se refiere a un período de sensibilización durante el cual ocurren los fenómenos inflamatorios (63).

C) Inyecciones intraperitoneales de agentes irritantes, la prueba de contracciones abdominales (Writhing Test): La administración intraperitoneal de los agentes que irritan membranas serosas provoca un comportamiento muy estereotipado en el ratón y la rata que se caracteriza por contracciones abdominales, movimientos totales del cuerpo, (particularmente de las patas traseras), reducción de la actividad motora y falta de coordinación. Estos comportamientos se consideran reflejos y las pruebas se denominan de dolor visceral (63-65).

Este método tiene la ventaja de permitir obtener datos de fármacos con efecto nociceptor débil. Pero carecen de especificidad. Sin embargo este método es útil para identificar moléculas cuyas propiedades farmacodinámicas son desconocidas (63).

### *II.2.6 .Química teórica*

La química teórica es una rama relativamente nueva de la química, pero que ha presentado un avance y crecimiento rápido en los últimos 20 años debido al avance de los sistemas de cómputo ya sean de uso personal, académico o industrial (66).

La química teórica se basa en la química cuántica, la cual a su vez utiliza de principios de física clásica, física cuántica, estadística, teórica atómica y el modelo de átomo de hidrogeno de Bohr, uniendo todo lo anterior con ayuda de complejos modelos matemático los cuales permiten modelar y simular las condiciones, características y estados de los compuestos en su forma libre, en una reacción o en la interacción con seres vivos, esto supone una ventaja ya que los modelos permiten un mayor control de las observaciones y de los factores que estén interactuando (66).

Que se utilicen modelos matemáticos, no es sinónimo de que los resultados no sean observables experimentalmente, un modelo matemático puede ser muy exacto en sus resultados como consecuencia de su complejidad y del número de variables a tener en cuenta. Un mayor uso de variables en los modelos matemáticos acerca más a lo observable experimentalmente, sin embargo también complica el modelo matemático y su resolución en tiempo y esfuerzo. Anteriormente los cálculos y resoluciones matemáticas necesarias para completar y resolver un modelo matemático se hacían a mano con apoyo de un gran número de colaboradores. Sin embargo ahora con el uso de modernos computadores y software de cálculo matemático el tiempo y la necesidad de colaboradores se ha reducido; Ahora un número menor de investigadores pueden resolver modelos matemáticos más complejos en un menor tiempo, con lo cual se aumentan los resultados y las conclusiones obtenidos de estos experimentos (66).

Por las razones antes mencionadas el crecimiento de la química teórica y la química cuántica se ha intensificado a la par del desarrollo de ordenadores de mayor capacidad de procesamiento, más velocidad y con un costo menor en su adquisición. Esto representa una ventaja ya que se puede hacer un análisis teórico del experimento deseado (reacción

química, interacción biológica, interacción con proteínas o receptores) y en base a los resultados arrojados por el modelo matemático tomar la decisión costo beneficio para llevar el trabajo a un nivel experimental de laboratorio (66).

#### *II.2.6.1 .Química Cuántica.*

A principios del siglo veinte, los físicos encontraron que la mecánica clásica no describe correctamente el comportamiento de partículas tan pequeñas como los electrones y los núcleos de los átomos y las moléculas. El comportamiento de estas partículas está regido por un conjunto de leyes denominado mecánica cuántica. La aplicación de la mecánica cuántica a los problemas de la química constituye la Química Cuántica. La influencia de la química cuántica se manifiesta en todas las ramas de la química (66).

Los Físicoquímicos utilizan la mecánica cuántica para calcular (con la ayuda de la mecánica cuántica y la estadística) propiedades termodinámicas (por ejemplo, la entropía, la capacidad calorífica) en los gases; para interpretar los espectros moleculares y calcular propiedades moleculares teóricamente, lo que permite la determinación experimental de estas propiedades moleculares (por ejemplo, longitudes de enlace y ángulos de enlace, momentos dipolares, diferencias de energía entre isómeros de conformación; para calcular propiedades de los estados de transición de las reacciones químicas, lo que permite estimar las constantes de velocidad; comprender las fuerzas intermoleculares; y para estudiar el enlace en los sólidos (66).

Los químicos orgánicos usan la mecánica cuántica para estimar la estabilidad relativa de las moléculas, calcular las propiedades de las especies intermedias de reacción, investigar los mecanismos de las reacciones químicas y analizar los espectros RMN (66).

Los químicos analíticos utilizan de forma habitual los métodos espectroscópicos. Las frecuencias y las intensidades de las líneas de un espectro sólo pueden entenderse e interpretarse adecuadamente, mediante el uso de la mecánica cuántica (66).

Los químicos inorgánicos usan la teoría del campo ligando, un método mecanocuántico, para predecir y explicar las propiedades de los iones complejos de los metales de transición (66).

En el campo de la bioquímica, el gran tamaño de las moléculas biológicamente importantes hace que los cálculos cuánticos de las mismas sean extremadamente difíciles. Sin embargo, los bioquímicos están empezando a sacar provecho de los estudios mecanocuánticos de conformaciones de moléculas biológicas de enlaces enzima-substrato y de solvatación de moléculas biológicas (66).

En la actualidad, varias compañías venden software de computador para realizar cálculos químico-cuánticos moleculares. Estos programas están diseñados para que puedan ser utilizados no sólo por los químicos cuánticos, sino por cualquier químico.

#### *II.2.6.2. Acoplamiento teórico Ligando-Proteína.*

El acoplamiento ligando-proteína se ha convertido en una herramienta poderosa para el desarrollo de drogas. Es considerado uno de los métodos capaces de identificar modos de unión ligando-proteína o ligando-receptor con alta precisión. Esta precisión es esencial para calcular de manera fiable la energía libre de unión del ligando. Se necesitan dichos métodos cuando el modo de unión de los compuestos a estudiar no se pueden determinar experimentalmente, por cuestiones de costos, viabilidad o de tiempo, para esto es necesario la optimización del ligando basado en la estructura química que presente (67, 68).

Varias estructuras de proteínas son objetivos potenciales para la industria farmacéutica, y la importancia del diseño de fármacos basado en estructura ha aumentado tanto, durante los últimos años. Varios métodos computacionales basados en estas estructuras tienen como objetivo la racionalización de los experimentos, centrándose en compuestos más propensos a tener la actividad, biodisponibilidad y toxicidad deseada (67, 68).

En la actualidad, la técnica más común para hacer frente a este problema, se denomina selección de alto rendimiento virtual (VHTS), tiene la intención de clasificar varios miles de moléculas pequeñas (por lo general tomadas de una base de datos) de acuerdo con una serie de propiedades relacionadas con la fijación a una diana farmacéuticamente relevante. Complementario a VHTS se utiliza de manera virtual un diseño racional de fármacos (RDD) el cual sugiere modificaciones basadas en la estructura de un compuesto según su fijación a una diana biológica (67).

Una exploración exhaustiva del espacio de unión para el ligando y las posibles formas de unión no es factible debido a que el tamaño del espacio y el número de posibles uniones crecen exponencialmente conforme aumenta el número de grados de libertad del sistema. Dentro de los métodos que nos permiten simplificar el cálculo de formas de unión se encuentran técnicas denominadas: muestreo heurístico para generar modos de unión. Estas técnicas se clasifican en tres familias principales: a) Enfoque derivado de búsqueda sistemática, b) Técnicas de simulación de dinámica molecular y c) métodos estocásticos (67).

a) Los métodos de búsqueda sistemática serían demasiado costosos para ser aplicados directamente, pero varios enfoques sistemáticos se combinan para mejorar la técnica, un ejemplo es el denominado reconstrucción incrementada del ligando. El principio general de este último es dividir al ligando en fragmentos rígidos y flexibles los cuales se acoplan en la superficie de la proteína en la posición y sitio más conveniente, posteriormente el ligando se reconstruye sobre la posición seleccionada previamente (67).

b) Técnicas de simulación de mecánica molecular estándar (dinámica molecular y la reducción al mínimo) son atractivos debido a sus fundamentos físicos en que se basan, pero consumen tiempo y no son efectivas en cruzar las altas barreras de energía libre de moléculas biológicas, dentro de un tiempo de simulación relativamente corto. Sin embargo, la reducción de las fuerzas de Van Der Waals y las repulsiones electrostáticas son una manera excelente de seleccionar conformaciones o posiciones de ligando para el grupo de

propuestas de unión debido a la reducción de barreras de energía en las conformaciones de transición (67).

c) Métodos estocásticos, son técnicas de optimización en general con una base física limitada, y son capaces de explorar el espacio de búsqueda para el ligando, ignorando las barreras de energía (67).

Una opción que retoma lo mejor de cada uno de las técnicas anteriores son los algoritmos evolutivos, que son procedimientos de optimización estocástica iterativos donde se genera una población inicial de soluciones y evaluados con respecto a un conjunto de restricciones, descritas por la función de aptitud (características buscadas como: nivel de energía, conformación, etc.) (67).

En el problema de acoplamiento, la función de aptitud describe las interacciones entre el ligando y el receptor. Esta optimización se realiza mediante la variación de los grados de libertad relacionados con el ligando y las posiciones del receptor, así como las orientaciones y conformaciones. Durante el ciclo evolutivo, peores soluciones son susceptibles de ser sustituidos por la nueva generación de respuestas (denominadas descendientes o hijos), creadas a partir de las primeras soluciones (denominadas padres) seleccionadas como las soluciones más aptas. Este proceso se repite hasta que se ha alcanzado una tendencia en la población, o después de un número fijo de generaciones. Los algoritmos evolutivos requieren un equilibrio entre la diversificación y selección, controlando la distribución de soluciones en el espacio de búsqueda (67).

Una diversidad alta combinada con una tasa de renovación lenta de la población conduce a un algoritmo robusto y lento, más o menos similar a una búsqueda de tipo estocástica. Por el contrario, una baja diversidad con una solución rápida, es probable que cause una tendencia prematura. Este sesgo de muestreo, puede ser controlado por los parámetros evolutivos (diversidad de factores o valores, tiempo de generación de poblaciones) es un aspecto muy potente de los algoritmos evolutivos, ya que se pueden sintonizar de acuerdo con la complejidad del problema a resolver (67).

Dos límites se pueden señalar; En primer lugar, este procedimiento no sigue estrictamente una estadística de Boltzmann, y por tanto no proporciona una visión directa sobre las propiedades termodinámicas de un sistema, tales como la energía libre de unión. En segundo lugar, los algoritmos evolutivos utilizan elementos estocásticos, y por lo tanto, la búsqueda de la solución óptima no está garantizada dentro de un período finito de tiempo. Por esa razón se requieren de enfoques híbridos más eficientes, en los que el conocimiento de un problema específico se utiliza para conducir la evolución (estocástico), son ampliamente utilizados para el inicio del acoplamiento (docking) (67).

La mayor parte de los métodos docking utilizan la búsqueda estocástica eficiente de los algoritmos evolutivos para cruzar las barreras de energía y obtener los mínimos, que posteriormente refinan mediante una búsqueda local de minimización de la energía. Con lo anterior se utiliza un enfoque híbrido en el acoplamiento, obteniéndose una respuesta con una mayor probabilidad de veracidad, la cual nos acerca más a la verdad (67, 68).

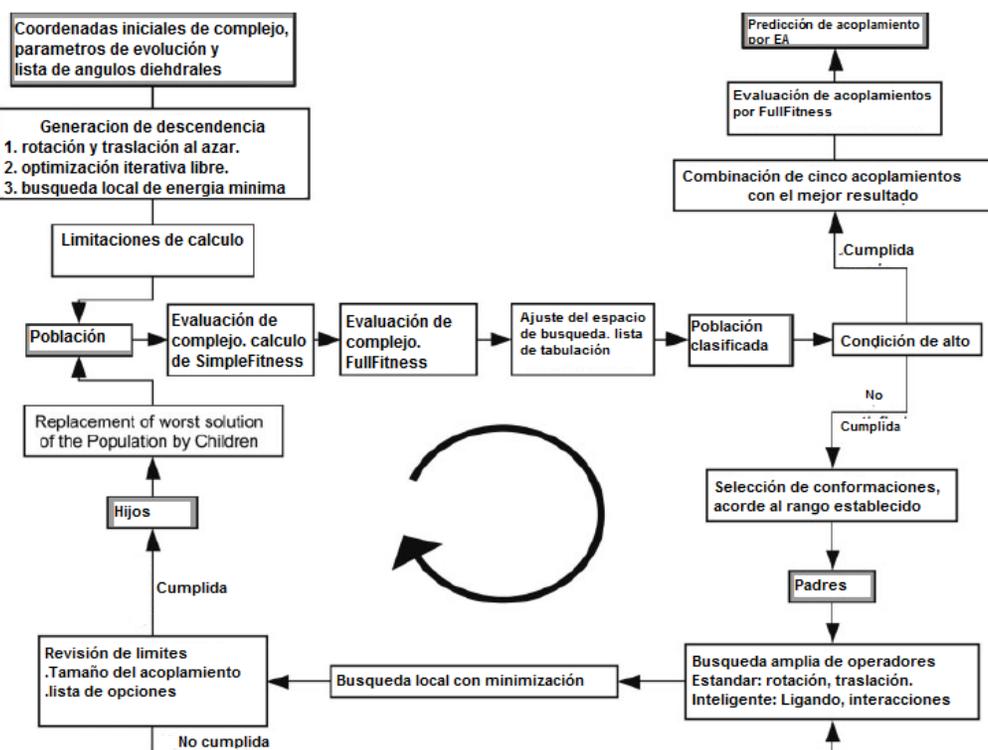


Figura II.10 cuadro de procedimiento de algoritmo de software EADock(67).

En el Figura II.10 representa el esquema del algoritmo usado por el software ocupado para realizar los cálculos en el presente trabajo, llamado EADock, que. En donde se utiliza un algoritmo evolutivo híbrido con dos funciones de aptitud, en combinación con una sofisticada gestión de la diversidad. EADock se interconecta con el paquete de software CHARMM para cálculos de energía y coordinar el manejo de las iteraciones. Los ejemplos que han sido usados para validación de la exactitud el software, están alrededor del 68% de los complejos. La tasa de éxito aumenta a 78% cuando se consideran los cinco acoplamientos mejor clasificados, y el 92% si se tienen en cuenta todos los grupos presentes en la última generación. La mayoría de las fallas podrían explicarse por la presencia de los contactos de cristal en la estructura experimental (67).

### **III. Justificación.**

El dolor es un mecanismo de defensa que alerta del posible daño a un organismo, es un síntoma frecuente dentro de la gran mayoría de las enfermedades y lesiones, en especial cuando la enfermedad es crónica y sus causas son fisiológicas, psicológicas y/o sociales. Esto conlleva que un gasto económico fuerte sea en el tratamiento de la sintomatología del dolor (1).

En la actualidad existen opciones para regular o disminuir el dolor, como los Antiinflamatorios no esteroideos (AINE) sin embargo muchos de estos fármacos presentan inconvenientes, tales como: molestias gastrointestinales, hipersensibilidad, así como riesgo potencial de infarto al miocardio (3). Por lo tanto es necesario seguir investigando opciones de tratamiento del dolor; las plantas medicinales en México son un potencial importante como fuente de nuevos principios activos analgésicos y antiinflamatorios.

Las géneros propuestos en el presente trabajo tienen referencias dentro la medicina tradicional como remedios para tratar el dolor, del mismo modo los antecedentes experimentales indican presencia de sustancias químicas con efecto analgésico en las mismas especies pero pertenecientes a una región geografía diferente, esto hace que sean

una propuesta innovadora para un estudio biodirigido sobre agentes químicos con efecto analgésico.

#### **IV. Hipótesis.**

Los compuestos químicos presentes en las plantas, los cuales han sido derivados del metabolismo secundario de las plantas, presentan actividad biológica, muchos de estos efectos resultan benéficos para el hombre. Debido a que es el metabolismo secundario el que origina estas sustancias activas, especies vegetales pertenecientes a la misma familia pueden contener compuestos químicos con efectos similares, así mismo el metabolismo intermediario se ve afectado por el medio ambiente que rodea a la especie vegetal, por lo cual una misma especie vegetal puede tener variantes de compuestos biológicamente activos, con efecto potenciado, disminuido o de grado intermedio.

Con lo anterior se propone que especies vegetales iguales o pertenecientes al mismo género pero localizadas en México, son capaces de contener compuestos químicos con efectos biológicos similares o potenciados, en este caso efecto analgésico, a los reportados en investigaciones realizadas con especies vegetales de otras regiones o países.

#### **V. Objetivos.**

##### *V.1. Objetivo general.*

Buscar e identificar especies vegetales con metabolitos secundarios que presenten actividad analgésica.

##### *V.2. Objetivos específicos.*

- Seleccionar e identificar de las especies vegetales con posible efecto analgésico.

- Obtener extractos de hexano, acetato de etilo y metanol, de las especies seleccionadas.
- Determinar el extracto con efecto analgésico y/o antiinflamatorio más prometedor, mediante un estudio químico biodirigido.
- Elucidar componentes químicos principales del efecto analgésico y/o antiinflamatorio, mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas de infrarrojo, RMN <sup>1</sup>H.
- Realizar un estudio de tipo docking para proponer mecanismo y afinidad de unión a COX, por parte de los metabolitos encontrados.

## VI. Material y Métodos

### VI. 1 Recolección y preparación de la muestra.

Se recolectaron muestras de las partes aéreas (tallo, flor y hoja) de las plantas de *Bidens odorata*, *Buddleja Cordata*, *Zaluzania augusta* que crece de manera silvestre en las siguientes locaciones:

*Bidens odorata*: Localización: Barrio de Atempa, el Arenal Tizayuca, Hidalgo. Latitud: 19°49'48.59"N Longitud: 98°59'12.23"O Altitud: 2274metros Noviembre 2012.

*Buddleja Cordata*: Localización: Zempoala Hidalgo. Latitud: 19°55'13.53"N Longitud: 98°39'32.31"O Altitud: 2507 metros, Mayo de 2012.

*Zaluzania augusta*: Localización: Comunidad del nopalillo Epazoyucan Hidalgo. Latitud: 20° 3'8.13"N Longitud: 98°36'46.43. Junio de 2013.

La especie se identificó en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), por el M. en C. Manuel Ledesma González.

Se eliminó el exceso de tierra y polvo de las plantas recolectadas con un cepillo de cerdas de plástico y se dejó secar a la sombra por tres semanas. Después se molió las hojas y la flor de cada planta de manera manual.



Figura VI.1 Secuencia de obtención de extractos vegetales

## VI.2 Obtención de extractos vegetales

El proceso de obtención de extractos vegetales se efectuó con las tres especies vegetales: *Bidens odorata*, *Buddleja Cordata*, *Zaluzania augusta*.

### VI.2.1 Extracto hexánico

Se pesaron 250g-500g de la planta molida (hojas y flor), se colocaron en un matraz bola de 2000 ml, se agregaron entre 500 ml a 1000 ml de hexano. Se sometió a extracción por reflujo con calor por 3 horas, finalmente se filtró por gravedad en un embudo con papel filtro. Una vez filtrado se obtuvo el extracto por evaporación a presión reducida en el Rotavapor hasta concentrar a un volumen aproximado de 8 ml. La planta sin solvente se sometió nuevamente al mismo procedimiento dos veces más.

### *VI.2.2 Extracto acetato de etilo*

Se pesaron 250g-500g de la planta molida (hojas y flor), se colocaron en un matraz bola de 2000 ml, se agregaron entre 500 ml a 1000 ml de acetato de etilo. Se sometió a extracción por reflujo con calor por 3 horas, finalmente se filtró por gravedad en un embudo con papel filtro. Una vez filtrado se obtuvo el extracto por evaporación a presión reducida en el rotavapor hasta concentrar a un volumen aproximado de 8 ml. La planta sin solvente se sometió nuevamente al mismo procedimiento dos veces más.

### *VI.2.3 Extracto etanólico*

Se pesaron 250g-500g de la planta molida (hojas y flor), se colocaron en un matraz bola de 2000 ml, se agregaron entre 500 ml a 1000 ml de etanol. Se sometió a extracción por reflujo con calor por 3 horas, finalmente se filtró por gravedad en un embudo con papel filtro. Una vez filtrado se obtuvo el extracto por evaporación a presión reducida en el Rotavapor hasta concentrar a un volumen aproximado de 8 ml. La planta sin solvente se sometió nuevamente al mismo procedimiento dos veces más.

### *VI.2.4 Extracto etanólico de Matricaria Chamomilla.*

En el caso del extracto etanolico de *Matricaria Chamomilla* proporcionado por el Profesor-Investigador Dr. Mario I. Ortiz, el cual ha dado resultados positivos en pruebas de tipo sinérgicas en combinación con AINES, lo anterior es una de las razones de su elección (29).

### *VI.3.Dosis Letal media (DL<sub>50</sub>)*

Para la determinación de la dosis letal media aguda de los 8 extractos obtenidos se utilizaron 147 ratones CD1 machos procedentes del Bioterio de la UAEH, con una masa corporal comprendida entre 25 y 30 g, los cuales fueron mantenidos en un cuarto a

temperatura constante. La alimentación consistió en alimento TEKLAB global para roedores y agua a voluntad.

Se confeccionaron grupos de 3 animales cada uno, a cada grupo se le administró un extracto disuelto en solución acuosa con 1-2% de Tween 80, dejando un grupo control administrado solo con vehículo. Los extractos de prueba se administraron por vía oral mediante cánula intragástrica, con previa ayuna de 12 h. La administración se dividió en 2 fases de 7 días cada una, en la primera fase los niveles de dosis administrados fueron de 10, 100, 1000 mg/kg; En la segunda fase se administraron dosis crecientes 1600, 2900 y 5000 mg/Kg.

Los animales fueron observados constantemente durante las primeras 24 h, después las observaciones fueron diariamente durante un período de 7 días, en donde se registró cualquier síntoma tóxico. Al finalizar este período se procedió al sacrificio por dislocación cervical. El peso corporal se mido al inicio, y al final del experimento a los 7 días.

#### *VI.4. Prueba de Writhing reflex o prueba de contracciones abdominales.*

En esta prueba se utilizaron 48 ratones CD1, machos procedentes del Bioterio de la UAEH, con una masa corporal comprendida entre 25 y 30 g, los cuales fueron mantenidos en un cuarto a temperatura constante. La alimentación consistió en alimento TEKLAB para roedores y agua a voluntad.

Para el desarrollo de la prueba de Writhing, de los tres extractos de cada una de las tres especies vegetales (*Bidens odorata*, *Buddleja Cordata*, *Zaluzania augusta*), se realizaron grupos experimentales de tres ratones cada uno y uno de control. Las dosis administradas de los extractos vegetales, fueron de 250mg/Kg, 300 mg/Kg, y 1000 mg/Kg.

Lo primero fue la administración vía oral con cánula intragástrica de la dosis correspondientes de extracto (250mg/Kg, 300 mg/Kg, y 1000 mg/Kg) a cada ratón, esto media hora antes de la inducción del efecto nociceptivo. Después de media hora se realizó

la administración del agente nociceptivo causante de dolor, en este caso fue una solución de ácido acético al 1%. La administración de ácido acético vía intraperitoneal, causó inmediatamente un comportamiento muy estereotipado en los ratones, el cual consistió en contracciones abdominales con estiramiento de las patas traseras.

Cuando se observaron las contracciones abdominales, se contó el número de contracciones que sufrió un ratón durante un minuto, el conteo de contracciones peritoneales se realizó cada 5 minutos hasta completar media hora. Posteriormente se pasó al siguiente ratón, repitiendo el proceso. Los resultados se fueron registrando para su posterior almacenamiento en un archivo de Excel y su análisis estadístico.

#### *VI.5 Cromatografía en columna*

Para la purificación de los extractos hexánico, acetato de etilo y etanólico de las especies vegetales antes mencionadas, se utilizaron columnas de vidrio de 50 cm de longitud y 2 cm de diámetro, se empaquetaron con gel de sílice de 60 micras de tamaño de partícula 0.063-0.2 mm. Como eluyentes se utilizaron disolventes purificados previamente por destilación fraccionada, realizando mezclas con hexano, acetato de etilo y etanol, con un incremento a de gradiente de polaridad del 10%. Las fracciones se recolectaron por goteo y se concentraron con el rotavapor. Las fracciones obtenidas se plaquearon usando cromatografía en capa fina para juntar aquellas que presentaron similitud de corrimiento. Este procedimiento se realizó para cada uno de los extractos obtenidos.

#### *VI.6. Cromatografía en Capa Fina*

A cada una de las fracciones de cada extracto se les realizó este análisis fitoquímico de manera preliminar mediante cromatofolios comerciales de vidrio y aluminio recubiertos con gel de sílice 60 F254 Merk, como fase estacionaria, y como eluyentes se utilizaron hexano, acetato de etilo y etanol.

1. Se cortaron las placas a la según las medidas requeridas (4cm x 5cm ó 3cm x 4cm)

2. Sobre la placa se depositó una gota de los extractos fraccionados, con ayuda de un capilar, a una distancia de 0.5 cm del extremo inferior de la placa.
3. Cada placa se introdujo en un recipiente hermético, previamente acondicionado con la mezcla de solvente seleccionado y se mantuvieron en la cámara hasta que se eluyera la muestra. Se retiró de la cámara y dejó secar el solvente.
4. Se sometió a revelado con luz ultravioleta y yodo para determinar su posición relativa en el cromatofolio.

#### *VI.7. Determinación y elucidación de los componentes químicos por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)*

Los espectros de Resonancia Magnética de protón (RMN de  $^1\text{H}$ ) se determinaron en un equipo Varian a 400 MHz, utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna y como disolvente cloroformo deuterado y dimetil sulfóxido (DMSO).

El factor de referencia de frontera (Rf) obtenido en la cromatografía de capa fina, de las fracciones aisladas se observaron con una cámara de ultravioleta con un equipo Modelo C-65.

#### *VI.8. Estudio de acoplamiento molecular (docking) para COX-1 y COX-2.*

Un estudio de tipo docking, en moléculas biológicas, requiere dos modelos moleculares para su realización:

- a) El ligando, sustrato o molécula pequeña a unirse con una proteína, receptor o enzima.
- b) La diana, macromolécula que será la que recibirá al ligando, puede ser un receptor, enzima, proteína o cualquier otra macromolécula.

##### *VI.8.1 Obtención de modelo molecular del ligando (fármaco o producto natural)*

Se construyó el ligando mediante el uso de dos softwares de química:

- a) El primer software que se usó fue ChemBiooffice2010. Los pasos a seguir fueron:

1. Se construyó la molécula en dos dimensiones, usando las herramientas del software ChemBioDraw ultra 12.
2. La molécula se pasó a tres dimensiones con el software Chem3D Pro 12.
3. Se minimizó energía de molécula y optimizó parcialmente la geometría de la estructura mediante un cálculo de mecánica molecular (MM2) con ayuda del software Chem3D Pro 12.
4. La nueva estructura y sus resultados fueron guardados en un archivo con extensión **.pdb**, esto con el fin de que se pueda manipular la información posteriormente.

b) Los segundos softwares usados fueron Gaussian 03W y GaussView 3.0

1. Haciendo uso del archivo **.pdb** anteriormente generado, la información se cambió al formato nativo del software Gaussian 03W.
2. Para la optimización de geometría de la molécula, se realizó un cálculo de tipo Hartree-Fock con la molécula en estado basal, y siendo la molécula neutra (sin carga eléctrica).
3. Terminado el cálculo, la estructura final de la molécula y la información, fueron salvados en un archivo con terminación **.mol2**, para facilitar su posterior manipulación.

#### *VI.8.2 Obtención de modelo de la molécula diana (ciclooxigenas 1 y 2)*

Debido a la complejidad que implica modelar una molécula biológica, tan grande como es el caso de una proteína o enzima, la solución es buscar en los bancos de bases de datos digitales el modelo más actual de la macromolécula requerida.

En este caso se utilizaron dos moléculas dianas:

a) ciclooxigenasa-1(Ptgs1) de rata con número de identificación del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI): 10116, número de identificación de la Base universal de proteínas (Universal Protein Resource, UniProt): Q63921.

b) ciclooxigenasa-2 (PTGS2) de humano con número de identificación del NCBI: 9606, número de identificación de la Base universal de proteínas (Universal Protein Resource, UniProt): P35354

Ambas se obtuvieron de la base de datos perteneciente a la base de datos universal del centro molecular de ciencias de la vida, dependiente del Centro Suizo de Bioinformática (SIB). Ambas moléculas de obtuvieron en formato **.pdb** para su uso posterior.

### *VI.8.3 Realización del docking.*

Una vez que se tuvieron las dos moléculas, diana y ligando, se realizó el proceso de docking. Debido a la complejidad de los cálculos necesarios y el tiempo de cálculo requerido, así como la manera de fijar los parámetros de cálculo, se hizo uso del servicio de software proporcionado por el Centro Suizo de Bioinformática, para la simplificación del cálculo.

Los pasos que se realizaron para hacer el cálculo de docking fueron los siguientes:

- 1) Se accedió al sitio en línea del Centro Suizo de Bioinformática.
- 2) Se accedió a la sección denominada “Submit docking” donde se cargaron los datos de las dos moléculas a analizar en cada experimento.
- 3) En la sección “target” se cargó el archivo de la molécula diana.
- 4) En la sección “ligand” se cargó el archivo de la molécula pequeña del ligando, ya se a un fármaco o un producto natural según sea el caso.
- 5) Una vez que se hubieran cargado los archivos con la información de ambas moléculas, se inició el cálculo con el comando “star docking”.
- 6) Se llenó la información requerida por el sistema, la cual identifica el cálculo y proporcionaba la información para el acceso a los resultados.
- 7) Una vez enviado el cálculo, este se completó en un periodo que varía de 2 horas a 12 horas dependiendo de la complejidad de las moléculas.
- 8) Se descargan los archivos de resultados en línea y se procede a su análisis e interpretación.

Este proceso se repitió con todos los ligandos con las dos moléculas diana, COX-1 y COX-2. Primero se realizaron los estudios docking de las moléculas activas de los fármacos

analgésicos actualmente disponibles y posteriormente las moléculas de los metabolitos bioactivos.

De los resultados de las uniones enzima-Ligando se tomaron en cuenta solo las energías de unión total y las energías de unión rápida. Ambas se ordenaron en orden ascendente, tomando en cuenta que las menores energías son la unión más estable.

### VI.9 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de la prueba de dolor de contracciones abdominales (prueba de writhing) se utilizó el paquete estadístico GraphPad Prism versión 5.0 que incluye pruebas de ANOVA con un análisis de tipo Tukey, donde se compara si había diferencia significativa de todas las columnas de datos experimentales con el control positivo. Se estableció un intervalo de confianza (IC) del 95% y valor de  $P < 0.05$ . Para el tratamiento previo de los datos de todos los análisis se utilizó Microsoft Office Excel 2007.

## VII. Resultados

### VII.1 Extractos

En la tabla VII.1 se muestra el porcentaje de rendimiento que se obtuvo en cada extracto vegetal.

Tabla VII.1. Rendimientos de extractos vegetales. (Rendimiento calculado a partir del peso de la planta seca (tallo +hoja) y el peso obtenido del extracto)

<b>Planta</b>	<b>Solvente</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
<i>Bidens odorata</i>	Hexano	<b>1.2</b>
<i>Bidens odorata</i>	Acetato de etilo	<b>1.4</b>
<i>Bidens odorata</i>	Metanol	<b>11.7</b>
<i>Buddleja cordata</i>	Hexano	<b>1.5</b>
<i>Buddleja cordata</i>	Acetato de etilo	<b>2.72</b>
<i>Buddleja cordata</i>	Etanol	<b>11.51</b>
<i>Zaluzania augusta</i>	Hexano	<b>3.1</b>
<i>Zaluzania augusta</i>	Acetato de etilo	<b>5.9</b>
<i>Zaluzania augusta</i>	Etanol	<b>7.2</b>

## VII.2 Dosis letal media ( $DL_{50}$ )

Los resultados de las dos fases de evaluación de la dosis letal media, con ratones CD-1, se registran en la siguiente tabla.

Tabla VII.2 Resultados de evaluación de  $DL_{50}$

<b>Extracto</b>	<b>Fase 1 (10,100 y 1000 mg/Kg)</b>	<b>Fase2 (1600,2900 y 5000 mg/kg)</b>
<i>Bidens odorata</i> (hexano)	No mortandad, sin pérdida de peso, sin síntomas adversos	Sin realizar por falta de extracto.
<i>Bidens odorata</i> (acetato de etilo)	No mortandad, sin pérdida de peso, sin síntomas adversos	No mortandad, pérdida de peso, piloerección, caída de pelo, piel morada y ojos cerrados(desapareció después de 24 horas)
<i>Bidens odorata</i> (metanol)	No mortandad, sin pérdida de peso, sin síntomas adversos	No mortandad, sin pérdida de peso, sin síntomas adversos
<i>Buddleja cordata</i> (hexano)	No mortandad, sin pérdida de peso, sin síntomas adversos	No mortandad, sin pérdida de peso, sin síntomas adversos
<i>Buddleja cordata</i> (acetato de etilo)	No mortandad, sin pérdida de peso, sin síntomas adversos	No mortandad, sin pérdida de peso, sin síntomas adversos
<i>Buddleja cordata</i> (etanol)	No mortandad, sin pérdida de peso, sin síntomas adversos	No mortandad, sin pérdida de peso, sin síntomas adversos
<i>Zaluzania augusta</i> (hexano)	No mortandad, sin pérdida de peso, sin síntomas adversos	No mortandad, sin pérdida de peso, sin síntomas adversos
<i>Zaluzania augusta</i> (acetato de etilo)	No mortandad, sin pérdida de peso, sin síntomas adversos	No mortandad, sin pérdida de peso, sin síntomas adversos
<i>Zaluzania augusta</i> (etanol)	No mortandad, sin pérdida de peso, sin síntomas adversos	No mortandad, sin pérdida de peso, sin síntomas adversos

## VII.3 Prueba de contracciones abdominales (Prueba de writhing reflex)

En las siguientes grafica se muestran los resultados de las prueba de writhing reflex para las tres especies vegetales estudiadas. El eje X de la gráfica representa el número y tipo de administraciones realizadas durante el experimento. El eje Y indica la media aritmética de contracciones abdominales sufridas por el total de ratones CD-1, en la muestra.

La primera columna de izquierda a derecha corresponde a la administración del vehículo (VEH) también denominado blanco, La segunda columna de izquierda a derecha corresponde al control positivo de indometacina, mostrando en la parte superior el porcentaje de inhibición de las contracciones abdominales. De la tercera columna de izquierda a derecha, son las dosis administradas de los diferentes extractos y el porcentaje de inhibición de contracciones abdominales de cada extracto

### VII.3.1 Aceitilla (*Bidens odorata*)

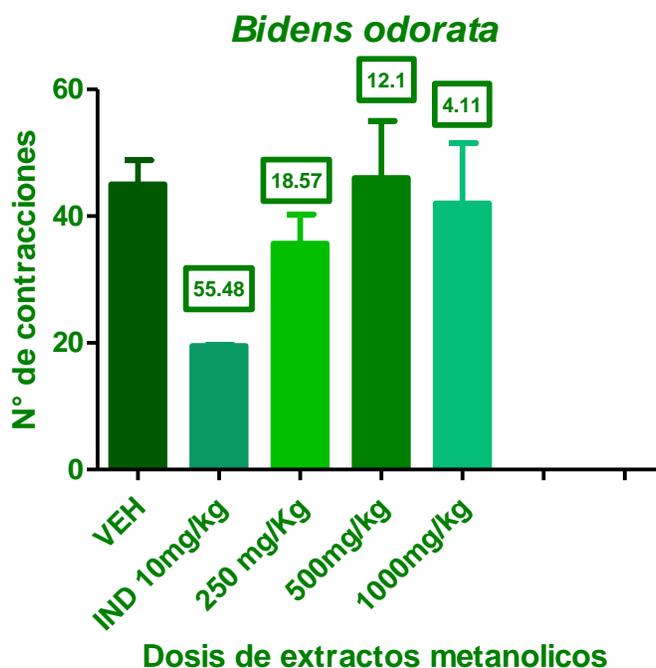


Figura VII.1 Grafica de prueba Writhing reflex para *Bidens odorata*

VII.3.2 *Tepozan (Buddleja cordata.)*

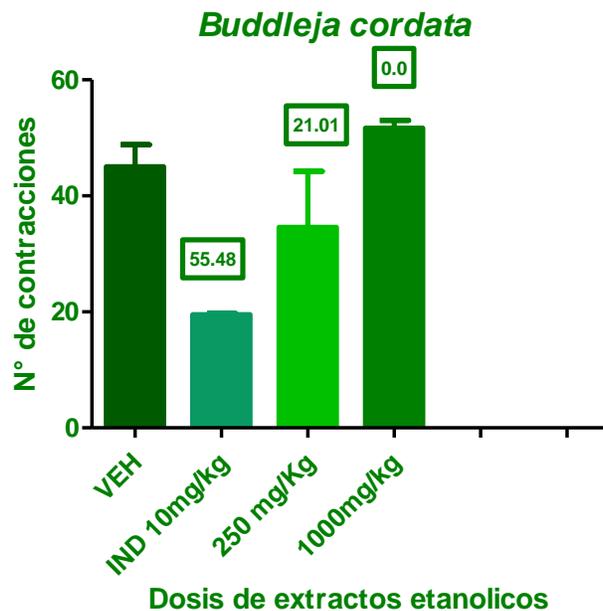


Figura VII.2 Grafica de prueba Writhing reflex para *Buddleja cordata*.

VII.3.3 *Limpia tunas (Zaluzania augusta)*

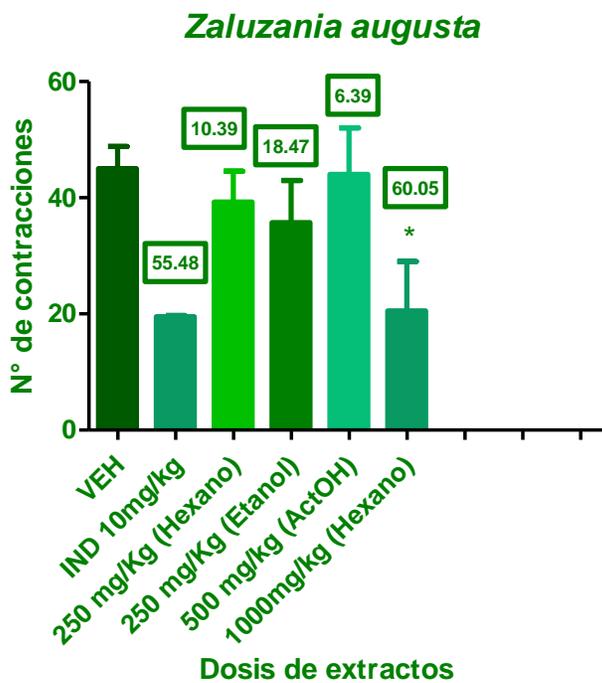


Figura VII.3 Grafica de prueba Writhing reflex para *Zaluzania augusta*.

#### VII.4 El estudio de *Matricaria chamomilla*.

Debido a los resultados obtenidos en las especies previamente mostradas en el presente trabajo, se decidió complementar el estudio con un extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* proporcionado por el Profesor-Investigador Dr. Mario I. Ortiz, cuyos estudios analgésicos previos de *Matricaria chamomilla* dentro de la UAEH (29) han dado resultados positivos en pruebas de tipo sinérgicas en combinación con AINES, el trabajo consistió en identificación de metabolitos con efecto analgésico.

Para la identificación de metabolitos se realizó una separación con técnicas de cromatografía en columna en fase normal, cromatografía en capa fina y para la identificación se utilizó cromatografía en capa fina y RMN de  $^1\text{H}$ . Los metabolitos identificados se muestran a continuación.

Alfa Bisabolol:

Nomenclatura IUPAC: 6-metil-2-(4-metilciclohex-3-en-1-il)hept-5-en-2-ol

Formula molecular:  $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$

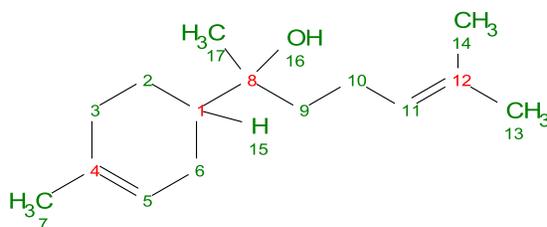


Figura VII.4 Estructura de  $\alpha$ -Bisabolol (sin estereoquímica)

Tabla VII.3 Desplazamientos químicos de  $\alpha$ -Bisabolol RMN  $^1\text{H}$

Número de H	$\delta$ Desplazamiento Químico experimental (ppm)	$\delta$ Desplazamiento Químico simulado (ppm)	$\delta$ Desplazamiento Químico reportado en literatura (Molbase) (69) (ppm)
2'	1.60	1.56	1.49
2''	1.75	1.69	1.79
3'	1.98	1.92	1.91
3''	1.98	1.97	2.01
5	5.34	5.43	5.37
6'	2.03	2.04	1.79
6''	2.07	2.16	2.04
7	1.69	1.65	1.82
9'	1.62	1.55	1.44
9''	1.79	1.78	1.44
10' y 10''	2.05	2.10	1.96
11	5.12	5.18	5.20
13	1.89	1.55	1.82
14	1.65	1.61	1.70
15	1.71	1.46	1.71
16	4.11	3.27	3.65
17	1.32	1.27	1.29

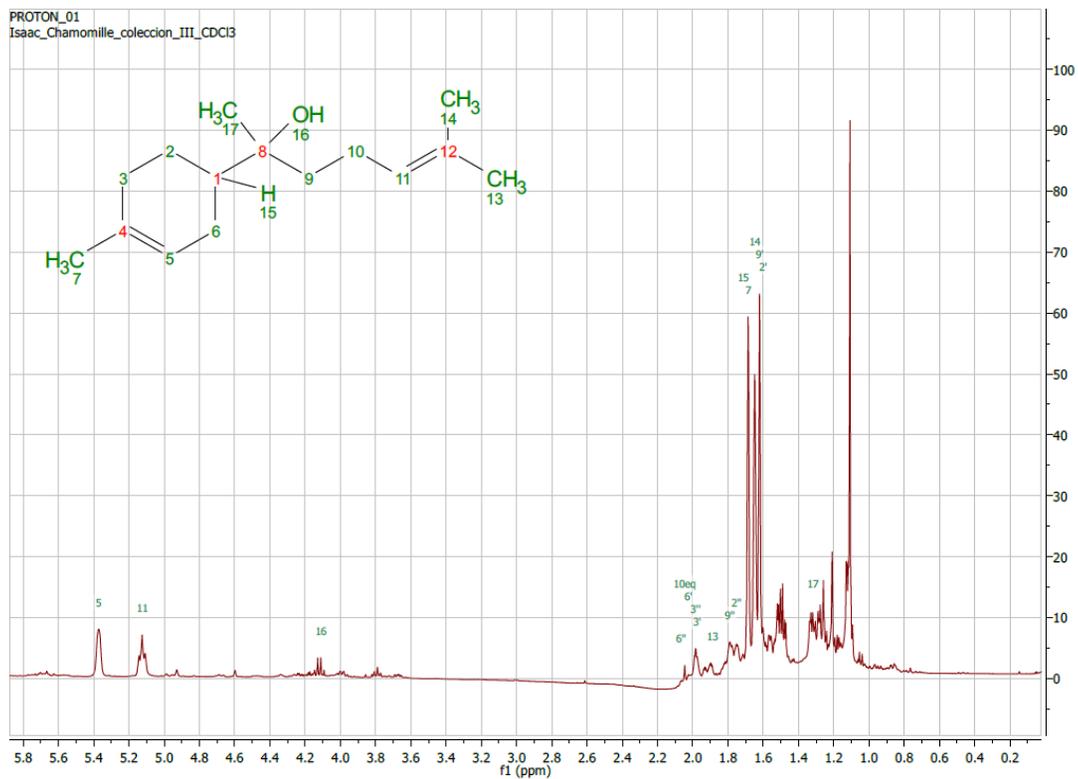


Figura VII.5. Espectro RMN  $^1\text{H}$  experimental de  $\alpha$ -Bisabolol

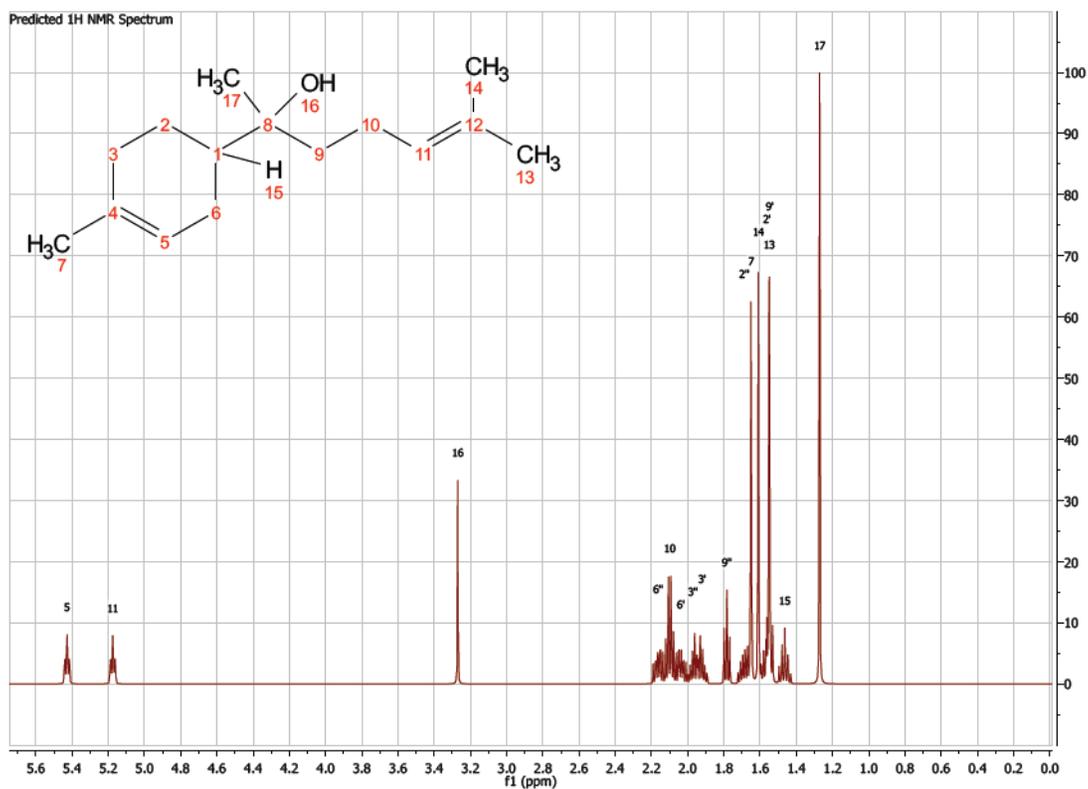


Figura VII.6 Espectro RMN  $^1\text{H}$  simulado de  $\alpha$ -Bisabolol (MestRenova 8.1) (70)

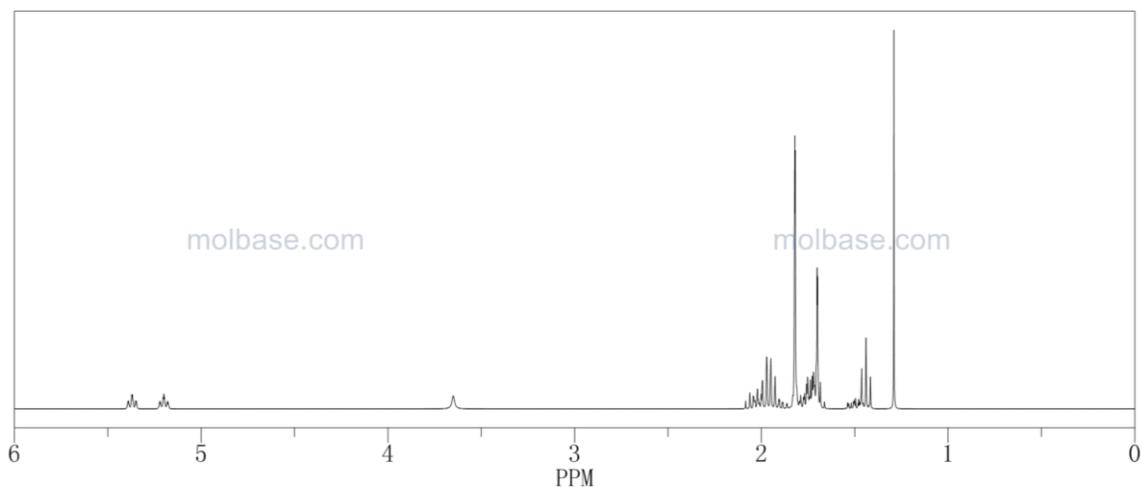


Figura VII.7. Espectro RMN  $^1\text{H}$  reportado en literatura de  $\alpha$ -Bisabolol (Molbase).

Óxido de Bisabolol-A

Nomenclatura IUPAC: (3S,6S)-Tetrahydro-2,2,6-trimetil-6-[(1S)-4-metil-3-ciclohexen-1-il]-2H-piran-3-ol.

Formula molecular:  $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_2$

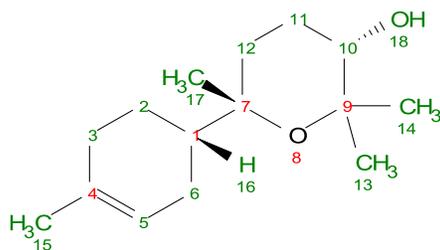


Figura VII.8 Estructura de Óxido de Bisabolol-A

Tabla VII.4 Desplazamientos químicos de Óxido de Bisabolol-A RMN <sup>1</sup>H

Número de H	δ Desplazamiento Químico experimental (ppm)	δ Desplazamiento Químico simulado (ppm)	δ Desplazamiento Químico reportado en literatura (Molbase) (69) (ppm)
2´	1.59	1.49	1.49
2´´	1.64	1.61	1.74
3´	1.87	1.91	1.91
3´´	1.88	1.96	2.01
5	5.27	5.42	5.37
6´	2.11	2.11	1.79
6´´	2.19	2.23	2.04
10	3.35	3.67	3.31
11´	1.74	1.73	1.63
11´´	1.95	2.06	1.88
12´	1.21	1.30	1.40
12´´	1.63	1.67	1.65
13	1.17	1.26	1.24
14	1.09	1.26	1.24
15	1.55	1.65	1.82
16	1.53	1.53	1.95
17	1.01	1.18	1.29
18	2.64	2.61	3.58

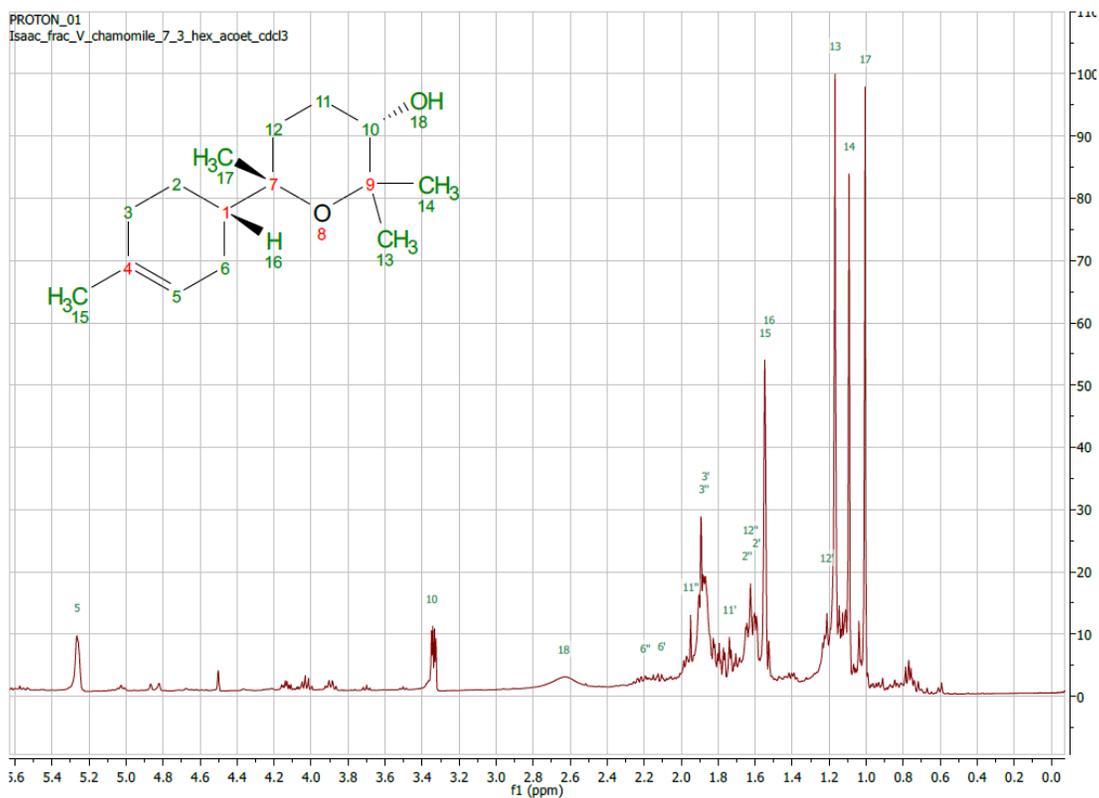


Figura VII.9. Espectro RMN  $^1\text{H}$  experimental de Óxido de Bisabolol-A

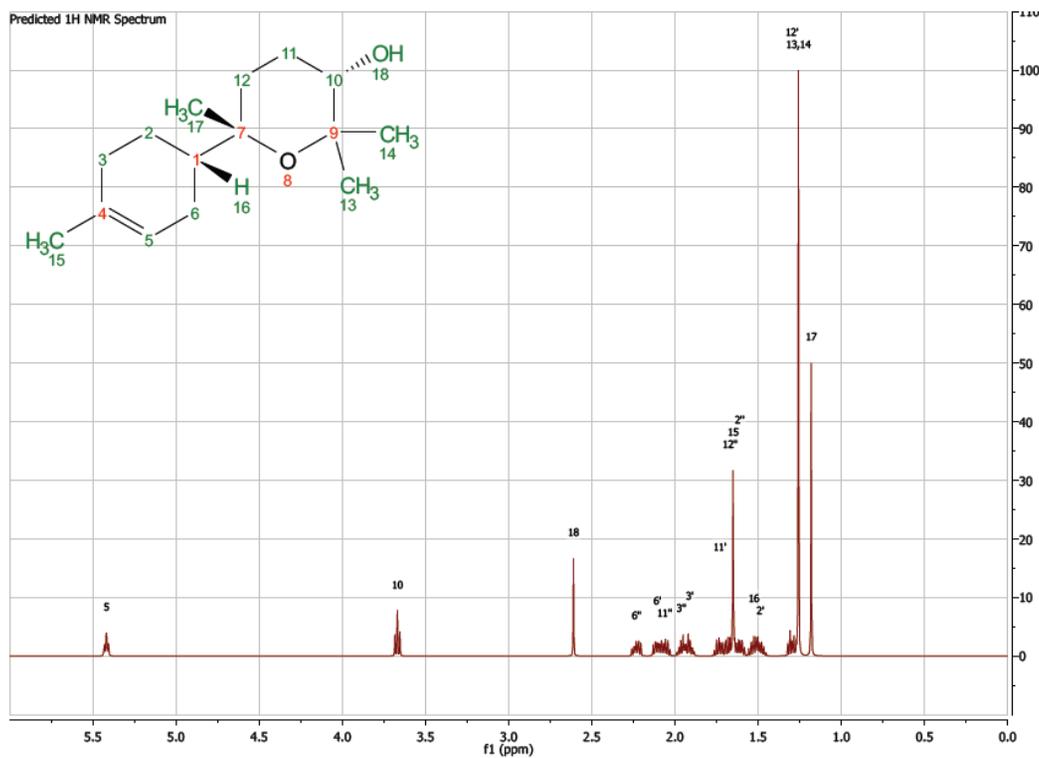


Figura VII.10 Espectro RMN  $^1\text{H}$  simulado de Óxido de Bisabolol-A (MestRenova 8.1) (70)

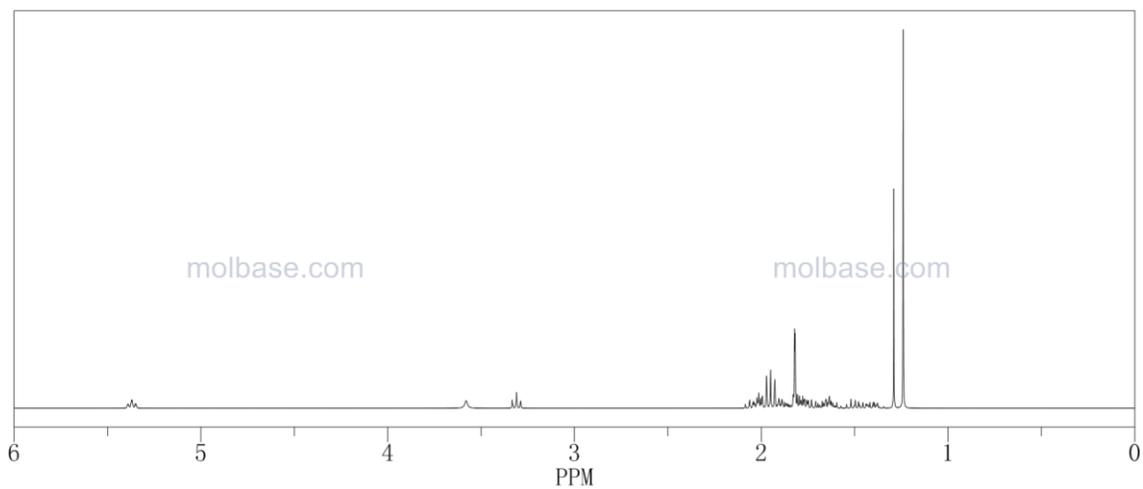


Figura VII.11. Espectro RMN  $^1\text{H}$  reportado en literatura de óxido de Bisabolol (Molbase).

Guayazuleno

Nomenclatura IUPAC: 1,4-Dimetil-7-isopropilazuleno

Formula molecular:  $\text{C}_{15}\text{H}_{18}$

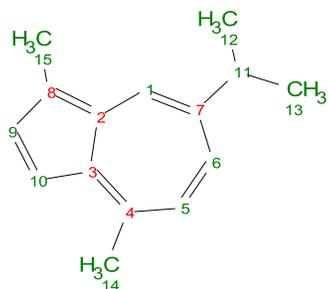


Figura VII.12 Estructura de Guayazuleno

Tabla VII.5 Desplazamientos químicos de Guayazuleno RMN <sup>1</sup>H

Número de H	δ Desplazamiento Químico experimental (ppm)	δ Desplazamiento Químico simuladao (ppm)	δ Desplazamiento Químico en literatura (ppm)	δ Desplazamiento Químico reportado en literatura (Molbase) (69) (ppm)
1	7.68	7.27	8.196	8.31
5	6.28	6.54	7.001	7.12
6	7.40	6.80	7.402	7.52
9	6.87	7.11	7.616	7.06
10	7.30	6.63	7.216	7.33
11	2.81	3.02	3.077	2.87
12	1.26	1.22	1.357	1.20
13	1.28	1.22	1.357	1.20
14	2.18	2.32	2.82	2.32
15	2.23	2.18	2.662	2.32

C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>

**7-isopropyl-1,4-dimethylazulene**

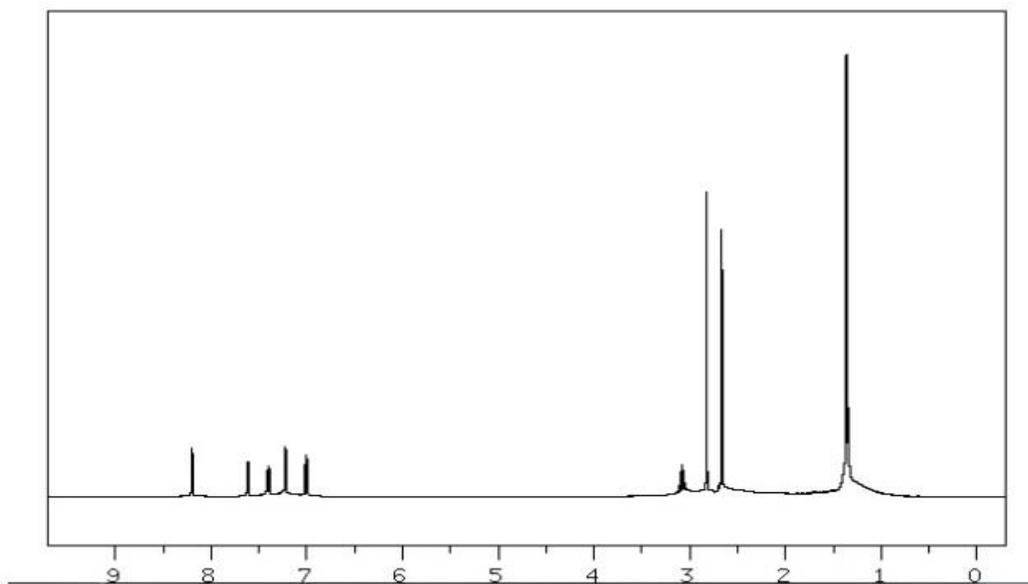


Figura VII.13. Espectro RMN <sup>1</sup>H experimental reportado en literatura de Guayazuleno (71)

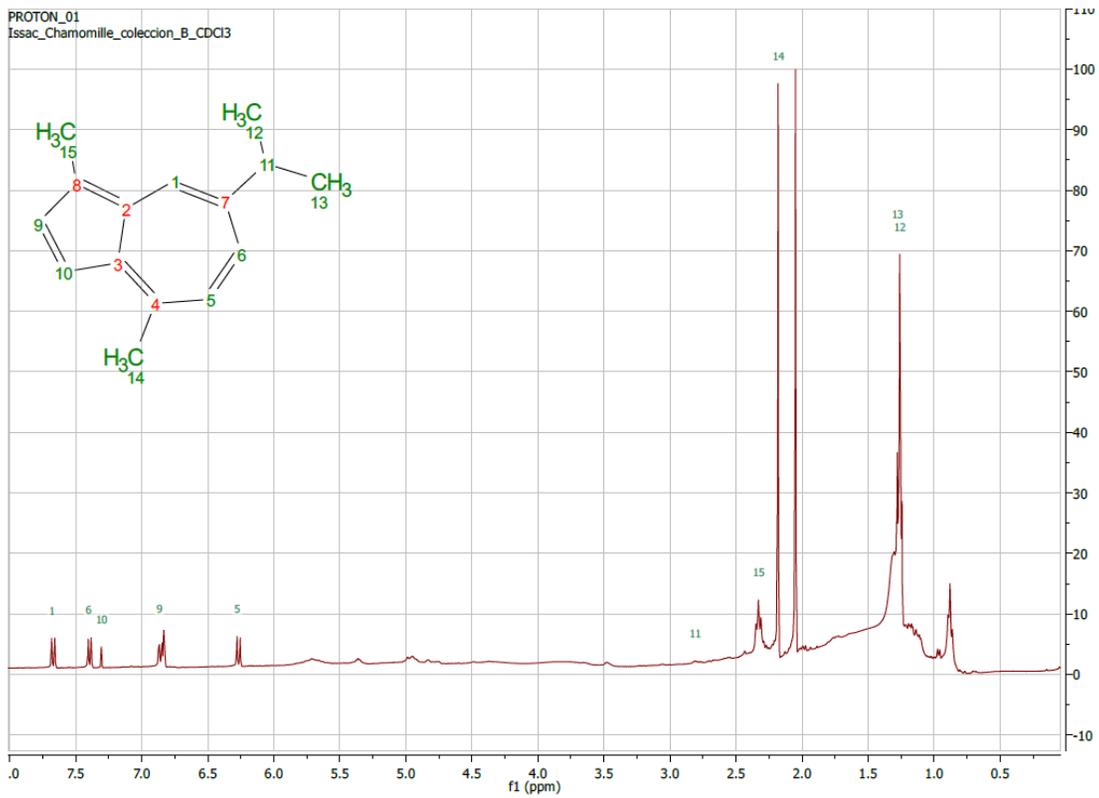


Figura VII.14. Espectro RMN <sup>1</sup>H experimental de Guayazuleno

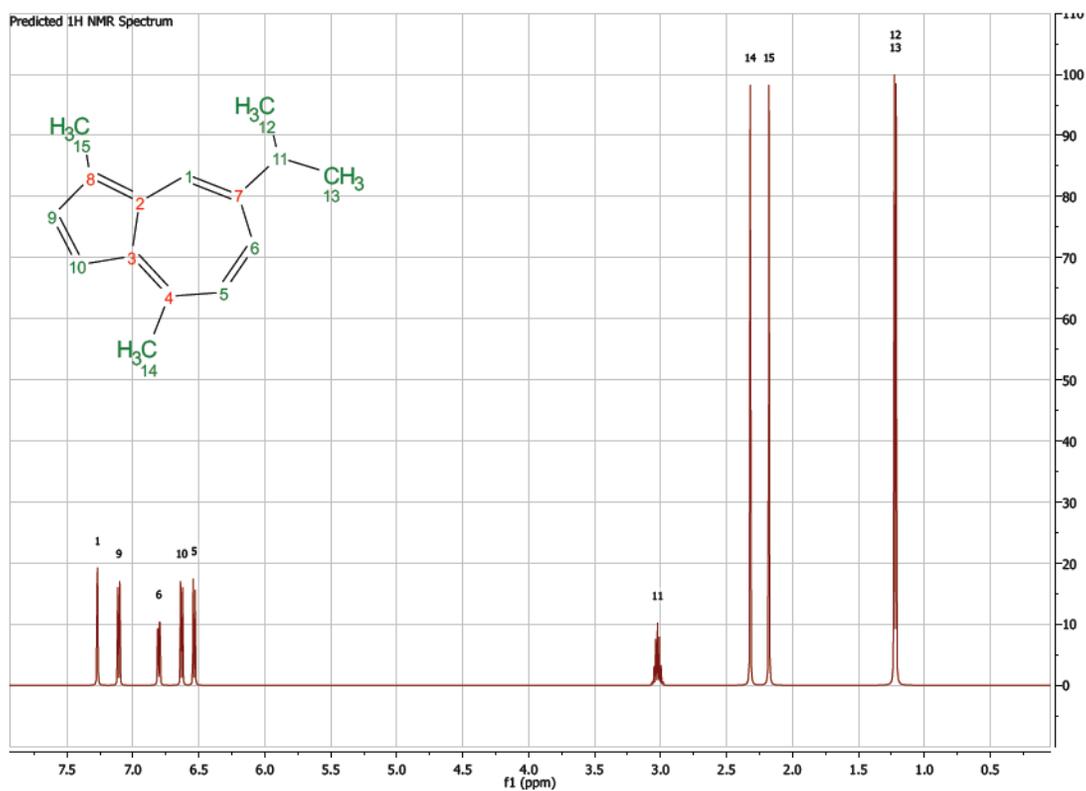


Figura VII.15 Espectro RMN <sup>1</sup>H simulado de Guayazuleno (MestRenova 8.1)(70)

Chamazuleno

Nomenclatura IUPAC: 7-Ethil-1,4-dimetilazuleno

Formula molecular: C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>

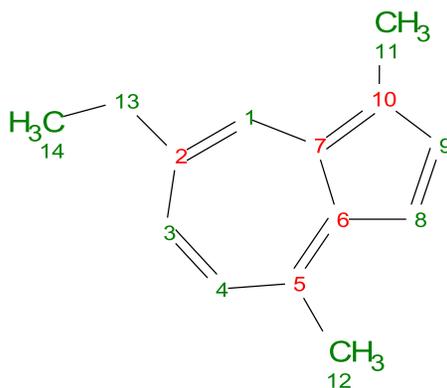


Figura VII.16 Estructura de Chamazuleno

Tabla VII.6 Desplazamientos químicos de Chamazuleno RMN <sup>1</sup>H

Número de H	δ Desplazamiento Quimico experimental (ppm)	δ Desplazamiento Quimico simulado (ppm)	δ Desplazamiento Quimico reportado en literatura (Molbase) (69) (ppm)
1	7.62	7.26	8.31
3	7.35	6.78	7.52
4	6.22	6.53	7.12
8	7.26	6.67	7.33
9	6.80	6.69	7.06
11	2.29	2.32	2.32
12	2.14	2.32	2.32
13	2.73	2.66	2.60
14	1.21	1.21	1.25

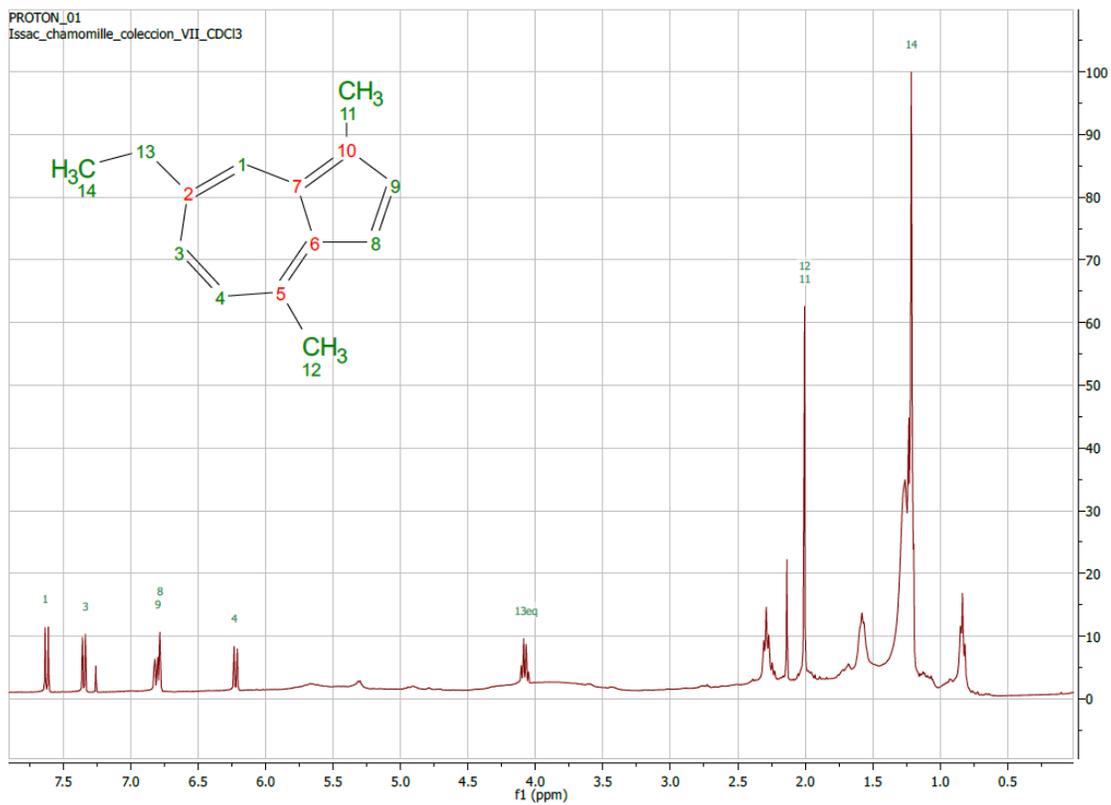


Figura VII.17. Espectro RMN <sup>1</sup>H experimental de Chamazuleno

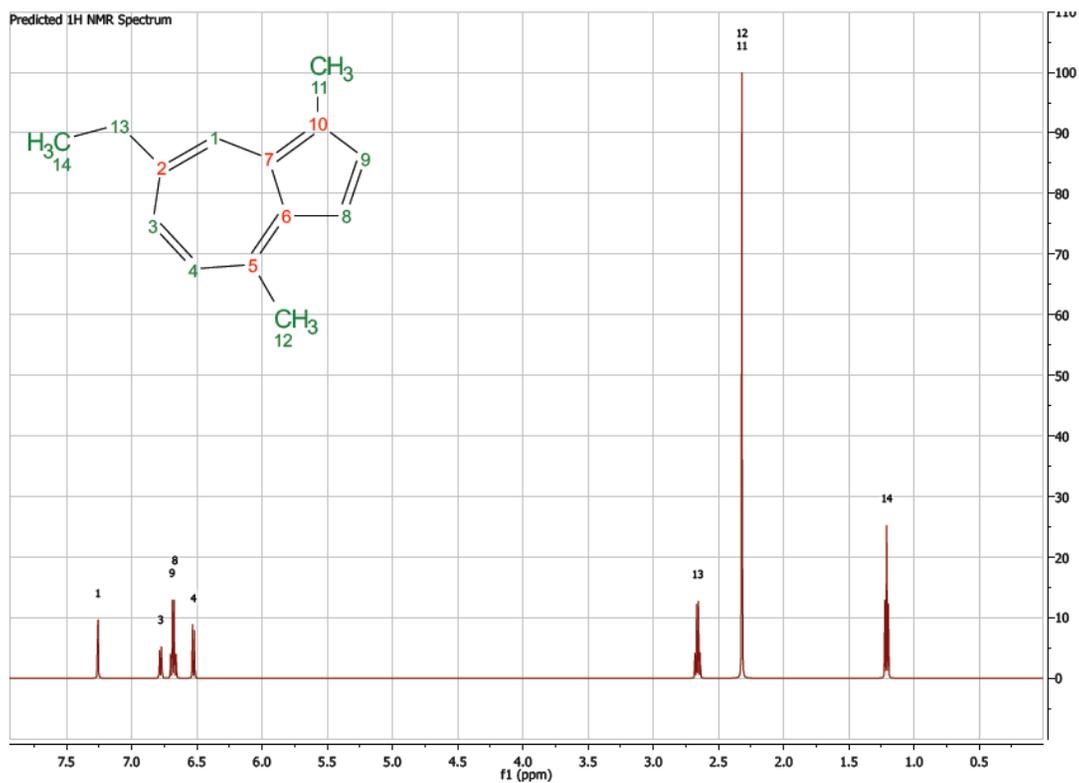


Figura VII.18 Espectro RMN <sup>1</sup>H simulado de Chamazuleno (MestRenova 8.1) (70)

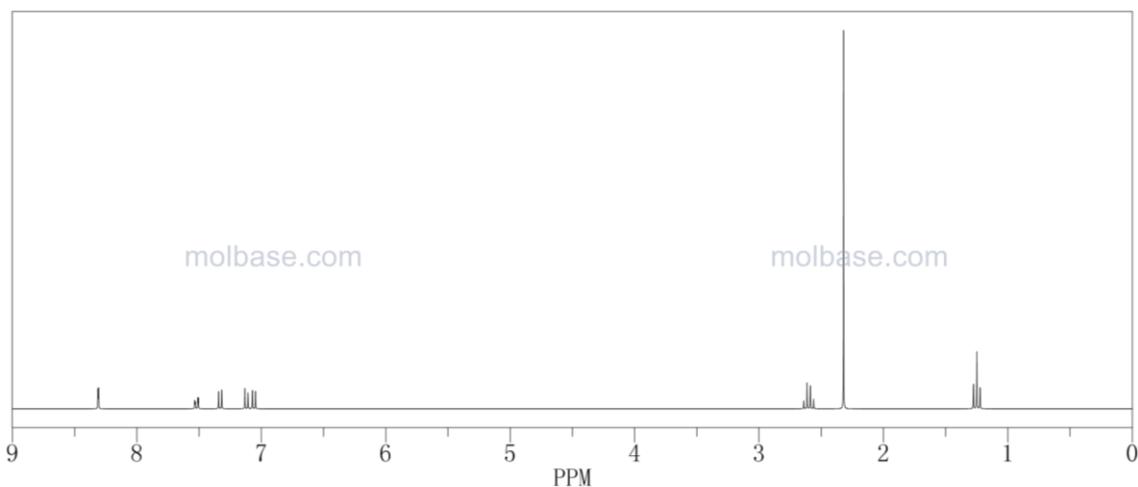


Figura VII.19. Espectro RMN  $^1\text{H}$  reportado en literatura de Chamazuleno (Molbase).

### Verbascósido

Nomenclatura IUPAC: [(2R,3R,4R,5R,6R)-6-[2-(3,4-dihidroxiifenil)etoxi]-5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-[(2S,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihidroxi-6-metiloxan-2-il]oxyoxan-3-il](E)-3-(3,4-dihidroxiifenil)propi-2-enoato

Formula molecular:  $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_{15}$

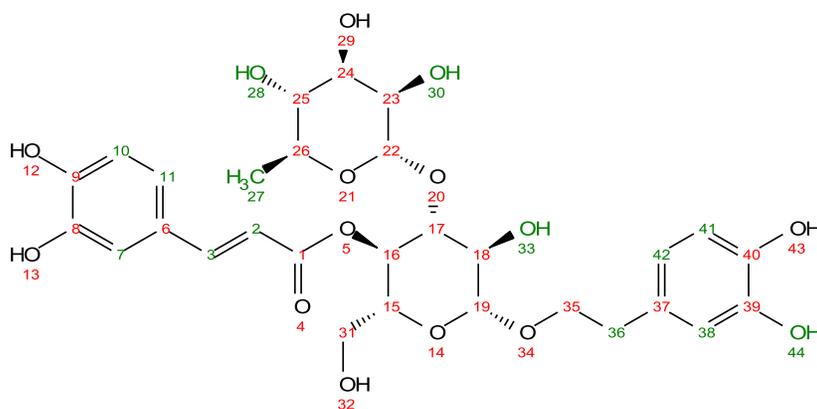


Figura VII.20 Estructura de Verbascósido

Tabla VII.7 Desplazamientos químicos de Verbascósido RMN <sup>1</sup>H (72)

Número de H	δ Desplazamiento Químico experimental (ppm)	δ Desplazamiento Químico simulado (ppm)	δ Desplazamiento Químico en literatura (72) (ppm)	δ Desplazamiento Químico reportado en literatura (Molbase) (69) (ppm)
2	6.44	6.26	6.25	6.31
3	7.93	7.51	7.58	7.48
7	7.62	7.33	-	7.17
10	7.27	7.10	-	6.93
11	7.23	6.96	-	6.79
27	1.06	1.27	1.09	1.18
28	2.08	1.96	-	3.58
30	1.11	1.25	-	3.58
33	2.06	2.03	-	3.58
36	2.48	2.77	2.78	3.70
38	6.68	6.61	6.58	6.86
41	7.01	6.67	6.69	6.73
42	6.79	6.63	6.70	6.68
44	5.55	5.66	-	5.35

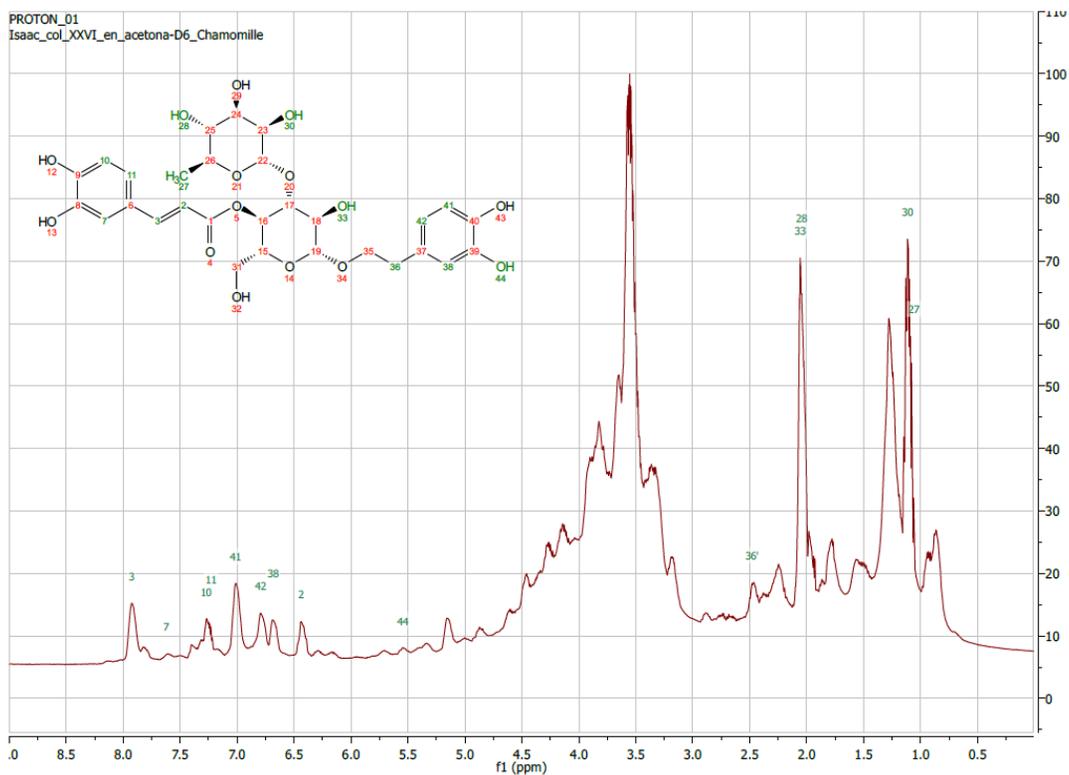


Figura VII.21. Espectro RMN  $^1\text{H}$  experimental de Verbascósido

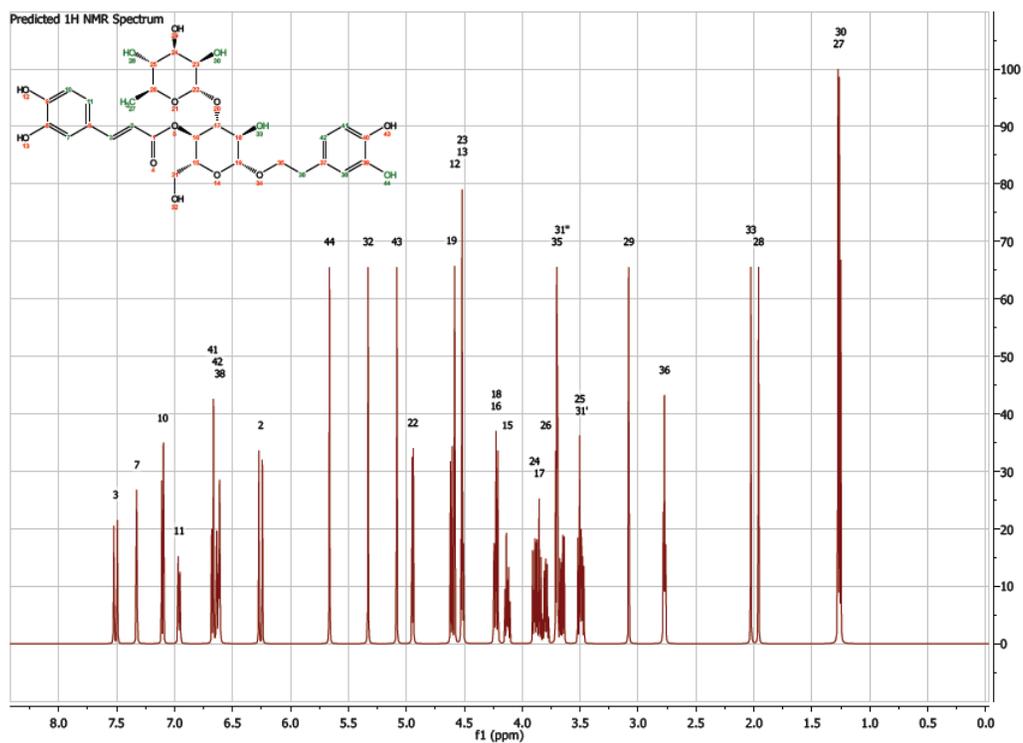


Figura VII.22 Espectro RMN  $^1\text{H}$  simulado de Verbascósido (MestRenova 8.1) (70)

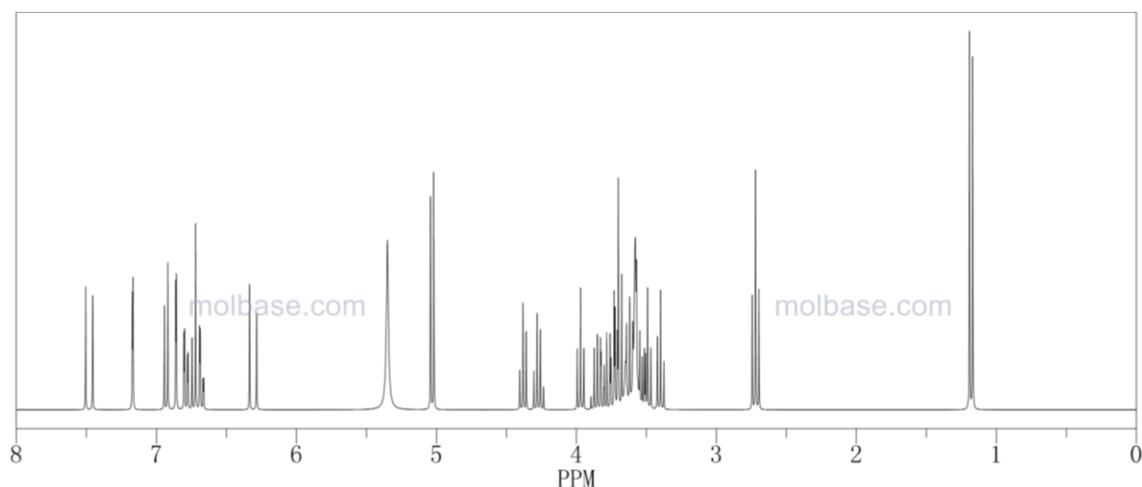


Figura VII.23. Espectro RMN  $^1\text{H}$  reportado en literatura de Verbascósido (Molbase).

#### VII.5 Estudio de tipo docking de *Matricaria chamomilla*.

Se realizó un estudio de tipo docking, habiendo usado el servicio en línea proporcionado por el Centro Suizo de Bioinformática.

Se utilizaron dos moléculas dianas, COX-1 (73) y COX-2 (73) con las características descritas en la metodología, las cuales debido a su función catalítica dentro del proceso de formación de las prostaglandinas a partir del ácido araquidónico, son un punto clave para producir un efecto analgésico y antiinflamatorio, durante cerca de 30 años han sido el objetivo de la mayoría de fármacos analgésicos actualmente disponibles en el mercado.

Para el primer paso del análisis docking se usó como objetivos las dos enzimas COX-1 y COX-2 y como ligandos ocho moléculas con efecto analgésico utilizadas en la mayoría de los fármacos. Para esto se estimó la energía de unión total y energía de unión rápida para la interacción enzima-ligando de las dos enzimas (COX-1 y COX-2) con cada una de las ocho moléculas ya reportadas en la literatura (74, 75).

Para obtener un resultado de energía total de unión y energía de unión rápida se tomaron las cinco energías más bajas, pertenecientes a las cinco uniones más estables y se calculó el promedio de ellas.

Se ordenó el promedio resultante de las energías de unión en orden ascendente (tabla 1.1), considerando que las menores energías representan las uniones más estables, ya que cada molécula busca un estado de equilibrio.

Tabla VII.8 Energías de estabilidad de ocho moléculas activas de fármacos actuales.

<b>Fármaco</b>	<b>COX-1</b>	<b>COX-1</b>	<b>COX-2</b>	<b>COX-2</b>
	<i>Energía de unión rápida (Simplefitness) Kcal/mol</i>	<i>Energía total de unión (Fullfitness) Kcal/mol</i>	<i>Energía de unión rápida (Simplefitness) Kcal/mol</i>	<i>Energía total de unión (Fullfitness) Kcal/mol</i>
<b>Rofecoxib</b>	-3.389072	-2323.14824	-5.530006667	-2328.70093
<b>NS-398</b>	-18.054725	-2383.849525	-11.889725	-2385.4913
<b>Diﬂunisal</b>	7.621315714	-2340.111057	11.12083333	-2339.54855
<b>Meloxicam</b>	6.542330909	-2347.0044	7.033253	-2349.01393
<b>Diclofenaco</b>	13.25016667	-2320.349967	20.74494444	-2320.40219
<b>Celecoxib</b>	-6.368715556	-2321.478044	-6.094116667	-2317.22098
<b>Ketoprofeno</b>	3.901798333	-2320.45615	2.268110875	-2326.67101
<b>Indometacina</b>	10.37007333	-2310.147633	19.6271125	-2313.89156

El segundo paso consistió en el análisis docking de los tres metabolitos principales, dentro de la *Matricaria chamomilla*, con efecto analgésico. Las tres moléculas seleccionadas son:  $\alpha$ -Bisabolol, Óxido de bisabolol-A y Guayazuleno.

Se tomaron en cuenta los promedios de las energías de unión total y de energía rápida de los metabolitos de *Matricaria chamomilla*. Se ordenaron en una nueva tabla (tabla 1.2) en orden ascendente, tomando en cuenta los valores de los metabolitos secundarios junto con

las moléculas presentes en los fármacos. Se considera que los valores menores representan las uniones más estables.

Tabla VII.9 Energías de estabilidad de ocho moléculas activas de fármacos actuales y 3 productos naturales.

Fármaco	COX-1	COX-1	COX-2	COX-2
	Energía de unión rápida (Simplefitness) Kcal/mol	Energía total de unión (Fullfitness) Kcal/mol	Energía de unión rápida (Simplefitness) Kcal/mol	Energía total de unión (Fullfitness) Kcal/mol
<b>Ácido Araquidónico</b>	-57.0272	-2380.815811	-57.95908889	-2385.530356
<b>NS-398</b>	-18.054725	-2383.849525	-11.889725	-2385.4913
<b><math>\alpha</math>-Bisabolol</b>	-26.68106667	-2350.926367	-28.71815556	-2361.476822
<b>Meloxicam</b>	6.542330909	-2347.0044	7.033253	-2349.01393
<b>Diflunisal</b>	7.621315714	-2340.111057	11.12083333	-2339.54855
<b>Rofecoxib</b>	-3.389072	-2323.14824	-5.530006667	-2328.70093
<b>Ketoprofeno</b>	3.901798333	-2320.45615	2.268110875	-2326.671013
<b>Oxido de bisabolol-A</b>	-6.132441667	-2322.44145	-4.320475385	-2326.529685
<b>Diclofenaco</b>	13.25016667	-2320.349967	20.74494444	-2320.402189
<b>Celecoxib</b>	-6.368715556	-2321.478044	-6.094116667	-2317.220983
<b>Indometacina</b>	10.37007333	-2310.147633	19.6271125	-2313.891563
<b>Guayazuleno</b>	16.1340125	-2312.190313	12.87468571	-2309.162986

## VIII. Discusión.

### VIII. 1 Análisis de Prueba de contracciones abdominales (prueba de writhing reflex)

Al analizar los resultados correspondientes a las pruebas de contracciones abdominales de las tres primeras especies vegetales, *Bidens odorata*, *Buddleja Cordata*, *Zaluzania*

*augusta*. Se puede llegar a las siguientes observaciones:

El porcentaje de inhibición de todas las dosis administradas para las dos primeras especies vegetales (*Bidens odorata*, *Buddleja Cordata*), no alcanza a igualar o superar el porcentaje de inhibición del control positivo (indometacina). Esto indica que los extractos no presentan ningún efecto analgésico significativo, esto también se mantiene para dosis elevadas de los extractos, como el caso de 1000 mg/Kg.

En el caso de *Zaluzania augusta*, las dosis administradas que están por debajo de 1000 mg/Kg no presentan un porcentaje de inhibición cercano al del control positivo de indometacina. Esto muestra que dosis de extracto por debajo de 1000mg/Kg no presentan ningún efecto analgésico significativo.

En la dosis de 1000mg/Kg del extracto de *Zaluzania augusta*, la cual presenta un porcentaje de inhibición de contracciones abdominales del 60 % el cual es levemente superior al del control positivo ( 55.5 %). A pesar de presentar una indicación de efecto analgésico, se consideró poco práctico continuar su estudio debido a que la dosis a la que el extracto de *Zaluzania augusta* presento efecto es demasiado elevada, en comparación con la dosis del control de indometacina (10 mg/Kg). El requerir una dosis elevada del extracto para ver un efecto analgésico *in vivo* nos indica que, el efecto analgésico del metabolito o metabolitos es muy bajo y una dosis alta podría acarrear efectos secundarios no deseables en un organismo vivo, debido a la interacción de los metabolitos en otros procesos biológicos, haciendo poco práctico su uso.

Con lo anterior, se consideró que ninguno de los extractos de las tres especies vegetales del estudio, tiene efecto analgésico significativo, debido a los resultados negativos de la prueba de contracciones abdominales, la cual se considera una prueba inicial en estudios de dolor para identificar efecto analgésico en moléculas en las que se desconoce mecanismo de acción, además de que se genera un dolor leve o moderado, por lo tanto los extractos no mostrarían ningún resultado positivo en otra prueba de dolor, cuyos niveles de dolor son elevados o crónicos.

### VIII. 2 Metabolitos aislados de *Matricaria chamomilla*.

Los cinco metabolitos identificados han sido descritos en la literatura con efectos biológicos de tipo analgésico, estos se encuentran en el extracto etanólico de *Matricaria chamomilla*. En la literatura estos metabolitos son descritos con efectos analgésicos como se mencionó en el marco teórico.

Alfa Bisabolol: Es un sesquiterpeno con un ciclo de seis carbonos, presencia de dos dobles enlaces y un grupo alcohol; Según las posiciones descritas en la figura VIII.1 (los átomos de carbono en verde son los que cuentan con átomos de H detectados por el equipo de RMN y los números rojos son átomos de Carbono carentes de H, esto para cada estructura mostrada)

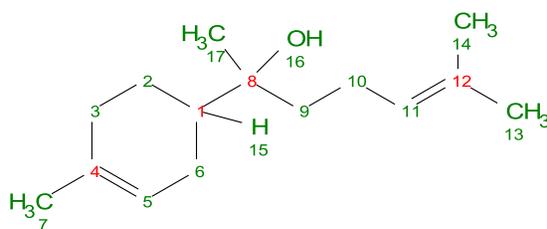


Figura VIII.1 Estructura de  $\alpha$ -Bisabolol (sin estereoquímica)

En la tabla VIII.I se puede apreciar varias columnas las más importantes son de desplazamientos Químicos, una del espectro obtenido experimentalmente, otra del espectro de RMN simulado mediante uso de software de análisis de RMN MestRenova 8.1 y una tercera con los valores reportados en la literatura Se observa que los valores son similares entre cada columna, aunque no son iguales son muy próximos, esto nos indica que tenemos la presencia del compuesto antes mencionado, las variaciones son debidas a la presencia de impurezas en la muestra de análisis.

El alfa-bisabolol presenta dos isómeros debido a los dos carbonos quirales de las posiciones 1 y 8, estos isómeros se denominan según la posición del carbono S (C1), S (C8) y S (C1), R (C8). Ambos isómeros están presentes en las plantas con diferentes concentraciones, el

identificar cual es el principal no es posible sin una muestra enantiomérica pura, la cual es difícil de obtener sin una reacción de derivatización adecuada, por lo que en el presente trabajo se reportan espectros de RMN  $^1\text{H}$  de mezclas racemicas.

Aunque el  $\alpha$ -Bisabolol es un metabolito relativamente conocido, su principal método de identificación es por medio de HPLC de gases o líquidos y poco frecuente con RMN  $^1\text{H}$ , esto dificulta la obtención de bases de datos de RMN del bisabolol para su comparación. Una ventaja adicional es que se fortalece una forma más de identificación del  $\alpha$ -Bisabolol mediante el uso de técnicas de RMN  $^1\text{H}$ .

Tabla VIII.1 Desplazamientos químicos de  $\alpha$ -Bisabolol RMN  $^1\text{H}$

Gupos funcionales	Número de H	$\delta$ Desplazamiento Quimico experimental (ppm)	$\delta$ Desplazamiento Quimico simulado (ppm)	$\delta$ Desplazamiento Quimico reportado en literatura (Molbase) (69) (ppm)
Ciclo	2'	1.57	1.56	1.49
Ciclo	2''	1.72	1.69	1.79
Ciclo	3'	1.95	1.92	1.91
Ciclo	3''	1.95	1.97	2.01
Doble enlace	5	5.34	5.43	5.37
Ciclo	6'	2.0	2.04	1.79
Ciclo	6''	2.04	2.16	2.04
Metilo	7	1.66	1.65	1.82
Cadena lineal	9'	1.59	1.55	1.44
Cadena lineal	9''	1.76	1.78	1.44
Cadena lineal	10' y 10''	2.02	2.10	1.96
Doble enlace	11	5.09	5.18	5.20
Metilo	13	1.86	1.55	1.82
Metilo	14	1.62	1.61	1.70
Ciclo	15	1.68	1.46	1.71
Alcohol	16	4.11	3.27	3.65
Metilo	17	1.29	1.27	1.29

Óxido de Bisabolol-A: Es un sesquiterpeno con dos ciclo de seis siendo uno un carbociclo y el otro un heterociclo, con un doble enlace y un grupo alcohol; Según las posiciones descritas en la figura VII.2

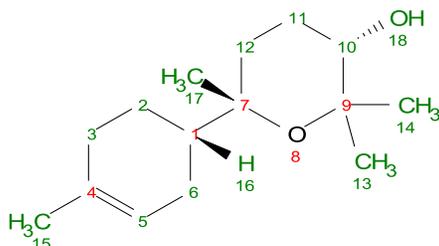


Figura VIII.2 Estructura de Óxido de Bisabolol-A

Tabla VIII.2 Desplazamientos químicos de Óxido de Bisabolol-A RMN <sup>1</sup>H

Gupos funcionales	Número de H	δ Desplazamiento Quimico experimental (ppm)	δ Desplazamiento Quimico simulado (ppm)	δ Desplazamiento Quimico reportado en literatura (Molbase) (69) (ppm)
Carbociclo	2´	1.59	1.49	1.49
Carbociclo	2´´	1.64	1.61	1.74
Carbociclo	3´	1.87	1.91	1.91
Carbociclo	3´´	1.88	1.96	2.01
Doble enlace	5	5.27	5.42	5.37
Carbociclo	6´	2.11	2.11	1.79
Carbociclo	6´´	2.19	2.23	2.04
Heterociclo	10	3.35	3.67	3.31
Heterociclo	11´	1.74	1.73	1.63
Heterociclo	11´´	1.95	2.06	1.88
Heterociclo	12´	1.21	1.30	1.40
Heterociclo	12´´	1.63	1.67	1.65
Metilo	13	1.17	1.26	1.24
Metilo	14	1.09	1.26	1.24
Metilo	15	1.55	1.65	1.82
Carbociclo	16	1.53	1.53	1.95
Metilo	17	1.01	1.18	1.29
Alcohol	18	2.64	2.61	3.58

En la tabla VIII.2 se puede apreciar varias columnas y las más importantes son de desplazamientos Químicos, una del espectro experimental, otra del espectro de RMN simulado mediante uso de software de análisis de RMN MestRenova 8.1 y una última con desplazamientos reportados en la literatura. Se observa que los valores son similares en cada columna al compararlos, esto nos indica que tenemos la presencia del compuesto antes mencionado, los valores no llegan a ser iguales debido a la presencia de impurezas en la muestra.

Guayazuleno: compuesto aromático con dos ciclos uno de siete carbonos y otro de cinco, también llamado Azuleno, tiene tres sustituyentes dos metilos y un isopropilo; Según las posiciones descritas en la figura VII.3.

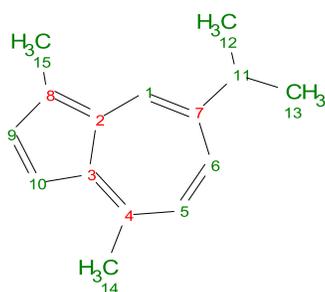


Figura VIII.3 Estructura de Guayazuleno

Tabla VIII.3 Desplazamientos químicos de Guayazuleno RMN 1H

Gupos funcionales	Número de H	$\delta$ Desplazamiento Químico experimental (ppm)	$\delta$ Desplazamiento Químico simulado (ppm)	$\delta$ Desplazamiento Químico en literatura (ppm)	$\delta$ Desplazamiento Químico reportado en literatura (Molbase) (69) (ppm)
Aromático	1	7.68	7.27	8.196	8.31
Aromático	5	6.28	6.54	7.001	7.12
Aromático	6	7.40	6.80	7.402	7.52
Aromático	9	6.87	7.11	7.616	7.06
Aromático	10	7.30	6.63	7.216	7.33
Isopropilo	11	2.81	3.02	3.077	2.87
Isopropilo	12	1.26	1.22	1.357	1.20
Isopropilo	13	1.28	1.22	1.357	1.20
Metilo	14	2.18	2.32	2.82	2.32
Metilo	15	2.23	2.18	2.662	2.32

En la tabla VIII.3 Se puede apreciar las columnas principales, son de desplazamientos Químicos, una del espectro experimental, otra del espectro de RMN simulado mediante uso de software de análisis de RMN MestRenova 8.1, una tercera y cuarta con valores de desplazamientos químicos reportados en la literatura. Al observar las dos columnas con desplazamientos reportados en literatura se nota que los valores entre ellas no son iguales, esto debido al solvente que disolvió la muestra al ser analizada y/o la Frecuencia de trabajo del equipo, así como el estándar usado para calibrar el equipo. La mayoría de los valores del espectro obtenido experimental se encuentran en un punto medio entre las dos referencias de la literatura, pero en este caso los valores no son iguales y tampoco son cercanos, así que no se puede asegurar la presencia del Guayazuleno, pero existe la presencia de un compuesto aromático probablemente formado por una estructura de Azuleno o similar con sustituyentes metilo.

Camazuleno: compuesto aromático con dos ciclos uno de siete carbonos y otro de cinco, también llamado Azuleno, tiene tres sustituyentes dos metilos y un etilo; Según las posiciones descritas en la figura VII.4.

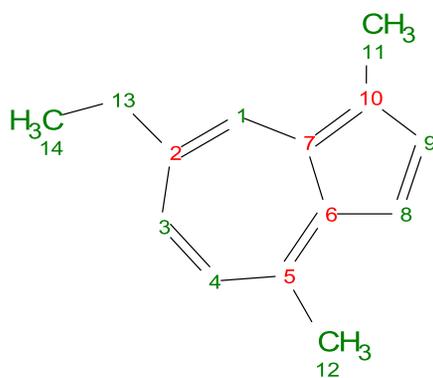


Figura VIII.4 Estructura de Chamazuleno

Tabla VIII.4 Desplazamientos químicos de Chamazuleno RMN <sup>1</sup>H

Gupos funcionales	Número de H	δ Desplazamiento Químico experimental (ppm)	δ Desplazamiento Químico simulado (ppm)	δ Desplazamiento Químico reportado en literatura (Molbase) (69) (ppm)
Aromático	1	7.63	7.26	8.31
Aromático	3	7.34	6.78	7.52
Aromático	4	6.23	6.53	7.12
Aromático	8	6.82	6.67	7.33
Aromático	9	6.80	6.69	7.06
Metilo	11	2.29	2.32	2.32
Metilo	12	2.14	2.32	2.32
Etilo	13	2.73	2.66	2.60
Etilo	14	1.21	1.21	1.25

En la tabla VIII.4 Se puede apreciar varias columnas, las más importantes son de desplazamientos Químicos, una del espectro experimental, otra del espectro de RMN predicho mediante uso de software de análisis de RMN MestRenova 8.1 y una tercera con desplazamientos reportados en la literatura. Se aprecia que los valores de las columnas de desplazamientos químicos son similares, esto nos indica que tenemos la presencia del compuesto antes mencionado.

Compuesto similar al Verbascósido: Derivado del ácido cafeico, unido a dos glucosas. Con la estructura de la figura VII.5.

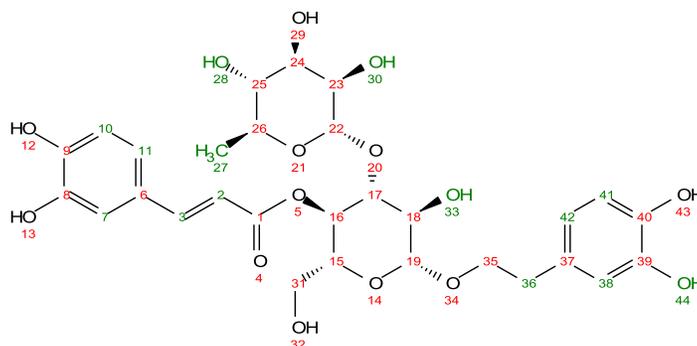


Figura VIII.5 Estructura de Verbascósido

Tabla VIII.5 Desplazamientos químicos de Verbascósido RMN <sup>1</sup>H

Gupos funcionales	Número de H	δ Desplazamiento Químico experimental (ppm)	δ Desplazamiento Químico simulado (ppm)	δ Desplazamiento Químico en literatura (72) (ppm)	δ Desplazamiento Químico reportado en literatura (Molbase) (69) (ppm)
Doble enlace	2	6.55	6.26	6.25	6.31
Doble enlace	3	8.04	7.51	7.58	7.48
Aromático	7	7.73	7.33	-	7.17
Aromático	10	7.38	7.10	-	6.93
Aromático	11	7.34	6.96	-	6.79
Metilo	27	1.17	1.27	1.09	1.18
-OH de glucosa	28	2.16	1.96	-	3.58
-OH de glucosa	30	1.22	1.25	-	3.58
-OH de glucosa	33	2.17	2.03	-	3.58
Cadena lineal	36	2.59	2.77	2.78	3.70
Aromático	38	6.79	6.61	6.58	6.86
Aromático	41	7.12	6.67	6.69	6.73
Aromático	42	6.90	6.63	6.70	6.68
-OH de glucosa	44	5.66	5.66	-	5.35

El Verbascósido es un compuesto complejo de dilucidar mediante la técnica de RMN <sup>1</sup>H, debido al gran número de señales provenientes del grupo –OH de cada carbohidrato, las cuales tienden a sobreponerse una con otra en la región de 3 a 4.5 ppm, lo cual dificulta la posibilidad de identificar cada señal individual con precisión. Sin embargo En la tabla VIII.5 Se puede apreciar las columnas de desplazamientos Químicos, donde se indican los grupos funcionales más característicos que pertenecen al Verbascósido. Se aprecia que los valores de las tres columnas son similares, aunque no es posible confirmar la presencia del Verbascósido debido a que la resolución del espectro no permite ver las señales con claridad e identificar sus valores, si se aprecia el perfil característico de un compuesto aromático, unido a un carbohidrato el cual tiene grupos metilo, esto nos permite asegurar la presencia de un derivado del ácido cafeico glicosidado, y en la literatura se reporta que hay presencia de derivados del ácido cafeico en extractos polares de *Matricaria chamomilla* (76-78).

### *VIII. 3 Estudio tipo docking de Metabolitos aislados de Matricaria chamomilla.*

Con los modelos que se obtuvieron de las bases de datos digitales, de las enzimas ciclooxigena-1 (COX-1) y ciclooxigenasa-2 (COX-2), se realizó la identificación de los residuos de aminoácidos que participan en el proceso de formación de prostaglandinas. (Figura VIII.6 y Figura VIII.7.)

La identificación de los residuos de aminoácidos pertenecientes al sitio activo, permite la observación de este sitio activo, es decir el lugar donde entra el sustrato endógeno y la enzima inicia el proceso de catálisis de reacciones químicas, en este caso el ácido araquidónico como sustrato, sufrirá las sucesivas reacciones que lo transformaran en alguna de las diferentes prostaglandinas.

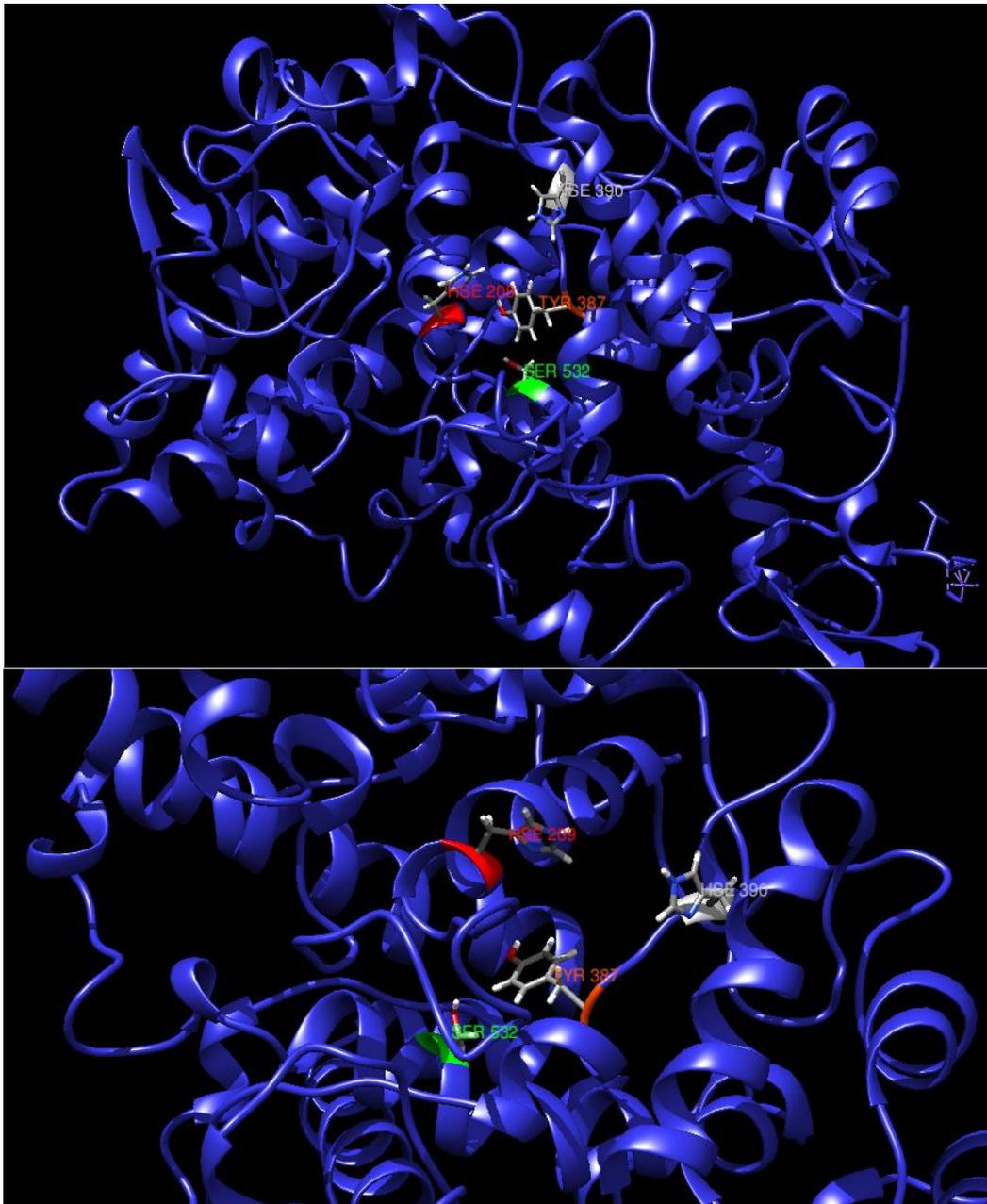


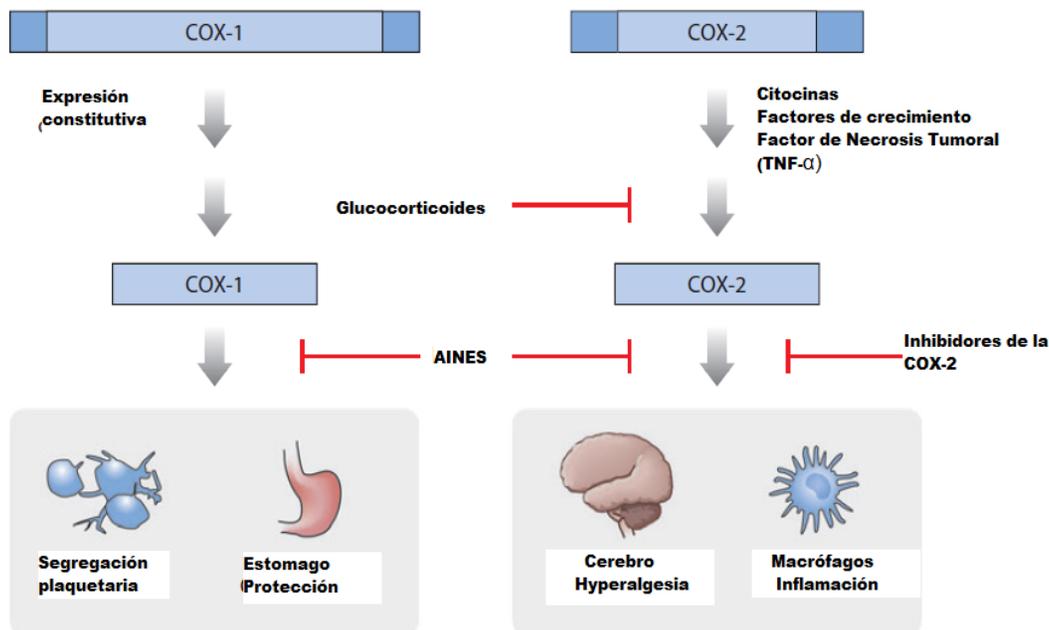
Figura VIII.6. COX-1 de rata, Residuos pertenecientes al sitio activo y que participan en la actividad catalítica: Sec 209, Tyr 387, Sec 390, Ser 532.(73).



Figura VIII.7. COX-2 de humano, Residuos pertenecientes al sitio activo y que participan en la actividad catalítica: **Arg 106, Sec 193, Tyr 341, Tyr 371, 374 Hsd (Homoserina), Ser 516(79).**

La similitud entre la COX-1 y la COX-2 es de 60%, sin embargo en el sitio activo la similitud se incrementa a 85%, esto explica que varios analgésicos pertenecientes al grupo de los AINES, presentan efectos inhibitorios de ambas isoformas. Al ser inespecífica la inhibición desencadena efectos secundarios como daño gástrico. El esquema VIII.8 representa los sitios de regulación en los que intervienen la COX-1 y COX-2, así como los

fármacos con capacidad inhibitoria para cada enzima (20, 25).



**Regulación e inhibición de ciclooxigenasa**

Figura VIII.8 Interacciones de la COX-1 y COX-2 con fármacos inhibidores(25)

Los AINES son los fármacos comúnmente más usados al tratar el dolor leve o crónico (15), presentan alta frecuencia de efectos secundarios, por lo anterior en la búsqueda de nuevos principios activos analgésicos, se busca aquellos que sigan un mecanismo similar a los AINES, buscando una mayor especificidad, sin que incremente su costo y complejidad de síntesis (15, 23).

Desde hace más de una década se sabe que los inhibidores de COX, específicamente los AINES, son inhibidores lentos que forman un complejo Enzima-Inhibidor (COX-AINE (25) en el sitio catalítico de la enzima, Sabiendo que la inhibición de la mayoría de los AINES se debe a que imitan al sustrato endógeno de la COX y ocupan su lugar, impidiendo la unión del sustrato endógeno, cortando el proceso de catálisis de estas enzimas. El complejo no presenta unión química de tipo covalente, más bien es una unión electrostática con fuerzas menores a la de un enlace químico, tales como puentes de hidrogeno y fuerzas de Van der Waals. Algunos de estos complejos COX-AINE, presentan una gran estabilidad

global de energía total y en términos funcionales se consideran complejos irreversibles, dando como consecuencia que el complejo enzima-inhibidor no se rompe y se inactiven las enzimas COX-1 y COX-2, impidiendo que continúe la síntesis de prostaglandinas y disminuya la respuesta del dolor, así como la producción de mucosa gástrica protectora en el estómago y se ve afectada la segregación plaquetaria (19, 25, 39).

Los AINES como inhibidores actúan en dos fases: La primera es similar a una inhibición enzimática por competencias, en la que una mayor concentración del sustrato endógeno desplazara al inhibidor; por esto se denomina inhibidores lentos. Durante la segunda los AINES modifican levemente su posición bloqueando lo que se denomina en la ciclooxigenasa “puerta de unión o aceptor de protones” lo cual origina una unión enzima-inhibidor de mayor estabilidad y que al final dará un complejo COX-AINE de tipo irreversible, completando la inactivación de la enzima. (18, 25).

La velocidad a la cual suceden estos pasos es difícil de determinar y se considera para fines prácticos que la cinética del inhibidor es en un solo paso (25). Lo que si queda claro es que la estabilidad del complejo Enzima–inhibidor, en el caso de los AINES no específicos es alta al final de la formación del complejo, un buena aproximación, desde el punto de vista molecular, para sugerir la efectividad de un compuesto químico como posible agente analgésico es la estabilidad final de complejo (enzima-Inhibidor) que forme al unirse con la ciclooxigenasa. La estabilidad total de un complejo enzima-inhibidor está dada por su energía global la cual debe ser baja, con lo que es posible sugerir que compuestos con una energía baja de unión tienen el potencial de servir como inhibidores de COX. La siguiente tarea fue calcular la energía final de complejo de diferentes inhibidores en presencia de las dos ciclooxigenasas.

Para determinar la relación que guarda la energía total del complejo enzima-Inhibidor con la efectividad analgésica a un nivel clínico, se seleccionó una serie de fármacos de la familia de los analgésicos actuales, con mecanismo de inhibición de ciclooxigenasa ya sea que fueran selectivos o no. Estudiando la estructura química de cada inhibidor se puede

predecir cuál es el efecto que tendrían. Con base en esto se realizaron el estudio acoplamiento molecular (docking) de complejos COX–Inhibidores seleccionados. El estudio docking nos permitió conocer una aproximación (confianza del 80%) de la energía final del complejo COX–Inhibidor (74, 75).

Para la selección de los compuestos químicos con posible efecto analgésico, se tomaron en cuenta estudios previos, de la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) en muestras de sangre para cada compuesto químico. La  $IC_{50}$  una medida del efecto analgésico de un fármaco en seres humanos, las siguientes técnicas se realizan *in vivo*: técnica modificada de William Harvey para sangre humana (WHMA por sus siglas en inglés) (25, 54). Un valor de  $CI_{50}$  bajo es generalmente un indicador de mayor efecto de inhibición.

La  $CI_{50}$  es útil para nuestro punto de vista molecular ya que refleja un efecto directo de inhibición de COX por parte de los compuestos químicos con actividad biológica, un valor bajo de  $CI_{50}$  indica que una baja concentración del compuesto químico inhibir un 50% de enzima y se ha visto que los medicamentos analgésicos selectivos de COX-2 los cuales tienen una  $CI_{50}$  baja en comparación con los AINES.

La tabla VIII.6 muestra algunos compuesto químicos con actividad analgésica seleccionados para el estudio de docking, junto con sus valores de  $CI_{50}$ . Los compuestos muestran un mecanismo similar, inhibición de ciclooxigenasa por formación de complejo enzima-inhibidor, ya sean específicos o no.

Tabla VIII.6 los valores de la relación de la  $CI_{50}$  para las moléculas químicas bioactivas según los ensayos completos de sangre y el ensayo modificado de William Harvey.

Fármaco	$\frac{COX - 1WBA}{COX - 2 WBA} CI_{50}$	$\frac{COX - 1WBA}{COX - 2 WHMA} CI_{50}$
<b>Rofecoxib</b> (selectivo de COX-2)	75	203.23
<b>NS-398</b> (selectivo de COX-2)	19.71	164.29
<b>Diflunisal</b> (AINE)	13.78	0.84
<b>Nimesulide</b> (selectivo de COX-2)	5.26	25.64
<b>Etodolaca</b> (AINE levemente selectivo)	5.45	12.77
<b>Meloxicam</b> (selectivo de COX-2)	2.71	24.78
<b>Diclofenaco</b> (AINE levemente selectivo)	1.97	3.75
<b>Celecoxib</b> (selectivo de COX-2)	1.45	3.53
<b>Ibuprofeno</b> (AINE)	1.06	0.38
<b>Meclofenamato</b> (AINE)	0.31	1.10
<b>Salicilato</b> (AINE)	0.14	10.28
<b>Fenoprofeno</b> (AINE)	0.08	0.58
<b>Ketoprofeno</b> (AINE)	0.02	0.20
<b>Carprofeno</b> (AINE)	0.02	-
<b>Flurbiprofeno</b> (AINE)	0.01	0.10
<b>Indometacina</b> (AINE con efecto mayor a COX-1)	0.01	0.10

La tabla VIII.6 reporta la relación o cociente de los valores de la  $CI_{50}$  para la COX-1 sobre la  $CI_{50}$  para la COX-2. Al tener una mayor inhibición de la COX-2 los compuestos químicos poseen un mayor efecto analgésico y una reducción de efectos secundarios, esto

es coincidente con la clínica, los compuestos con una menor  $CI_{50}$  y mayor efecto analgésico son los selectivos de COX-2, como se puede ver en la tabla VIII.1, los fármacos de la parte superior son principalmente inhibidores selectivos de COX-2.

En la tabla VIII.6 Se encuentran presentes analgésicos de tipo AINE con inhibidores selectivos de la COX-2. Previamente hemos mencionado que la inhibición de COX se da por formación de complejo Enzima-inhibidor, y que este complejo tiene una energía total, la cual debe de ser mínima para poder ser estable y considerarse una inhibición irreversible. Por lo tanto una menor energía de complejo enzima-fármaco debe corresponder a una concentración  $CI_{50}$  baja.

Ahora que se sabe que el valor de la  $CI_{50}$  tiene relación con la energía total de complejo, mediante el mecanismo de inhibición, y que un valor de  $CI_{50}$  bajo debe corresponder a una energía mínima de complejo, se realizó el estudio docking para determinar energía total de complejo y corroborar esta afirmación. Los resultados se muestran en la tabla VIII.7.

Aunque el estudio docking nos indica dos energías de complejo, una denominada *Simplefitness* y otra *Fullfitness*. Nos interesa la *Fullfitness*, la *Simplefitness* representa la sumatoria de las energías intermoleculares de la molécula de inhibidor y la de la enzima en la posición en la que se presentó la formación de complejo, sin tomar en cuenta la energía libre de Gibbs de solvatación electrostática ( $\Delta G_{elec.solv}$ ) la consideración de la energía libre de Gibbs incrementa la exactitud del cálculo ya que se sabe que las moléculas tanto del inhibidor como del fármaco no se encuentran aisladas si no que están en un medio similar a una solución (67). La *Fullfitness* ya hace esta corrección y arroja la sumatoria de las energías intermoleculares del inhibidor y de la enzima con la consideración de  $\Delta G_{elec.solv}$ . Así que es la *Fullfitness* la que nos indicara la mejor aproximación a la energía total de complejo, entre menor sea esta energía más estable será el complejo y por la tanto la inhibición será mayor y esto a su vez podría aumentar su efecto analgésico.

Una vez obtenidas las energías totales se puede apreciar en la tabla VIII.7 una tendencia a que los medicamentos con una menor  $CI_{50}$  (Tabla VIII.6) por COX-2 presentan una menor

*fullfitness*, es decir los fármacos selectivos de COX-2 son los que presentan una menor energía total de complejo, como se esperaría al ser inhibidores selectivos de COX-2.

Tabla VIII.7 Energías *simplefitness* y *fullfitness* de complejo Inhibidor-COX 1 y 2

Fármaco	COX-1	COX-1	COX-2	COX-2
	Energía de unión rápida ( <i>Simplefitness</i> ) Kcal/mol	Energía total de unión ( <i>Fullfitness</i> ) Kcal/mol	Energía de unión rápida ( <i>Simplefitness</i> ) Kcal/mol	Energía total de unión ( <i>Fullfitness</i> ) Kcal/mol
<b>Rofecoxib</b> (selectivo de COX)	-3.389072	-2323.14824	-5.530006667	-2328.70093
<b>NS-398</b> (selectivo de COX)	-18.054725	-2383.849525	-11.889725	-2385.4913
<b>Diflunisal</b> (AINE)	7.621315714	-2340.111057	11.12083333	-2339.54855
<b>Meloxicam</b> (selectivo de COX)	6.542330909	-2347.0044	7.033253	-2349.01393
<b>Diclofenaco</b> (AINE levemente selectivo)	13.25016667	-2320.349967	20.74494444	-2320.40219
<b>Celecoxib</b> (selectivo de COX)	-6.368715556	-2321.478044	-6.094116667	-2317.22098
<b>Ketoprofeno</b> (AINE)	3.901798333	-2320.45615	2.268110875	-2326.67101
<b>Indometacina</b> (AINE con efecto mayor a COX-1)	10.37007333	-2310.147633	19.6271125	-2313.89156

Sin embargo aún queda la duda de que tan baja tiene que ser una energía de complejo en un compuesto químico para ser considerada como representativa de un buen efecto de inhibición de COX. Recordemos que los inhibidores imitan al sustrato endógeno de la enzima COX (25), en este caso el ácido araquidónico compiten con él, por lo el ácido araquidónico debe presentar una energía total de complejo aún más baja que cualquiera de las moléculas inhibitoras. Con esto en mente se modeló el ácido araquidónico y se le hizo el estudio docking para ver su energía total de complejo.

Las energías totales (*fullfiness*) de las principales moléculas bioactivas nos dan una idea directa de su capacidad analgésica a un nivel más cercano al clínico que solo la inhibición enzimática a un nivel molecular. Tomando en cuenta esos datos, comparar los resultados del estudio de docking molecular de tres metabolitos aislados en la *Matricaria chamomilla*, dar una idea de su capacidad analgésica y proponer un mecanismo de acción.

En la tabla VIII.8 se observa que los valores de energía de complejo para los metabolitos derivados de *Matricaria chamomilla* son muy similares a los de algunos fármacos. El caso del  $\alpha$ -bisabolol tiene un valor de energía cercano al del NS-398 el cual es un inhibidor selectivo de COX-2 y su energía es mucho menor a la del Meloxicam, otro inhibidor selectivo de COX-2. Por otra parte el Óxido de bisabolol A presenta un valor similar al del Ketoprofeno menor a la del diclofenaco ambos miembros de los AINE. Por último el Guayazuleno tiene un valor de energía cercano a la energía de la indometacina, también un AINE.

Estos resultados no sugieren que: A) el  $\alpha$ -bisabolol es el metabolito con mayor efecto de inhibición de COX. B) Óxido de bisabolol A es un metabolito con una energía de unión a COX similar a la de los AINES como el diclofenaco. C) Guayazuleno presenta una energía de unión a COX similar a la de los AINES.

Estos datos sugieren una posible explicación de por qué los extractos de *Matricaria chamomilla* presentan efecto analgésico y una disminución de efectos secundarios de daño gástrico relacionados con los AINES no selectivos.

Finalmente el sustrato endógeno de la ciclooxigenasa, el ácido araquidónico, presenta la energía más baja de todas las calculadas, con lo cual, se confirma lo esperado, el sustrato endógeno tiene la energía total de complejo menor, esto de acuerdo con su estatus de sustrato endógeno y naturalmente ser preferido por la ciclooxigenasa. Así la energía total de complejo del ácido araquidónico nos da una referencia del valor que tiene que tener una energía total de complejo de un compuesto para que pueda realizar la inhibición de la ciclooxigenasa de manera exitosa, esto se reafirma al comparar el valor de energía del NS-

398 con el valor de energía del ácido araquidónico y ver que difieren en un orden de centésimas, no hay que olvidar que el NS-398 es un compuesto con inhibición selectiva de COX-2 y mayor efecto analgésico al ver sus valores de  $CI_{50}$ .

Tabla VIII.8 Valores de energía total de complejo para moléculas activas de fármacos, metabolitos de *Matricaria chamomilla* y el sustrato endógeno de la ciclooxigenasa. En color rojo valores de ácido araquidónico, en color verde valores de metabolitos de *Matricaria chamomilla* y en color azul valores de moléculas de fármacos. Subrayados con rojos los valores de *fullfitness* considerada la energía total de complejo.

Fármaco	COX-1	COX-1	COX-2	COX-2
	Energía de unión rápida (Simplefitness) Kcal/mol	Energía total de unión (Fullfitness) Kcal/mol	Energía de unión rápida (Simplefitness) Kcal/mol	Energía total de unión (Fullfitness) Kcal/mol
Ácido Araquidónico	-57.0272	-2380.815811	-57.95908889	-2385.530356
NS-398 (selectivo de COX-2)	-18.054725	-2383.849525	-11.889725	-2385.4913
$\alpha$ -Bisabolol	-26.68106667	-2350.926367	-28.71815556	-2361.476822
Meloxicam (selectivo de COX-2)	6.542330909	-2347.0044	7.033253	-2349.01393
Diflunisal (AINE)	7.621315714	-2340.111057	11.12083333	-2339.54855
Rofecoxib (selectivo de COX-2)	-3.389072	-2323.14824	-5.530006667	-2328.70093
Ketoprofeno (AINE)	3.901798333	-2320.45615	2.268110875	-2326.671013
Oxido de bisabolol-A	-6.132441667	-2322.44145	-4.320475385	-2326.529685
Diclofenaco (AINE levemente selectivo)	13.25016667	-2320.349967	20.74494444	-2320.402189
Celecoxib (selectivo de COX)	-6.368715556	-2321.478044	-6.094116667	-2317.220983
Indometacina (AINE con efecto mayor a COX-1)	10.37007333	-2310.147633	19.6271125	-2313.891563
Guayazuleno	16.1340125	-2312.190313	12.87468571	-2309.162986

## IX. Conclusiones.

### IX.1 Pruebas de Writhing reflex.

Al analizar los resultados de las pruebas de Writhing reflex (contracciones abdominales) se llegó a la conclusión de que ninguno de los extractos de las tres primeras especies vegetales: *Bidens odorata*, *Buddleja cordata* y *Zaluzania augusta*, presentan efecto analgésico significativo, debido a que los porcentajes de inhibición de contracciones abdominales de los extractos vegetales no superaron el porcentaje de inhibición del control positivo (indometacina). La prueba de contracciones abdominales es una prueba inicial en estudios de dolor para identificar efecto analgésico en moléculas en las que se desconoce mecanismo de acción, además de que se genera un dolor leve o moderado, por lo tanto es poco probable que los extractos mostraran un resultado positivo en otra prueba de dolor, cuyos niveles de dolor son elevados o crónicos.

Posibles causas de los resultados del Test de Writhing reflex:

*Zaluzania augusta* : Se reporta que los principales constituyentes de la *Zaluzania augusta* en sus partes aéreas son las zaluzaninas, con mayor concentración de las zaluzaninas A y B(40). La literatura indica que el principal metabolito con efecto antiinflamatorio y analgésico es dihidrozaluzaniana-C presente en las partes aéreas de especies vegetales de Brasil cercanas a la *Zaluzania* (39). En los estudios de *Zaluzania* en México no se reporta la procedencia geográfica exacta de las especies estudiadas con zaluzaninas A y B. Se sabe que las condiciones ambientales y climáticas influyen en las concentraciones de metabolitos secundarios, así que esto indica que las condiciones geográficas, climáticas y ambientales del centro de México no son las adecuadas para el metabolito dihidrozaluzanina-C, por esta razón este metabolito no está en las mismas cantidades en especies de Brasil que del centro de México.

*Bidens odorata*: Dentro del género *Bidens* las especies principales con efecto analgésico y antiinflamatorio son *Bidens pilosa* al tener presencia de compuestos derivados del ácido

cafeico y similares a la apigenina (41), la anterior es una especie muy cercana taxonómicamente a la *Bidens odorata* la cual se estudió en este trabajo, sin embargo parece que su cercanía taxonómica no es suficiente para que estos compuestos estén presentes en cantidades suficientes para presentar un efecto biológico. También las condiciones ambientales y geográficas pueden influir en la presencia de metabolitos secundarios en el caso de *Bidens Pilosa* y *Bidens odorata*, debido a que los estudios de analgesia reportan especies de *Bidens pilosa* provenientes de zonas tropicales y/o selváticas, como es el caso de Brasil y Taiwán (41, 42), mientras que la colectada para este estudio proviene de zonas semiáridas.

*Buddleja cordata*: en el caso de *Buddleja cordata* su principal metabolito con efecto biológico es el Verbascósido presente en varias especies vegetales de diferentes géneros, aunque ya previamente se ha identificado la presencia del Verbascósido en *Buddleja cordata* (46), No se especifica si en la extracción del Verbascósido se usa toda la planta o una parte específica como partes aéreas o raíces. Existe una alta probabilidad que la raíz contenga mayor cantidad de Verbascósido que las partes aéreas ya que el Verbascósido es sensible a la luz y esta causa el rompimiento del enlace glicosídico del Verbascósido, haciendo que modifique su efecto biológico (80, 81).

### *IX.2 Identificación de metabolitos de Matricaria chamomilla.*

Los compuestos finalmente identificados como posibles causantes del efecto analgésico son:  $\alpha$ -Bisabolol, Óxido de Bisabolol-A, un compuesto aromático con posible estructura base de Azuleno con sustituyentes metilo, Camazuleno y un derivado del ácido cafeico glicosidado posiblemente similar al Verbascósido.

### *IX.3 Estudio tipo docking de Metabolitos aislados de Matricaria chamomilla.*

Al comparar los resultados de energía total (*fullfitness*) de los valores de los inhibidores y el sustrato endógeno con cada metabolito de la *Matricaria chamomilla* en presencia de las dos isoformas de la COX, y se llegó a las siguientes conclusiones:

- $\alpha$ -bisabolol es el metabolito con mayor efecto de inhibición de COX.
- Óxido de bisabolol A es un metabolito con una energía de unión a COX similar a al diclofenaco (AINE).
- Guayazuleno presenta una energía de unión a COX similar a la de los AINES.

Esto sugiere una explicación de por qué los extractos de *Matricaria chamomilla* presentan efecto analgésico y una disminución de efectos secundarios de daño gástrico relacionados con los AINES no selectivos.

## **X. Recomendaciones.**

El estudio de efecto biológico de cualquier especie vegetal siempre conlleva inconvenientes, tales como el rendimiento de los extractos obtenidos, la viabilidad de uso de los extractos, la solubilidad del extracto en el vehículo al momento de realizar las pruebas biológicas, los posibles efectos sinérgicos del extracto, debido a la gran cantidad de compuesto químicos presentes en un extracto aun purificado. Tal vez la observación de efectos no esperados.

Siempre surgirán inconvenientes relacionados al trabajo de investigación, lo importante es ir previendo su posible solución teniendo en cuenta que no retrasen el avance general del trabajo de investigación o que se utilicen para general un punto de vista diferente al original que al final desencadene en un nuevo conocimiento.

Aunque los extractos vegetales estudiados en el presente trabajo no reporten un efecto analgésico significativo, eso no significa que carezcan de algún efecto biológico observable, es preciso continuar con el estudio biológico de estas especies y descubrir algún otro efecto biológico de utilidad en estas especies vegetales.

En cuanto al estudio docking de los metabolitos de *Matricaria chamomilla*, y sus resultados que sugieren posible mecanismo y efecto biológico, indica que las herramientas

de modelado molecular por computadora y los estudios teóricos se han convertido en una herramienta viable en el estudio de moléculas con efecto biológica, una razón de que el área farmacológica ha hecho uso de estas nuevas herramientas en su búsqueda de nuevos principios activos o en el mejoramiento de los ya conocidos, teniendo en cuenta un ahorro de recursos.

## XI. Referencias

1. Batista GRdML, Camila de Albuquerque M, Cynthia Layse Ferreira de A, Petrônio Filgueiras de A-F, José Maria B-F, Leônia M. Database Survey of Anti-Inflammatory Plants in South America: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011;12(4):2692-749.
2. Balunas MJ, Kinghorn AD. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*. 2005;78(5):431-41.
3. Richard Finkel MAC, Luigi X. Cubeddu. *Farmacología*. 4 ed. Barcelo España: Lippincott Williams & Wilkins; 2009.
4. R. M. Curso Teórico de Farmacognosia In: UNAM, editor. México: UNAM; 2000. p. 2-5.
5. García RÁ. Estudio estereoquímico y conformacional de algunos metabolitos secundarios aislados de *Stevia pilosa* y *Stevia tomentosa*. México: Universidad Autónoma del Estdo de Hidalgo; 2005.
6. Baños RIE. Aislamiento y cuantificación de la (+)-ivalina en el té de *Zaluzania triloba*. México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2010.
7. Manitto P. *Biosynthesis of Natural Products*. . New York: Wiley; 1981.
8. Domínguez XA. *Metodos de investigacion Fitoquímica*. México: Ed. Limusa; 2000.
9. Christopher R. McCurdy SSS. Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). *Life Sciences*. 2005;78:476 – 84.
10. de Sousa DP. Analgesic-like activity of essential oils constituents. *Molecules*. 2011;16(3):2233-52.
11. Woolf CJ. Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific Pharmacologic Management. *Annals of internal medicine*. 2004;140(6):441-51.
12. Esmaeili-Mahani S, Rezaeezadeh-Roukerd M, Esmaeilpour K, Abbasnejad M, Rasoulilian B, Sheibani V, et al. Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract elicits antinociceptive activity, potentiates morphine analgesia and suppresses morphine hyperalgesia in rats. *J Ethnopharmacol*. 2010;132(1):200-5. Epub 2010/08/18.
13. John D Loeser RM. Pain: an overview. *The Lancet*. 1999;353(9164):1607-9.
14. Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Progress in neurobiology*. 1999;57(1):1-164. Epub 1999/02/13.
15. Moore ND. In search of an ideal analgesic for common acute pain *Acute Pain*. 2009;11(Issues 3–4):129–37.

16. Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. Neuropathic Pain: A Maladaptive Response of the Nervous System to Damage. *Annu Rev Neurosci.* 2009;32:1-32.
17. Carlos moreno DMP. *2.Fisiopatología del dolor clínico.* 2004(2):13.
18. Burian M, Geisslinger G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. *Pharmacology & therapeutics.* 2005;107(2):139-54. Epub 2005/07/05.
19. Pace MC, Mazzariello L, Passavanti MB, Sansone P, Barbarisi M, Aurilio C. Neurobiology of pain. *Journal of cellular physiology.* 2006;209(1):8-12. Epub 2006/06/03.
20. Besson JM. The neurobiology of pain. *The Lancet.* 1999;353(9164):1610-5. Epub 1999/05/20.
21. Michael Costigan CJW. Pain: Molecular mechanisms. *The Journal of Pain.* 2000;1(3):35-44.
22. John R. Vanea RMB. Mechanism of action of aspirin-like drugs. *Seminars in Arthritis and Rheumatism.* 1997;26:2-10.
23. Rao P, Knaus EE. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques.* 2008;11(2):81s-110s. Epub 2009/02/11.
24. Vane J.R BRM. The mechanism of action of aspirin. *Thrombosis Research.* 2003;110(Issues 5-6):255-8.
25. Marnett LJ. The COXIB experience: a look in the rearview mirror. *Annual review of pharmacology and toxicology.* 2009;49:265-90. Epub 2008/10/15.
26. Rainsford KD. Ibuprofen: pharmacology, efficacy and safety. *Inflammopharmacology.* 2009;17(6):275-342. Epub 2009/12/02.
27. Beretta C, Garavaglia G, Cavalli M. COX-1 and COX-2 inhibition in horse blood by phenylbutazone, flunixin, carprofen and meloxicam: an in vitro analysis. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society.* 2005;52(4):302-6. Epub 2005/06/09.
28. Simmons DL. Variants of cyclooxygenase-1 and their roles in medicine. *Thromb Res.* 2003;110(5-6):265-8. Epub 2003/11/01.
29. Chavez-Dossetti M. Interacción Sinérgica ente un extracto acuoso de Matricaria Chamomilla y Diclofenaco en un modelo experimental de inflamción. México, Hidalgo: UAEH; 2013.
30. Wu KK-Y. Biochemical pharmacology of nonsteroidal anti-inflammatory drugs . *Biochemical Pharmacology.* 1998;55(5):543-7.
31. Heinrich M, Ankli A, Frei B, Weimann C, Sticher O. Medicinal plants in Mexico: healers' consensus and cultural importance. *Social science & medicine (1982).* 1998;47(11):1859-71. Epub 1999/01/07.
32. Amaral JFd. Tesis de posgrado La actividad antiinflamatoria, antinociceptiva y Gastroprotector del aceite esencial Croton sonderianus Muell. Arg. Fortaleza, Brasil: Universidade Federal do Ceará; 2004.
33. Leonti M, Sticher O, Heinrich M. Antiquity of medicinal plant usage in two Macro-Mayan ethnic groups (Mexico). *J Ethnopharmacol.* 2003;88(2-3):119-24. Epub 2003/09/10.

34. A. Namvaran Abbas Abada MHKNAGFT. Effect of Matricaria chamomilla Hydroalcoholic Extract on Cisplatin-induced Neuropathy in Mice. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2011;9(2):126–31.
35. Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana. México: Computo Academico UNAM; 2014 [cited 2014 22/04/2014]; Available from: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php>.
36. Herbario virtual CONABIO. 2010; Available from: <http://www.conabio.gob.mx/otros/cgi-bin/herbario.cgi?fam=Lamiaceae>.
37. Can OD, Demir Ozkay U, Kiyani HT, Demirci B. Psychopharmacological profile of Chamomile (*Matricaria recutita* L.) essential oil in mice. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2012;19(3-4):306-10. Epub 2011/11/11.
38. Wang H, Wu T, Yan M, Liu G, Li P, Zhang XQ, et al. Sesquiterpenes from *Ainsliaea fragrans* and their inhibitory activities against cyclooxygenases-1 and 2. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 2009;57(6):597-9. Epub 2009/06/02.
39. Piornedo Rdos R, de Souza P, Stefanello ME, Strapasson RL, Zampronio AR, Kassuya CA. Anti-inflammatory activity of extracts and 11,13-dihydrozaluzanin C from *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa* trunk bark in mice. *J Ethnopharmacol*. 2011;133(3):1077-84. Epub 2010/11/30.
40. J. Romo ARdVPJN. The constituents of *Zaluzania augusta*: The structures of zaluzanins A and B. *Tetrahedron*. 1967;23(1):29–35.
41. Fabiana Lima Silva DCHF, Josean Fachine Tavares. Compilation of Secondary Metabolites from *Bidens pilosa* L. Review. *Molecules*. 2011:1070-102.
42. Yi-Ming Chiang C-PL, Yi-Ping Chen, Sheng-Yang Wang, Ning-Sun Yang. Ethyl caffeate suppresses NF- $\kappa$ B activation and its downstream. *British Journal of Pharmacology*. 2005;146:352-63.
43. Astudillo-Vazquez A, Davalos Valle H, De Jesus L, Herrera G, Navarrete A. Investigation of *Alternanthera repens* and *Bidens odorata* on gastrointestinal disease. *Fitoterapia*. 2008;79(7-8):577-80. Epub 2008/08/05.
44. Backhouse N, Delporte C, Apablaza C, Farias M, Goity L, Arrau S, et al. Antinociceptive activity of *Buddleja globosa* (matico) in several models of pain. *J Ethnopharmacol*. 2008;119(1):160-5.
45. Tolouee M, Alinezhad S, Saberi R, Eslamifard A, Zad SJ, Jaimand K, et al. Effect of *Matricaria chamomilla* L. flower essential oil on the growth and ultrastructure of *Aspergillus niger* van Tieghem. *International journal of food microbiology*. 2010;139(3):127-33. Epub 2010/04/14.
46. Avila JG, de Liverant JG, Martinez A, Martinez G, Munoz JL, Arciniegas A, et al. Mode of action of *Buddleja cordata* verbascoside against *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol*. 1999;66(1):75-8. Epub 1999/08/04.
47. Singh N, Shukla N, Singh P, Sharma R, Rajendran SM, Maurya R, et al. Verbascoside isolated from *Tectona grandis* mediates gastric protection in rats via inhibiting proton pump activity. *Fitoterapia*. 2010;81(7):755-61. Epub 2010/04/15.
48. Houghton PJ. Ethnopharmacology of some *Buddleja* species. *J Ethnopharmacol*. 1984;11(3):293-308. Epub 1984/08/01.
49. Backhouse N, Rosales L, Apablaza C, Goity L, Erazo S, Negrete R, et al. Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, *Buddlejaceae*. *J Ethnopharmacol*. 2008;116(2):263-9. Epub 2008/01/01.

50. Waleczek KJ, Marques HM, Hempel B, Schmidt PC. Phase solubility studies of pure (-)-alpha-bisabolol and camomile essential oil with beta-cyclodextrin. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2003;55(2):247-51. Epub 2003/03/15.
51. Tomic M, Popovic V, Petrovic S, Stepanovic-Petrovic R, Micov A, Pavlovic-Drobac M, et al. Antihyperalgesic and antiedematous activities of bisabolol-oxides-rich matricaria oil in a rat model of inflammation. *Phytotherapy research : PTR*. 2014;28(5):759-66. Epub 2013/08/29.
52. Heuskin S, Godin B, Leroy P, Capella Q, Wathelet JP, Verheggen F, et al. Fast gas chromatography characterisation of purified semiochemicals from essential oils of *Matricaria chamomilla* L. (Asteraceae) and *Nepeta cataria* L. (Lamiaceae). *Journal of chromatography A*. 2009;1216(14):2768-75. Epub 2008/10/28.
53. Rocha NF, Rios ER, Carvalho AM, Cerqueira GS, Lopes Ade A, Leal LK, et al. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of (-)-alpha-bisabolol in rodents. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2011;384(6):525-33. Epub 2011/08/27.
54. Lees P, Landoni MF, Giraudel J, Toutain PL. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*. 2004;27(6):479-90. Epub 2004/12/17.
55. D.E.J. O. *Aspectos básicos de farmacognosia*. . Medellin. : Facultad Quimica Farmacologica, Universidad de Antioquia. ; 2009.
56. Castelazo FG. Determinación de los componentes químicos y evaluación de la capacidad genotóxica mediante ensayo cometa de la planta *Jatropha dioica*. Mexico: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2013.
57. Robert Thornton Morrison RNB. *Química Organica*. 5° ed. USA: Addison-Wesley Iberoamericana; 1987. 1474 p.
58. McMurry J. *Química Organica*. 3° ed. México: Editorial Iberoamerica; 1994. 1274 p.
59. Harris DC. *Análisis Químico cuantitativo*. México1992. 619-30 p.
60. P BY. *Fundamentos de Química Orgánica*. 1° ed. México.: Pearson Educación; 2007. 192-208 p.
61. G. RJMyR-K. *Toxicología fundamental*. 4° ed: Ediciones Díaz de Santos; 2009.
62. Lorke D. A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of toxicology*. 1983;54(4):275-87. Epub 1983/12/01.
63. Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacological reviews*. 2001;53(4):597-652. Epub 2001/12/06.
64. Ortega A, Roca A, Micó JA. Modelos animales de dolor. Una visión crítica. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*. 2002;9(7):447-53.
65. Taher YA. Antinociceptive activity of *Mentha piperita* leaf aqueous extract in mice. *Libyan J Med*. Sweden2012.
66. Levine IN. *Química cuántica*. 5° ed. Madrid: Pearson Educación; 2001.
67. Grosdidier A, Zoete V, Michielin O. EADock: docking of small molecules into protein active sites with a multiobjective evolutionary optimization. *Proteins*. 2007;67(4):1010-25. Epub 2007/03/24.

68. Aurélien Grosdidier OM. SwissDock - The online docking web server of the Swiss Institute of Bioinformatics - Home. 2014;2014.
69. Ltd MTC. Chemical Search Engine, Chemical Database Molbase. 2014;2014(18/11/14).
70. Research M. Mestrelab Research | Chemistry Software for NMR and LC GC MS. 2014; Available from: <http://mestrelab.com/>.
71. (Aist) NIOAIS, Technology. AIST:RIO-DB Spectral Database for Organic Compounds,SDBS. 2014 [cited 2014 29/10/2014]; Available from: [http://sdfs.db.aist.go.jp/sdfs/cgi-bin/direct\\_frame\\_top.cgi](http://sdfs.db.aist.go.jp/sdfs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi).
72. Xie J, Tan F, Zhu J, Yue C, Li Q. Separation, purification and quantification of verbascoside from *Penstemon barbatus* (Cav.) Roth. *Food chemistry*. 2012;135(4):2536-41. Epub 2012/09/18.
73. Bioinformatics SIBSIO. Q63921: Summary Page on Protein Model Portal - PSI SBKB. 2014(2014).
74. Grosdidier A, Zoete V, Michielin O. Fast docking using the CHARMM force field with EADock DSS. *Journal of computational chemistry*. 2011. Epub 2011/05/05.
75. Grosdidier A, Zoete V, Michielin O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic acids research*. 2011;39(Web Server issue):W270-7. Epub 2011/06/01.
76. Vanda Švehlíková MR. Apigenin chemotypes of *Matricaria chamomilla* L. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2006;34(8):654-7.
77. Miroslav Repčák TK. Phenolic glucosides in the course of ligulate flower development in diploid and tetraploid *Matricaria chamomilla*. *Food chemistry*. 2009;116(1):19-22.
78. Lahcene Zaitera MBSBFBFLcIBJQFEJB. Sesquiterpene lactones and other constituents from *Matricaria chamomilla* L. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2007;35(8):533-8.
79. Bioinformatics SIBSIO. P35354: Summary Page on Protein Model Portal - PSI SBKB. 2014;2014.
80. Santos-Cruz LF, Avila-Acevedo JG, Ortega-Capitaine D, Ojeda-Duplancher JC, Perdigon-Moya JL, Hernandez-Portilla LB, et al. Verbascoside is not genotoxic in the ST and HB crosses of the *Drosophila* wing spot test, and its constituent, caffeic acid, decreases the spontaneous mutation rate in the ST cross. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2012;50(3-4):1082-90. Epub 2011/12/27.
81. Avila Acevedo JG, Castaneda CM, Benitez FJ, Duran DA, Barroso VR, Martinez CG, et al. Photoprotective activity of *Buddleja scordioides*. *Fitoterapia*. 2005;76(3-4):301-9. Epub 2005/05/14.