



## **Evaluación del efecto antiinflamatorio de nanopartículas de óxido de zinc/extracto etanólico de *verbessina persicifolia***

### **Evaluation of the anti-inflammatory effect of zinc oxide nanoparticles / ethanol extract of *verbessina persicifolia***

Gabriel Arturo Soto Ojeda<sup>1\*</sup>, Amanda García López<sup>1</sup>, Minerva Hernández Lozano, Mauro Antonio Villanueva Lendecky<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Química Farmacéutica Biológica, Universidad Veracruzana, Circuito Gonzalo Aguirre Beltrán, esquina la Pérgola, Zona Universitaria, C.P. 91080, Xalapa Ver., México

Autor de Correspondencia\*: [gsoto@uv.mx](mailto:gsoto@uv.mx)

Recibido 12 de julio 2022; recibido en forma revisada 18 de septiembre de 2022; aceptado 30 de octubre 2022

#### **RESUMEN**

La inflamación es una respuesta a diferentes agresiones que pueden ser endógenas o exógenas a causa de infección por un patógeno y/o daño tisular que afecta la calidad de vida de las personas. La *Verbessina persicifolia* es una planta que se ha empleado en el tratamiento de la inflamación entre otras propiedades medicinales. Por otra parte, los sistemas de acoplamiento o complejos con el óxido de zinc nanoparticulado (ZnO-Nps) que, por sus propiedades químicas inertes, hidrófilas son excelentes sistemas de liberación y estabilización de fármacos. Por lo que, nuestro objetivo fue acoplar ZnO-Nps a extracto etanólico de *V. persicifolia* y evaluar el efecto antiinflamatorio un modelo *in vitro* e *in vivo*. En el estudio *in vitro* se evaluaron las concentraciones de 50, 100, 200, 400, 600 y 800 µg/mL de ZnO/Vp, como control negativo y positivo se utilizó solución salina isotónica y

100 µg/mL de naproxeno, respectivamente. En el modelo *in vivo* se evaluaron las dosis de 50, 100, 200, 400, 600 y 800 mg/Kg de ZnO/Vp, como control negativo y positivo se utilizó el vehículo y naproxeno (50 mg/Kg). Los resultados mostraron un efecto antiinflamatorio en el modelo de estabilidad de la membrana con hemólisis inducida por solución hipotónica a la concentración de 400 µg/mL [ $F_{(7,40)}=289.046$ ;  $p< 0.001$ ] a diferencia de la hemólisis con calor, no se presentaron efectos en los tratamientos ensayados [ $F_{(7,40)}= 3.491$ ;  $p=0.05$ ; NS]. Por otra parte, en el modelo de edema plantar en ratas se observó un efecto antiinflamatorio dosis dependiente a partir de 200 mg/Kg siendo mayor al de naproxeno a dosis de 800 mg/Kg [ $F_{(28,200)}= 2.065$ ;  $p\leq 0.002$ ]. En conclusión, el complejo de ZnO/Vp posee efecto antiinflamatorio; por lo que, es importante seguir realizando más estudios sobre su potencial como agente antiinflamatorio para poder ser empleados en diversos padecimientos.

**Palabras Clave:** Inflamación, edema, nanopartícula, huichín

#### ABSTRACT

Inflammation is a response to different aggressions that can be endogenous or exogenous due to infection by a pathogen and/or tissue damage that affects people's quality of life. *Verbesina persicifolia* is a plant that has been used in the treatment of inflammation among other medicinal properties. On the other hand, coupling systems or complexes with nanoparticle zinc oxide (ZnO-Np) which, due to their inert, hydrophilic chemical properties, are excellent drug release and stabilization systems. Therefore, our objective was to couple ZnO-Nps to an ethanolic extract of *V. persicifolia* and to evaluate the anti-inflammatory effect in an *in vitro* and *in vivo* model. In the *in vitro* study, concentrations of 50, 100, 200, 400, 600, and 800 µg/mL of ZnO/Vp were evaluated. Isotonic saline and 100 µg/mL of naproxen were used as negative and positive control, respectively. In the *in vivo* model, the doses of 50, 100, 200, 400, 600 and 800 mg/Kg of ZnO/Vp were evaluated, as negative and positive control the vehicle and naproxen (50 mg/Kg) were used. The results showed an anti-inflammatory effect in the membrane stability model with hemolysis induced by hypotonic solution at the concentration of 400 µg/mL [ $F_{(7,40)}=289.046$ ;

p<0.001] unlike heat hemolysis, there were no effects in the tested treatments [ $F_{(7,40)} = 3.491$ ; p=0.05; NS]. On the other hand, in the model of plantar edema in rats, a dose-dependent anti-inflammatory effect was observed starting at 200 mg/Kg, being greater than that of naproxen at a dose of 800 mg/Kg [ $F_{(28,200)} = 2,065$ ; p≤0.002]. In conclusion, the ZnO/Vp complex has an anti-inflammatory effect; Therefore, it is important to continue carrying out more studies on its potential as an anti-inflammatory agent in order to be able to use it in various diseases.

**Keywords:** Inflammation, edema, nanoparticle, huichín

## INTRODUCCIÓN

La inflamación es la respuesta inicial e inespecífica del organismo ante estímulos mecánicos, químicos o por infección de patógenos; es una respuesta rápida y amplia, controlada humoral y celularmente (complemento, cininas, coagulación y cascada fibrinolítica), desencadenada por la activación de fagocitos y células endoteliales (García *et al.*, 2000). Esta respuesta inflamatoria puede darse por infección de patógenos y/o daño tisular (Arts *et al.*, 2018) que se identifica por los signos de rubor, calor, dolor, tumor e impotencia funcional (Balusu *et al.*, 2016). El tratamiento farmacológico para la inflamación es a base de medicamentos antiinflamatorios; sin embargo, la administración de estos medicamentos tiene efectos secundarios a corto y largo plazo, tales como: alteraciones gastrointestinales, hepatopatías, daños renales, alteración de la coagulación sanguínea, problemas digestivos (Perea, 2017), problemas hematológicos principalmente relacionados con mecanismos inmunitarios, siendo los más importantes la agranulocitosis, anemia aplásica, trombocitopenia y anemia hemolítica (Prieto y Vargas, 2000).

Por lo anterior, es relevante buscar y plantear tratamientos alternativos antiinflamatorios seguros, que presenten mayor eficacia, baja toxicidad y que desencadenen menos efectos secundarios (Murugesan, 2014).

En consistencia, se han buscado alternativas de tratamiento en diversas plantas medicinales, dentro de las que se encuentra la *Verbesina persicifolia*, que es empleada para distintas afecciones que además cuenta con actividad antiinflamatoria por los metabolitos que la conforman (Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Por otra parte, los sistemas de acoplamiento o complejos con óxido de zinc nanoparticulado (ZnO-Np), son excelentes sistemas de liberación y estabilización de fármacos, debido a sus propiedades químicamente inertes, hidrófilas y de fácil síntesis (Treviño *et al.*, 2014).

El óxido de zinc (ZnO) es un compuesto inorgánico, que se conoce como producto de uso seguro y por ello tiene amplias aplicaciones. A nivel nanométrico se caracteriza por comportarse como un semiconductor con un ancho de banda de 3.37 eV

(Gates *et al.*, 2005; Francisco *et al.*, 2017), además, en condiciones ambientales posee estructura hexagonal tipo wurtzita y puede presentarse en diversas morfologías nanoestructuradas como: nanohilos, nanofibras, nanoanillos, nanoalambres, nanotubos, nanohélices, nanocajas, nanoesferas, nanobarras, rosetones, entre otros más (Francisco *et al.*, 2017).

Por lo que, el presente trabajo se enfoca en la obtención del complejo de ZnO/Vp para evaluar su efecto antiinflamatorio en modelos *in vitro* de estabilidad de la membrana del eritrocito y en el modelo *in vivo* de edema plantar en rata inducido con carragenina, con la finalidad de determinar si el ZnO/*Verbesina persicifolia* ofrece una alternativa terapéutica como tratamiento antiinflamatorio.

## METODOLOGÍA

### Sujetos experimentales

Para evaluar el efecto antiinflamatorio se emplearon 48 ratas macho de la cepa Wistar de 2.5 a 3 meses de edad, con un peso de 200-250 g al inicio del experimento. Fueron alojadas en un bioterio local en cajas de acrílico transparente (33 x 44 x 20 cm) con

un ciclo de luz-oscuridad de 12/12 horas, a temperatura de 18-26 °C, con libre acceso a agua y alimento. Los experimentos se realizaron de acuerdo con la Guía para Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio y la NOM-062-ZOO-1999. Al finalizar el estudio, los animales fueron eutanizados con una sobredosis vía intraperitoneal de pentobarbital de uso veterinario, elaborado por laboratorios Aranda S.A. de C.V.

### Material vegetal

La planta se recolectó en la región de Arroyo del Potrero perteneciente al municipio de Martínez de la Torre, Veracruz. Ésta ya ha sido identificada por el Instituto Nacional de Ecología (INECOL), donde el espécimen quedó bajo el siguiente folio: *Verbesina persicifolia* D.C.-AAM-002-XAL.

### Preparación del extracto etanólico

El material vegetal seco y molido (5 g) se colocó en un cartucho de papel filtro poroso, posteriormente se colocó en el equipo Soxhlet a reflujo. La extracción se realizó a un rango de temperatura constante de 65 a 70°C con etanol al 96% (2:50, planta: disolvente) durante 2 horas.

El extracto se concentró en un rotavapor a 65°C con bomba de vacío para eliminar el 60% del disolvente (Treviño *et al.*, 2014; Águila *et al.*, 2015).

### **Preparación de las soluciones para administración en los sujetos de experimentación**

Como control farmacológico se utilizaron 50 mg/Kg de naproxeno. La solución vehículo se preparó con propilenglicol-Tween80-agua purificada (5:5:90). El naproxeno y las nanopartículas de ZnO/Vp fueron administrados con esta solución vehículo. El volumen de administración fue de 1 mL/kg (V.O.), empleando una cánula intraesofágica de acero inoxidable y jeringas de plástico.

### **Obtención del complejo ZnO/Vp**

Para la elaboración de las nanopartículas de ZnO/*Verbesina persicifolia* se empleó ZnO nanoparticulado como agente de carga y como estabilizante extracto etanólico de *V. persicifolia*.

Para esto, en un sistema de sonicación a una temperatura de 60°C, se preparó una solución homogénea con 150 mL de etanol y 2.5 g del extracto obtenido de la maceración de *V. persicifolia* (Treviño *et al.*, 2014; Águila *et al.*, 2015).

Posteriormente, en un sistema por reflujo con agitación constante y a temperatura de 70 °C, se preparó una solución con 5 g de ZnO nanoparticulado de un tamaño de partícula <100 nanómetros (Sigma-Aldrich) y se disolvió agitando con una mezcla de 100 mL de etanol y 6 mL de agua destilada hasta que la mezcla fue homogénea. Estas dos soluciones fueron empleadas para la preparación de las nanopartículas de ZnO/Vp (Treviño *et al.*, 2014; Águila *et al.*, 2015).

### **Obtención de ZnO/Vp**

El complejo de ZnO/Vp se obtuvo mediante el método Sol-Gel, para ello, en un sistema de sonicación y a temperatura de 60°C, se agregó a la solución de ZnO-Np, gota a gota toda la solución de *V. persicifolia*. Se colocó esta solución en un sistema por reflujo con agitación constante a 70°C durante 15 minutos. La solución final se sumergió en un recipiente con hielo durante 15 minutos a 4°C. Se eliminó el disolvente en un rotavapor a 40°C con vacío y el disolvente que quedó se eliminó en una parrilla con agitación magnética (Treviño *et al.*,

2014; Aguila *et al.*, 2015), de esta manera se obtuvo ZnO/Vp.

### **Evaluación in vitro de la actividad antiinflamatoria de ZnO/Vp en el modelo de estabilidad de la membrana del eritrocito**

#### *Hemólisis inducida con solución salina hipotónica*

Se empleó una mezcla de reacción que consistió en 0.5 mL de la solución a 10% de RBC, 1 mL de buffer de fosfato pH 7.4 y 1 mL de solución salina hipotónica (0.3% p/v). A dicha mezcla se le agregó 1 mL de los extractos a las concentraciones 50, 100, 200, 400, 600 Y 800 µg/mL, como control negativo se empleó un tubo con la mezcla de reacción al que se le adicionó 1 mL de solución salina isotónica en lugar de los extractos. Para el control farmacológico se empleó la mezcla de reacción y 1 mL de naproxeno preparado con solución salina isotónica a una concentración de 100 µg/mL.

Todos los tubos fueron incubados a 37 °C por 30 min, posteriormente se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 20 min. Los ensayos se realizaron por triplicado y fueron leídos en un espectrofotómetro UV-VIS a 560 nm para calcular el contenido de

hemoglobina, el cual fue usado como un indicativo del grado de hemólisis (a mayor hemoglobina mayor hemólisis).

#### *Hemólisis inducida con calor*

Para esta prueba se empleó la misma mezcla de reacción descrita anteriormente (1 mL de cada una de las siguientes soluciones; RBC a 10%, buffer de fosfato pH 7.4) a la cual se le adicionó 1 mL de cada una de las diferentes concentraciones ensayadas de ambos extractos (grupos experimentales). Como control negativo se empleó solamente la mezcla de reacción con 1 mL de solución salina isotónica en lugar de los extractos.

De manera similar al experimento anterior, el control farmacológico fue naproxeno en concentración de 100 µg/ml con la mezcla de reacción. Todas las muestras fueron realizadas por triplicado e incubadas a 57 °C por un periodo de 30 min y centrifugadas a 2500 r.p.m. durante 5 min. Se obtuvieron las absorbancias en un espectrofotómetro UV-VIS a 560 nm.

Para ambas pruebas (hemólisis inducidas por solución salina hipotónica y calor) se determinó el

porcentaje de hemólisis sobre RBC (Ec. 1) y se calculó el porcentaje de estabilización de la membrana (Ec. 2) de acuerdo con las siguientes ecuaciones.

**EC 1.**

$$\% \text{ de hemólisis} = \left( \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia control}} \right) \times 100$$

**EC2.**

$$\% \text{ de estabilidad de la membrana} = 100 - \left( \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia control}} \right) \times 100$$

**Evaluación de la actividad antiinflamatoria en el modelo de edema plantar en rata inducido con carragenina**

Se evaluaron las diferentes dosis de ZnO/Vp (50, 100, 200, 400, 600 y 800 mg/Kg) y el fármaco de referencia (naproxeno 50 mg/Kg) se disolvieron en el vehículo y fueron administrados 60 minutos antes de la inyección de la carragenina. El grupo control negativo sólo recibió vehículo.

La inflamación se cuantificó midiendo el diámetro de la zona subplantar de las patas, utilizando un vernier a las 0, 3, 4 y 24 horas después de la inyección de carragenina, la diferencia entre el diámetro de la pata izquierda y el de la derecha fue

indicativo del grado de inflamación (Miño *et al.*, 2001), de acuerdo con la siguiente fórmula (EC3):

$$\% \text{Inflamación} = \frac{D_t - D_0}{D_0} (100)$$

Donde:

**D0**= Diámetro de la pata antes de la administración de carragenina.

**Dt**= Diámetro de la pata inflamada a un tiempo X.

Se empleó ANOVA de 1 vía para grupos independiente y como post-hoc Student Newman Keuls, cuando  $p \leq 0.05$ . Los resultados son presentados como el promedio  $\pm$  error estándar.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

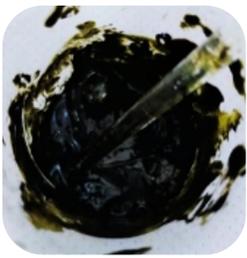
**Resultados**

Obtención de extracto. Con el material vegetal de *V. persicifolia* (hojas de Huichín) se obtuvo el extracto etanólico, cuyas características se presentan en la

**Tabla 1 y 2.**

Tabla1. Rendimiento del extracto etanólico				
Solvente	Extracción	Material Vegetal (Peso)	Extracto Seco (Peso)	Rendimiento
Etanol	2 horas en equipo Soxhlet	5 gramos	2 gramos	40%

Tabla 2. Resultados de las características del extracto etanólico de <i>Verbesina persicifolia</i> .		
Características	Resultados	Figura
Color	Verde oscuro	

Olor	Herbal, característico de extracto de <i>Verbesina persicifolia</i> , libre de olor a solvente	
Apariencia	Semisólido, uniforme	
Aspecto	Libre de partículas extrañas	
Textura	Untuosa ligera	

### Evaluación de la estabilidad de la membrana del eritrocito en hemólisis inducida con solución hipotónica y calor

*Hemólisis inducida con solución hipotónica* Se evaluaron las concentraciones 50, 100, 200, 400, 600 y 800 µg/mL para las variables del porcentaje de hemólisis y de estabilidad de la membrana, los resultados indicaron que las diferentes concentraciones ensayadas modificaron el porcentaje de hemólisis [ $F_{(7,40)}=289.046$ ;  $p < 0.001$ ]. La prueba post-hoc mostró que las concentraciones de ZnO/Vp y el naproxeno disminuyeron significativamente esta variable en comparación con el grupo que recibió el vehículo (VEH) (\* $p \leq 0.001$ ).

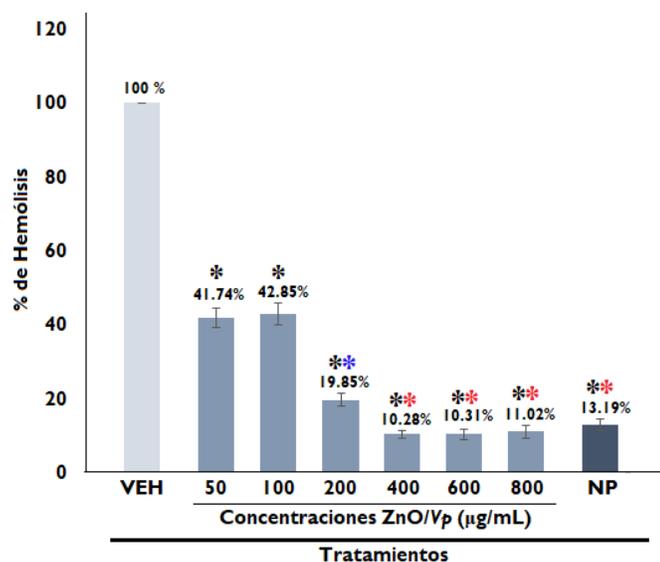
**Gráfica 1. Porcentaje de hemólisis.** Las diferentes concentraciones de ZnO/Vp y el naproxeno disminuyeron esta variable vs el VEH (\* $p \leq 0.001$ ), mientras que las concentraciones de 400-800 µg/mL tuvieron un efecto similar al naproxeno vs los demás grupos de experimentación (\* $p \leq 0.001$ ). [ $F_{(7,40)}=289.046$ ;  $p < 0.001$ ].

### Obtención del complejo ZnO/*Verbesina persicifolia*

Se realizó el acoplamiento (dopaje) entre el extracto etanólico de la planta y el óxido de zinc nanoparticulado (ZnO-Nps) siguiendo el método Sol-Gel, al finalizar este proceso se obtuvo un sólido con características que se muestran en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Características de las nanopartículas de ZnO/Vp

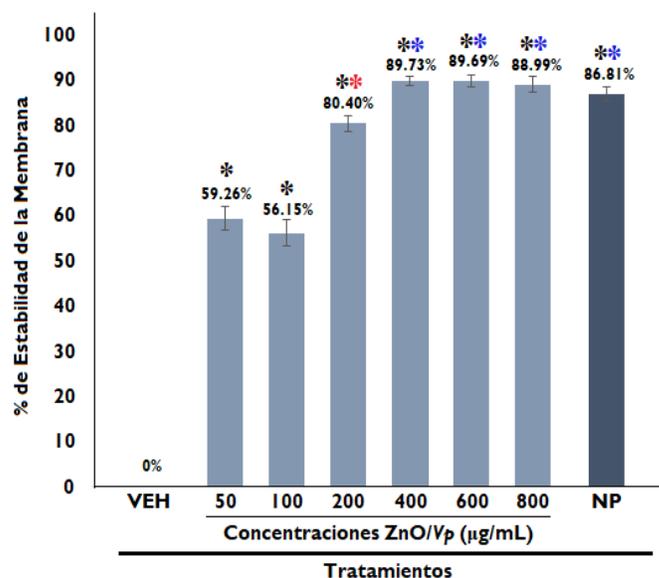
Características	Resultados	Figura
Color	Verde	
Olor	Herbal, característico de extracto de <i>Verbesina persicifolia</i>	
Apariencia	Sólido, uniforme	
Aspecto	Libre de partículas extrañas	



superiores al 85% de estabilidad en este modelo

(\* $p \leq 0.001$ ), véase **gráfica 2**.

**Gráfica 2. Porcentaje de estabilidad de la membrana.** El ZnO/Vp y Naproxeno incrementaron el % de protección contra la hemólisis vs VEH (\* $p \leq 0.001$ ). A partir de 400 µg/mL de ZnO/Vp se obtuvieron valores similares a los de Naproxeno (\* $p \leq 0.001$ ). [ $F_{(7,40)} = 289.046$ ;  $p < 0.001$ ].



Por otra parte, al analizar el porcentaje de estabilidad de la membrana, el análisis estadístico indicó diferencias significativas [ $F_{(7,40)} = 289.046$ ;  $p < 0.001$ ], la prueba post-hoc determinó que los tratamientos produjeron un aumento en esta variable con relación al grupo VEH (\* $p \leq 0.001$ ). Las concentraciones de 50 y 100 µg/mL incrementaron el % de estabilidad de la membrana más del 56% vs las demás concentraciones de ZnO/Vp y el naproxeno. La concentración de 200 µg/mL mostró un valor mayor a 50 y 100 µg/mL y menor al de las concentraciones más altas (\* $p \leq 0.001$ ). Finalmente, a partir de la concentración de 400, µg/mL, tuvieron un efecto similar al control farmacológico, con valores

*Hemólisis inducida con calor.* En este experimento no se encontró que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones ensayadas de ZnO/Vp y los controles empleados [ $F_{(7,40)} = 3.491$ ;  $p = 0.05$ ; NS], los resultados se muestran en la **Tabla 4**.

**Tabla 4.** Resultados de la prueba *in vitro* de estabilidad de la membrana del eritrocito por hemólisis inducida con calor

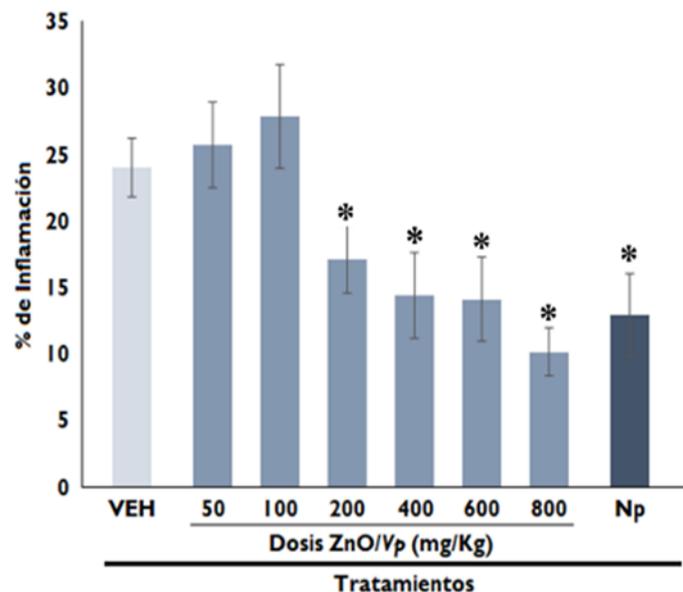
Grupos	% de Hemólisis	% de Estabilidad de la Membrana
VEH	100.00± 00.00	00.00±0.000
ZnO/Vp <sub>50</sub>	071.22±13.02	28.77±13.028
ZnO/Vp <sub>100</sub>	076.06±10.70	23.93±10.708
ZnO/Vp <sub>200</sub>	100.00±00.00	00.00±0.000
ZnO/Vp <sub>400</sub>	100.00±00.00	00.00±0.000
ZnO/Vp <sub>600</sub>	100.00±00.00	00.00±0.000
ZnO/Vp <sub>800</sub>	100.00±00.00	00.00±0.000
NP	093.33±6.66	06.66±6.667
Estadístico	[F (7,40) = 3.491; p=0.05; N/S]	[F (7,40) = 3.491; p=0.05; N/S]

### Evaluación de la actividad antiinflamatoria en el modelo de edema plantar en rata inducido con carragenina

Se evaluaron las dosis de 50, 100, 200, 400, 600 y 800 mg/Kg del ZnO/Vp, y como control positivo se empleó naproxeno 50 mg/Kg y vehículo como control negativo mostró lo siguiente:

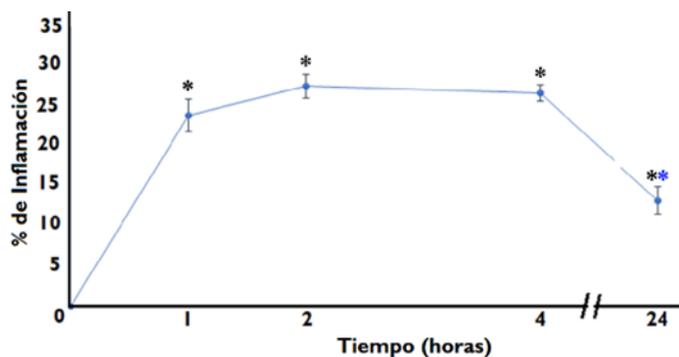
*Factor tratamiento.* Al analizar los datos con ANOVA se encontraron diferencias estadísticamente significativas [F(7,232)=12.132; p<0.001]. La prueba post-hoc mostró que los grupos con las dosis de 200, 400, 600 y 800 mg/Kg de ZnO/Vp disminuyeron el porcentaje de inflamación de manera similar al naproxeno (NP) (\*p≤0.001). en comparación con el VEH y las dosis de 50 y 100 mg/Kg de ZnO/Vp, tal y como se puede observar en la **gráfica 3**.

**Gráfica 3. Porcentaje de inflamación.** Se observó a partir de la dosis de 200 de ZnO/Vp presentan una disminución del porcentaje de inflamación similar al que produjo naproxeno vs VEH. Las dosis de 50 y 100 mg/Kg y el VEH son similares vs los demás grupos. [F(7,232)=12.132; p<0.001].



*Factor tiempo.* Por otra parte, al analizar el factor tiempo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas [ $F_{(4,7)} = 60.462$ ;  $p < 0.001$ ]. La prueba post-hoc mostró que se produjo un incremento en esta variable desde el inicio de la prueba y que se mantuvo hasta las 4 horas de experimentación vs el inicio de la prueba ( $*p \leq 0.001$ ). En contraste, se observó una disminución de esta variable a las 24 horas de la experimentación en comparación con las mediciones realizadas en las horas 1, 2 y 4 de esta variable ( $*p \leq 0.001$ ), véase **gráfica 4**.

**Gráfica 4. Porcentaje de inflamación respecto al tiempo.** Se produjo un aumento de esta variable que se mantuvo en las primeras 4 horas respecto al inicio de la prueba ( $*p \leq 0.001$ ). A las 24 horas se observa una disminución del % de inflamación respecto a la medida de las 4 horas ( $*p \leq 0.001$ ). [ $F_{(4,7)} = 60.462$ ;  $p < 0.001$ ].



*Interacción de factores: tratamiento y tiempo*

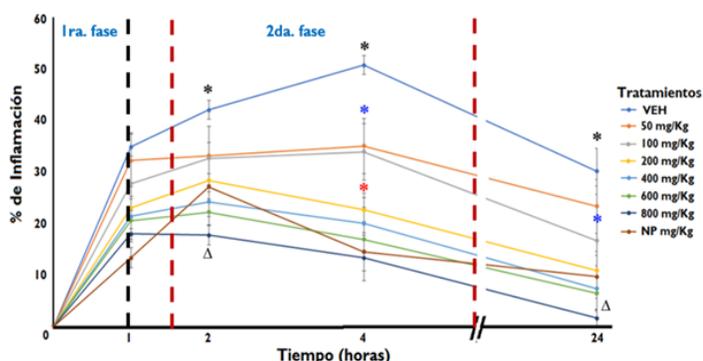
Se encontraron diferencias significativas [ $F_{(28,200)} = 2.065$ ;  $p \leq 0.002$ ], la post-hoc indicó que el grupo VEH (control negativo) tuvo los valores más altos de esta variable respecto a los demás grupos de experimentación alcanzando el valor más alto a las 4 horas ( $*p \leq 0.001$ ).

Por otro lado, los sujetos que fueron administradas con 50 y 100 mg/Kg de ZnO/Vp tuvieron valores más bajos que el VEH, pero dichos valores fueron mayores a los obtenidos con el naproxeno y las dosis más altas de ZnO/Vp ( $*p \leq 0.001$ ).

En consistencia, el grupo que recibió el naproxeno (control farmacológico) al igual que ZnO/Vp a partir de la dosis de 200 mg/Kg se observaron valores más bajos del porcentaje de inflamación ( $*p \leq 0.001$ ). Finalmente, de acuerdo con los resultados obtenidos la dosis de 800 mg/Kg de ZnO/Vp tuvo un efecto antiinflamatorio mayor al resto de las dosis de ZnO/Vp y al naproxeno a las 2 y 24 horas de estudio ( $\Delta p \leq 0.001$ ) tal como se muestra en la **Gráfica 5**.

**Gráfica 5. Interacción de factores.** Los valores más altos de esta variable se obtuvieron con el grupo VEH ( $*p \leq 0.001$ ). Las dosis de 50 y 100 mg/Kg tuvieron valores menores al VEH ( $*p \leq 0.001$ ).

Finalmente, las dosis de 200 a 800 mg/Kg al igual que el naproxeno tuvieron los valores más bajos en esta prueba ( $*p \leq 0.001$ ). Los porcentajes de inflamación obtenidos con la dosis de 800 mg/Kg de ZnO/Vp fueron más bajos en que el Naproxeno a las 2 y 24 horas ( $^{\Delta}p \leq 0.001$ ). [ $F_{(28,200)} = 2.065$ ;  $p \leq 0.002$ ].



## Discusión

De acuerdo con nuestros resultados, se pudo evaluar el efecto antiinflamatorio en modelos *in vitro* e *in vivo* el complejo formado con ZnO-*Verbesina persicifolia*. En un trabajo previo se logró identificar en el extracto la presencia de alcaloides, taninos, quinonas, flavonoides y flavanonas, chalconas y auronas, cumarinas, leucoantocianinas y esteroides, los cuales pueden ser los responsables de las propiedades biológicas de esta planta (Soto-Ojeda *et al.*, 2018).

Un estudio realizado por López (2015) refiere que algunos sesquiterpenos tienen actividad antiinflamatoria debido a que aumentan el efecto

inhibitorio GABAérgico; además, reporta para esta planta que son los flavonoides y algunos terpenos como los eudesmanos y cinamatos son los responsables del efecto antiinflamatorio (López, 2015).

Como se ha reportado la actividad antiinflamatoria de las sustancias se puede deber a diferentes mecanismos como: quelación de hierro, secuestro de radicales libres y finalmente la inhibición de las oxidasas (lipooxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa y la xantina oxidasa) y en consecuencia evitan la formación de especies reactivas de oxígeno. Lo anterior sugiere que el efecto antiinflamatorio de esta planta está relacionado con los tres mecanismos mencionados y por tanto la hace interesante para su estudio como antiinflamatoria y útil para el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas en patologías que transcurren con procesos inflamatorios.

Por otra parte, el empleo de nanopartículas de óxidos metálicos ha cobrado importancia en la mejora de las propiedades biológicas de plantas medicinales, el ZnO-Nps ha sido empleado con diversos fines, como

mejorar las propiedades biológicas de sustancias, crear nuevos dispositivos, uso en industria biomédica, cosmética, alimenticia, entre otras (Mavil y Juárez, 2022). El óxido de zinc tiene aplicación farmacológica como sistema de carga y liberación de fármacos que mejoran sus propiedades biológicas (Mishra *et al.*, 2017).

Existen estudios que evalúan el uso de ZnO-Np y extractos de plantas medicinales; es por ello, que el ZnO-Np resulta interesante para potencializar los efectos biológicos de *Verbesina persicifolia* mediante el acoplamiento del extracto etanólico con ZnO-Np. El dopaje del ZnO y el extracto de la planta puede generar una mayor biocompatibilidad facilitando el acoplamiento de las nanopartículas de ZnO promoviendo una mayor afinidad a sistemas biológicos y también una menor toxicidad favoreciendo con ello la actividad biológica relacionada con los componentes dopados, como es el caso de los antioxidantes y otros metabolitos de la planta. Nuestros resultados indicaron que ZnO/Vp funciona como antiinflamatorio y que su actividad biológica puede ser explicada por la presencia de los

metabolitos de naturaleza fenólica y los sesquiterpenos de la planta, que sumados al ZnO-Np, mejoran la estabilidad de la membrana inhibiendo la hemólisis. En este sentido, la estabilidad también puede favorecerse debido al efecto protector de las nanopartículas contra los radicales libres promotores de inflamación, esta respuesta se ha atribuido a la atracción electrostática entre los fitoconstituyentes biológicamente activos cargados negativamente ( $\text{COO}^-$ ,  $\text{O}^-$ ) y las nanopartículas cargadas positivamente ( $\text{ZnO}=\text{Zn}^{2+} + \text{O}^{2-}$ ), lo cual aumenta la actividad biológica de los metabolitos (Yadav *et al.*, 2018) y que se puede observar como un efecto de inhibición de la proteinasa de los leucocitos que es responsable de la progresión del daño tisular durante la inflamación (Yadav *et al.*, 2018).

En contraste en el modelo de hemólisis inducida con calor no hubo efecto de estabilización de la membrana por parte de los grupos ensayados, lo cual puede deberse a que la hemólisis producida con calor es más agresiva en comparación a la hemólisis inducida con solución hipotónica. Por consiguiente, es importante a futuro realizar estudios en el modelo

de hemólisis con calor ensayando otras concentraciones y ZnO-Nps de tamaño más pequeño, ya que en un estudio reportado por Yadav y colaboradores (2018) sobre efecto antiinflamatorio de Nps de ZnOTP (óxido de zinc-*Trianthema portulacastrum*) encontraron que se obtuvo el 79.2% de estabilidad de la membrana con la dosis de 400 µg/mL-1. Cabe destacar que en este trabajo se empleó ZnO-Nps con tamaño <100 nm, lo cual sugiere que Nps de menor tamaño pueden mostrar un efecto en este modelo de hemólisis por calor. En consistencia en el modelo de inflamación de edema plantar de raya inducido con carragenina nuestros resultados indicaron que ZnO/Vp tuvo un efecto antiinflamatorio dosis dependiente observable en las fases 1 y 2 de inflamación referidas para este modelo. Las dosis de ZnO/Vp disminuyeron la inflamación respecto al grupo vehículo que represento el control negativo y cuyo máximo valor fue alcanzado a las 4 horas en la segunda fase de inflamación de este modelo. Las dosis de 50 y 100 tuvieron un efecto antiinflamatorio menor al resto de las dosis de ZnO/Vp y del naproxeno, dicho efecto se observó

más acentuado en la segunda etapa de la inflamación que correspondiente al incremento del edema y se da a partir de los 90 minutos, con una disminución de tres a cinco horas, lo anterior puede estar asociado a la liberación de prostaglandinas (E2), bradiquininas, proteasas y lisosomas, siendo esta etapa la más sensible frente a los agentes antiinflamatorios de uso clínico que inhiben la síntesis de prostaglandinas al inhibir la ciclooxigenasa 1 y 2 (Enciso y Arroyo, 2011; Gómez *et al.*, 2011; Sánchez *et al.*, 2019).

Los resultados sugieren que el efecto antiinflamatorio puede deberse a la supresión de la producción de NO, las expresiones de proteínas relacionadas de COX-2, IL-1 β, IL-6 y TNF- α.

La presencia de los metabolitos fenólicos y derivados de sesquiterpenos acoplados a ZnO-Nps pudieron inducir los mecanismos de control antiinflamatorios. La dosis de 200 mg/Kg tuvo un efecto antiinflamatorio observado desde la fase 1 de este modelo, que se mantuvo hasta la fase 2, evitando el incremento de la inflamación en el edema plantar de la rata. Los efectos más marcados se encontraron a partir de la dosis de 400, mg/Kg las cuales fueron

iguales al efecto mostrado con el naproxeno. En consistencia, se observó con la administración de 800 mg/Kg una tendencia a la disminución de la inflamación mayor a la obtenida con el naproxeno en ambas fases de inflamación descritas para este modelo. Con lo anterior nuestros resultados sugieren que el efecto antiinflamatorio que se observó con ZnO/Vp es más fuerte en la fase dos de la inflamación; esta fase esta mediada por la liberación de elementos proinflamatorios como: prostaglandinas, bradiquinina, proteasa y lisosomas (Enciso y Arroyo, 2011; Gómez *et al.*, 2011); lo que indica que el mecanismo de acción de ZnO/Vp puede actuar principalmente en el secuestro de radicales libres, la inhibición de las oxidasas (lipooxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa y la xantina oxidasa) que en consecuencia evitan la formación de especies reactivas de oxígeno que provocan la inflamación.

### CONCLUSIONES

Las nanopartículas de óxido de zinc/extracto etanólico de *Verbesina persicifolia* poseen efecto antiinflamatorio en el modelo *in vitro* de estabilidad

de la membrana inducida con solución hipotónica y en el modelo *in vivo* de edema plantar en rata inducido con carragenina. La dosis mínima efectiva en el modelo animal fue de 200 mg/kg con un efecto antiinflamatorio dosis dependiente, observado mayormente en la fase 2 del modelo de inflamación *in vivo*, lo que sugiere que actúa en la fase mediada por la liberación de elementos proinflamatorios como: prostaglandinas, bradiquinina, proteasa y lisosomas.

### Perspectivas

Realizar estudios de estabilidad al complejo ZnO/Vp, además de utilizar ZnO de tamaño de partícula más pequeño. Elucidar el mecanismo de acción por el que promueve la actividad antiinflamatoria.

### BIBLIOGRAFÍA

Águila, J., Moreno, J.A., Díaz, A.D., Aguilar, A.E., Atzin, C.M., Santander, V., Santander, C., Rubio, E. & Moreno, L. (2015). Encapsulation of Glycosides from Extract *Plantago major* in ZnO Matrices by Sol-Gel. *Journal of Materials Science and Engineering A; +Q* 5(3-4): 154-158.

- Aini, B., Siddquee, S., Ampon, K., Rodrigues, K. & Suryani, S. (2015). Development of glucosa biosensor based on ZnO nanoparticles film and glucosa oxidase-immobilized eggshell membrane. *Sensing and Bio-Sensing Research*; 4; 46-56.
- Arts, R., Joosten, L. & Netea, M. (2018). The Potential Role of Trained Immunity in Autoimmune and Autoinflammatory Disorders. *Frontiers in Immunology*; 9(209): 1-16.
- Balusu, S., Van Wonterghem, E., De Rycke, R., Raemdonck, K., Stremersch, S., Gevaert, K. *et al.* (2016). Identification of a novel mechanism of blood brain communication during peripheral inflammation via choroid plexus- derived extracellular vesicles. *EMBO Mol Med*; 8(10): 1162-1183.
- Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Chiclana, C.F., Enrique, A. & Consolini, A.E. (2009). Actividad antiinflamatoria local de *Malva sylvestri* L. (Malvaceae) en el edema inducido por carragenina en ratas. *Lat. Am. J. Pharm*; 28(2): 275-8.
- Enciso, E. & Arroyo, J. (2011). Efecto antiinflamatorio y antioxidante de los flavonoids de las hojas de *Jungia rugosa* Less (matico de puna) en in modelo experimental en ratas. *An Fac med*: 72(4): 231-237
- Francisco, J., Villanueva, M., Lucho, C.A., Coronel, C., Hernández, M. & Flores, M.A. (2017). Biosíntesis de con Nanopartículas de ZnO Extracto Acuoso de Mucílago de *Opuntia amychlaea*. *Simposio Iberoamericano multidisciplinario de ciencias e ingenierías*; 5(5): 19-27.
- García, A., López, J. & Sánchez, M. (2000). Respuesta inflamatoria sistémica: fisiopatológica y mediadores. *Medicina Intensiva*; 24(8): 353-360.
- Gates, D., Yang, L., Wang, G., Tang, C., Wang, H. & Zhang, L. (2005). Synthesis and

- photoluminescence of corn-like ZnO nanostructures under solventthermal-assisted heat treatment. *Chemical Physics Letters*; 337-341
- Gómez, H., Gonzales, K. & Domingo, J. (2011). Actividad antiinflamatoria de productos naturales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*: 10(3); 182-217.
- López, M.G. (2015). *Evaluación del efecto anti-nociceptivo y anti-alodínico del extracto acuoso de huichin (Verbesina persicifolia DC) administrado de forma aguda en ratas macho de la cepa Wistar*. Tesis para obtener el título de doctor en neuroetología. Facultad de Química Farmacéutica Biológica. Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz.
- Marouf, S., Beniaiche, A., Guessas, H. & Azizi, A. (2016). Morphological, Structural and Optical Properties of ZnO Thin Films Deposited by Dip Coating Method. *Materials Research*: 20; 88-95
- Mavil, E. & Juárez, K.O. (2022). Toxicidad de nanopartículas de óxido de zinc y óxido de cobre en células del Sistema excretor. *Revista Farmacología*. 48-59.
- Miño, J., Gorzalczany, S., Moscatelli, V., Ferraro, G., Acevedo, C. & Hnatyszyn, O. (2001). Actividad antinociceptiva y antiinflamatoria de *Erythrina crista-galli* L. ("Ceibo"). *Acta Farm. Bonaerense*; 21(2): 93-8.
- Mishra, P.K., Mishra, H., Talegaonkar, S. & Vaidya, B. (2017). Zinc oxide nanoparticles: a promising nanomaterial for biomedical applications. *Drug discovery today*; 22(12): 1824-1834.
- Murugesan, D; & Deviponnuswamy R. (2014). Potential anti-inflammatory medicinal plants-A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*; 6(4): 43-49.
- Perea, A., López, G., de la Osa, M. & Reyes, U. (2017). Antiinflamatorios no esteroides y sus aplicaciones terapéuticas (Parte 2). *Bol Clin Hosp Infant Edo Son*; 34(1): 35-43.

- Prieto, C. & Vargas, E. (2000). Problemas de uso de los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) en pacientes con patología crónicas asociada. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*; 24(4): 85-91.
- Ríos, R. & Estrada, L.O. (2018). Descripción y cuantificación de riesgos atribuidos a analgésicos antiinflamatorios no esteroides no selectivos consumidos por la población mexicana. *Medicina Interna de México*; 34(2): 173-187.
- Sánchez, J., Medina, C., Lujan, E. & Salazar, A. (2019). Efecto antinociceptivo y antiinflamatorio de la metformina en modelos experimentales en ratón. *Horiz Med*; 19(3): 49-57.
- Soto-Ojeda, G.A., Gómez-Huesca, Y., García-Hernández, E., Villanueva-Lendecky, M.A (2018). Actividad Anti-inflamatoria *in-vitro* de los extractos hexánico y metanólico de *Verbesina persicifolia*. *Acta Tecnocientífica*: 1(0):40-48
- Thatoi, P., Kerry, R.G., Gouda, S., Das, G., Pramanik, K., Thatoi, H. & Patra, J.K. (2016). Síntesis verde fotomediada de nanopartículas de óxido de plata y zinc utilizando extractos acuosos de dos especies de plantas de manglares, *Heritiera fomes* y *Sonneratia apetala* e investigación de sus aplicaciones biomédicas. *Revista de fotoquímica y fotobiología B: Biología*; 163: 311-318.