



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRINCIPIOS ANTINOCICEPTIVOS DE *Zinnia grandiflora* NUTTALL
(ASTERACEAE)

T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Q.F.B. VALERIA ITZEL REYES PÉREZ

TUTORA

DRA. RACHEL MATA ESSAYAG
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

Ciudad Universitaria, Cd.Mx., Junio 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Dr. Robert Arthur Bye Boettler
VOCAL	Dr. Mariano Martínez Vázquez
VOCAL	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
VOCAL	Dra. Myrna Déciga Campos
SECRETARIO	Dr. Andrés Navarrete Castro

Lugar donde se realizó el trabajo de tesis:

Laboratorio 124, Conjunto E, Departamento de Farmacia,
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

QFB. Valeria Itzel Reyes Pérez

Sustentante

Dra. Rachel Mata Essayag

Tutora

DEDICATORIAS

Este trabajo está dedicado a todas las personas que en la vida me quieren y apoyan, sin importar el tiempo de conocernos, a los que son y están.

A toda mi familia mi más grande agradecimiento porque son y serán siempre mi impulso y apoyo incondicional. A mis padres, Marisela Pérez Avilés y Jesús Reyes Izquierdo, mi ejemplo. A mis hermanas, Katia y Mariana, mis mejores amigas, mis confidentes, las mejores del mundo. A mis sobrinos, Derek y Max, por ser parte de las mayores alegrías de mi vida. Los amo con todo lo que soy.

A mis amigas Ary, Mimi, Jenny, Faby, Say y Niza quienes me han brindado su amistad sincera siempre y a las que aprecio, admiro y quiero enormemente. Por estar a mi lado pase lo que pase.

A mis compañeros del Laboratorio 124, que se han convertido en poco tiempo en verdaderos amigos. Gracias Dani, Miri, Jeni, Lau, Ale, Artur, Baduel, Eric, Palapa, Ingrid y Husky por hacer los días de trabajo más alegres, por apoyarme en lo académico y en lo existencial, y ser como una segunda familia para mí.

A Dios, porque sin él nada, a su lado todo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas y a la Facultad de Química por brindarme la oportunidad y las herramientas para continuar con mis estudios profesionales.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de Maestría (número de becario 604037).

A la Dra. Rachel Mata Essayag, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por su tiempo, apoyo y entrega invaluable. Mi entera admiración para usted por ser no sólo una excelente investigadora sino también una gran persona. Muchas gracias.

Al Dr. Robert Arthur Bye Boettler y a la M. en C. Edelmira por su colaboración en la realización de este estudio mediante el suministro del material vegetal utilizado, y por sus aportaciones con la información botánica de la planta.

A la Dra. Araceli Pérez Vásquez, por su importante asesoría técnica y apoyo incondicional, que fueron de gran utilidad para poder adquirir habilidades y conocimientos en el laboratorio que han ayudado en gran medida a mi desarrollo profesional. Y por su valiosa amistad.

A la Dra. Isabel Rivero Cruz por su asesoría en las cuestiones técnicas de cromatografía, por ser una persona siempre dispuesta a enseñar y por la amistad que formamos en este tiempo.

A la Dra. Ana Laura Martínez por sus enseñanzas y colaboración en la realización de los experimentos biológicos presentados en este trabajo. Y a la Dra. Myrna Déciga Campos, por su valiosa asesoría en la ejecución e interpretación de los mismos.

A la Dra. Alicia Melgoza de la Universidad Autónoma de Chihuahua, Cd. Chihuahua, por su colaboración en la ubicación y recolección del material vegetal utilizado para este estudio.

ÍNDICE

DEDICATORIAS.....	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE.....	V
ÍNDICE DE TABLAS Y ESQUEMAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ABREVIATURAS.....	XI
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT.....	XV
1. ANTECEDENTES.....	1
1.1. El género <i>Zinnia</i>	1
1.1.1. <i>Zinnia grandiflora</i>	6
1.1.1.1. Usos tradicionales	8
1.1.1.2. Farmacología y Química	8
1.2. Dolor y Nocicepción	9
1.2.1. Neurofisiología de la nocicepción	10
1.2.2. Inflamación.....	13
1.2.3. Modelos animales para estudios de nocicepción.....	14
1.2.3.1. Modelo de la formalina	17
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	19
3. HIPÓTESIS.....	20
4. OBJETIVOS.....	21
4.1. General.....	21
4.2. Específicos	21
5. METODOLOGÍA	22
5.1. Material vegetal	22
5.2. Preparación del extracto acuoso de <i>Z. grandiflora</i>	22
5.3. Estudios químicos	22

5.3.1.	Fraccionamiento preliminar de la infusión de <i>Z. grandiflora</i>	22
5.3.2.	Aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios	23
5.3.3.	Establecimiento de los perfiles cromatográficos.....	26
5.4.	Estudios farmacológicos <i>in vivo</i>	27
5.4.1.	Preparación y administración de las muestras	28
5.4.2.	Determinación de la toxicidad aguda en ratones.....	28
5.4.3.	Evaluación del potencial antinociceptivo mediante el modelo de la formalina 29	
5.4.3.1.	Modelo del edema inducido por carragenina.....	29
5.5.	Análisis estadístico.....	30
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
6.1.	Estudios farmacológicos	31
6.1.1.	Toxicidad aguda del extracto acuoso	31
6.1.2.	Eficacia preclínica del extracto acuoso de <i>Z. grandiflora</i> como agente antinociceptivo	32
6.1.2.1.	Fraccionamiento preliminar del extracto activo y evaluación biológica del extracto activo	37
6.1.3.	Aislamiento de los principios mayoritarios de la fracción activa de CH ₂ Cl ₂ ... 41	
6.1.4.	Obtención de los perfiles cromatográficos de los extractos de <i>Z. grandiflora</i> .. 67	
7.	CONCLUSIONES	73
8.	PERSPECTIVAS	75
9.	REFERENCIAS.....	76
	ANEXOS.....	85

ÍNDICE DE CUADROS Y ESQUEMAS

CUADROS

Cuadro 1. Pruebas de nocicepción (Barrot, 2012).....	15
Cuadro 2. Gradiente de elución utilizado en la purificación por CLAE de la fracción B10 obtenida del fraccionamiento primario con CH ₂ Cl ₂	24
Cuadro 3. Gradiente de elución utilizado en el análisis cromatográfico por CLUE para el establecimiento de los perfiles cromatográficos de la fracción de CH ₂ Cl ₂ y AcOEt de la infusión de <i>Z. grandiflora</i>	27
Cuadro 4. Toxicidad aguda del extracto acuoso de <i>Zinnia grandiflora</i>	31
Cuadro 5. Datos de RMN de ¹ H (400 MHz) y ¹³ C (100 MHz) en CDCl ₃ de la Zinagrandinólida D.....	46
Cuadro 6. Datos de RMN de ¹ H (400 MHz) y ¹³ C (100 MHz) en CDCl ₃ de la Zinagrandinólida E.....	54
Cuadro 7. Datos de RMN de ¹ H (400 MHz) y ¹³ C (100 MHz) en CDCl ₃ de la zinagrandinólida F y zinagrandinólida C.....	61

ESQUEMAS

Esquema 1. Proceso fisiológico del dolor.....	11
Esquema 2. Mediadores involucrados en la respuesta nociceptiva.....	12
Esquema 3. El metabolismo del ácido araquidónico en el proceso de inflamación....	14

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución del género <i>Zinnia</i> en México.....	2
Figura 2. Guayanólidas aisladas del género <i>Zinnia</i>	3
Figura 3. Germacranólidas aisladas del género <i>Zinnia</i>	4
Figura 4. Eudesmanólidas aisladas del género <i>Zinnia</i>	4
Figura 5. γ - Elemanólidas aisladas del género <i>Zinnia</i>	5
Figura 6. Distribución de <i>Zinnia grandiflora</i> en México y EUA.....	7
Figura 7. <i>Zinnia grandiflora</i> . A) Hojas. B) Flores. C) Planta completa	7
Figura 8. Lactonas sesquiterpénicas, tipo δ -elemanólidas de <i>Z. grandiflora</i>	9
Figura 9. Aumento ponderal promedio de los pesos de los ratones después de la administración aguda del extracto acuoso de <i>Zinnia grandiflora</i> durante 14 días de observación.	32
Figura 10. Curso temporal del efecto antinociceptivo del extracto acuoso (E.A.) de <i>Z. grandiflora</i> (10.0 -562.3 mg/kg) en el modelo de la formalina en ratones.	34
Figura 11. Efecto antinociceptivo del extracto acuoso (E.A.) de <i>Z. grandiflora</i> (10.0 – 562.3 mg/kg) en el modelo de la formalina en ratones.....	35
Figura 12. Efecto antiinflamatorio del extracto acuoso (E.A.) de <i>Z. grandiflora</i> (31.6 – 316.2 mg/kg) en el modelo del edema inducido por carragenina ratones.....	36
Figura 13. Curso temporal del efecto antinociceptivo de la fracción de AcOEt de la infusión de <i>Z. grandiflora</i> (100.0 – 562.3 mg/kg) en el modelo de la formalina en ratones.....	38
Figura 14. Curso temporal del efecto antinociceptivo de la fracción de CH ₂ Cl ₂ de la infusión de <i>Z. grandiflora</i> (100.0 – 562.3 mg/kg) en el modelo de la formalina en ratones.....	38
Figura 15. Efecto antinociceptivo de la fracción de AcOEt de la infusión de <i>Z. grandiflora</i> (100.0 – 562.3 mg/kg) en el modelo de la formalina en ratones	39
Figura 16. Efecto antinociceptivo de la fracción de CH ₂ Cl ₂ de la infusión de <i>Z. grandiflora</i> (100.0 – 562.3 mg/kg) en el modelo de la formalina en ratones	40

Figura 17. Metabolitos novedosos aislados de la fracción de CH ₂ Cl ₂ de <i>Z. grandiflora</i> : zinagrandinólidas D-F (2-4).....	41
Figura 18. Espectro obtenido por CLUE-ESI-MS en el modo negativo (arriba) y positivo (abajo) de la Zinagrandinólida D.....	42
Figura 19. Espectro obtenido por CLUE-ESI-MS en el modo positivo de la Zinagrandinólida E.....	43
Figura 20. Espectro obtenido por CLUE-ESI-MS en el modo positivo de la Zinagrandinólida F.....	43
Figura 21. Perfiles de UV obtenidos por CLUE-PDA de las Zinagrandinólidas D-F	44
Figura 22. Principales correlaciones observadas en el experimento de A) HMBC y B) NOESY para la Zinagrandinólida D.	45
Figura 23. Espectro de ¹ H-RMN (400 MHz, CD ₃ Cl ₃) de la Zinagrandinólida D.....	47
Figura 24. Espectro de ¹³ C-RMN (100 MHz, CD ₃ Cl ₃) de la Zinagrandinólida D.....	48
Figura 25. Correlaciones selectas en el espectro bidimensional COSY de Zinagrandinólida D.....	49
Figura 26. Correlaciones selectas en el espectro bidimensional NOESY de Zinagrandinólida D.....	49
Figura 27. Correlaciones selectas en el espectro bidimensional ROESY de Zinagrandinólida D.....	50
Figura 28. Correlaciones selectas en el espectro bidimensional TOCSY de Zinagrandinólida D.....	50
Figura 29. Correlaciones selectas en el espectro bidimensional HSQC de Zinagrandinólida D.....	51
Figura 30. Correlaciones selectas en el espectro bidimensional HMBC de Zinagrandinólida D.....	51
Figura 31. Espectro de FTIR por reflectancia ATR de Zinagrandinólida D.....	52
Figura 32. Estructura tridimensional de la zinagrandinólida D (2) resuelta por difracción de rayos X.....	52
Figura 33. Principales correlaciones observadas en el experimento de A) HMBC y B) NOESY para la Zinagrandinólida E.....	53
Figura 34. Espectro de ¹ H-RMN (400 MHz, CD ₃ Cl ₃) de la Zinagrandinólida E.....	55

Figura 35. Espectro de ¹³ C-RMN (100 MHz, CD ₃ Cl ₃) de la Zinagrandinólida E.....	56
Figura 36. Correlaciones selectas en el espectro bidimensional COSY de Zinagrandinólida E.....	57
Figura 37. Correlaciones selectas en el espectro bidimensional NOESY de Zinagrandinólida E.....	57
Figura 38. Correlaciones selectas en el espectro bidimensional TOCSY de Zinagrandinólida E.....	58
Figura 39. Correlaciones selectas en el espectro bidimensional HSQC de Zinagrandinólida E.....	58
Figura 40. Correlaciones selectas en el espectro bidimensional HMBC de Zinagrandinólida E.....	59
Figura 41. Espectro de FTIR por reflectancia ATR de Zinagrandinólida E.....	59
Figura 42. Principales correlaciones observadas en el experimento de A) HMBC y B) NOESY para la Zinagrandinólida F.	60
Figura 43. I) Zinagrandinólida F. II) Zinagrandinólida C.....	61
Figura 44. Espectro de ¹ H-RMN (400 MHz, CD ₃ Cl ₃) de la Zinagrandinólida F.....	62
Figura 45. Espectro de ¹³ C-RMN (100 MHz, CD ₃ Cl ₃) de la Zinagrandinólida F.....	63
Figura 46. Correlaciones selectas en el espectro bidimensional COSY de Zinagrandinólida F.....	64
Figura 47. Correlaciones selectas en el espectro bidimensional NOESY de Zinagrandinólida F.....	64
Figura 48. Correlaciones selectas en el espectro bidimensional HMBC de Zinagrandinólida F.....	65
Figura 49. Espectro de FTIR por reflectancia ATR de Zinagrandinólida F.....	65
Figura 50. Cromatogramas característicos de la fracción de CH ₂ Cl ₂	68
Figura 51. Cromatogramas característicos de la fracción de AcOEt.....	69
Figura 52. Cromatograma de iones totales de la fracción de AcOEt identificando a los compuestos con <i>m/z</i> A) 461.72 (ESI+), B) 447.68 y 447.70 (ESI+), C) 285.5 (ESI-). D) Cromatograma obtenido por PDA de la fracción de AcOEt.....	70

ABREVIATURAS

¹³ C-RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
¹ H-RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
5-HT	Serotonina
ABC	Área bajo la curva
AcOEt	Acetato de etilo
AMPA	Ácido amino metil propionato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANADEVA	Análisis de varianza
ATP	Adenosina trifosfato
BK	Bradicinina
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCD	Cromatografía en capa delgada
CH ₂ Cl ₂	Cloruro de metileno o diclorometano
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
CLUE	Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia
COX	Ciclooxigenasa
DE ₅₀	Dosis efectiva media
DIC	Diclofenaco
DL ₅₀	Dosis letal media
ELSD	Detector evaporativo de dispersión de luz
EEM	Error estándar de la media
EM	Espectrometría de masas
ESI	Ionización por electrospray
FHEUM	Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos
GABA	Ácido γ -aminobutírico
HT	Histamina
IASP	Asociación Internacional para el Estudio del Dolor

IL	Interleucina
<i>i.pl.</i>	Administración intraplantar
IR	Espectroscopia de infrarrojo
Ka	Kainato
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
m/z	Relación masa carga
NA	Noradrenalina
NMDA	N-metil-D-aspartato
OMS	Organización Mundial de la Salud
PDA	Detector de arreglo de fotodiodos
PG	Prostaglandinas
PLA2	Fosfolipasa A2
PLC	Fosfolipasa C
<i>p.o.</i>	Administración oral
s.c.	Administración subcutánea
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
SP	Sustancia P
SSI	Solución salina isotónica
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRPA1	Receptores de potencial transitorio de anquirina 1
UV	Ultravioleta
VEH	Vehículo

RESUMEN

El presente trabajo describe el estudio farmacológico y químico de la especie vegetal *Zinnia grandiflora* Nuttall (Asteraceae), la cual se utiliza para el tratamiento de golpes y padecimientos dolorosos de estómago, nariz y garganta por grupos indígenas de América del Norte, incluyendo los Navajo, Ramah Navajo, Zuni, y Acoma y Laguna.

El estudio toxicológico del preparado tradicional (infusión) de *Z. grandiflora* en ratones se realizó a través del ensayo de toxicidad aguda de Lorke, lo que permitió establecer que su dosis letal media (DL₅₀) es mayor a 5 g/kg de peso del animal, y que no provoca efectos tóxicos visibles; por lo tanto se considera inocuo bajo las condiciones de experimentación.

La eficacia preclínica del extracto acuoso se demostró a partir de su actividad antinociceptiva en el modelo de la formalina en ratones utilizando como control el fármaco analgésico antiinflamatorio diclofenaco (31.6 mg/kg). Los resultados de este ensayo (10.0-562.3 mg/kg) revelaron un efecto antinociceptivo dependiente de la dosis; la DE₅₀ fue de 315.7 ± 85.5 mg/kg. El extracto acuoso presentó un mayor efecto en la fase inflamatoria del ensayo, mismo que se corroboró con el ensayo de la carragenina en ratones; la dosis más efectiva en este ensayo fue la de 100 mg/kg.

Las fracciones de acetato de etilo y diclorometano obtenidas por reparto de la infusión también resultaron activas, con un efecto dosis dependiente. Sin embargo, la fracción de diclorometano fue la más activa, con un efecto muy marcado en la fase inflamatoria del ensayo a la dosis más alta ensayada (562.3 mg/kg), con un efecto significativo al compararlo con el fármaco de referencia (DIC, 31.6 mg/kg) (p<0.01).

La fracción de diclorometano fue analizada químicamente utilizando diversos procedimientos cromatográficos. Este estudio permitió la obtención de tres lactonas sesquiterpénicas novedosas de tipo δ-elemanólida, los cuales se caracterizaron mediante

técnicas espectroscópicas y espectrométricas, y se denominaron con los nombres triviales de zinagrandinólidas D-F (2-4).

Se establecieron los perfiles cromatográficos de las fracciones orgánicas de diclorometano y acetato de etilo, obtenidas de la infusión por la técnica de reparto, mediante Cromatografía de Líquidos de Ultra Eficiencia acoplada a la Espectrometría de masas por ionización en electrospray con un detector de arreglo de fotodiodos (CLUE-PDA-ESI-EM). Los metabolitos aislados se identificaron en ambos en ambas fracciones mediante el análisis de sus espectros de UV, tiempos de retención y relación masa/carga (m/z) de la molécula protonada y/o desprotonada.

ABSTRACT

The present work describes the pharmacological and chemical study of the plant species *Zinnia grandiflora* Nuttall (Asteraceae), which is used to treat strokes, stomachache, and nose and throat pain by indigenous groups in North America, including the Navajo, Ramah Navajo, Zuni, and Acoma and Laguna.

Toxicological study in mice of the traditional preparation (infusion) of *Z. grandiflora* was carried out through the Lorke acute toxicity test, which allowed to establish that its median lethal dose (LD₅₀) is greater than 5 g / kg of animal weight, and that does not cause visible toxic effects; therefore, it is considered innocuous under the conditions of experimentation.

The antinociceptive potential of the aqueous extract was demonstrated by means of formalin test in mice; diclofenac (31.6 mg/kg) as analgesic-anti-inflammatory drug control. The results of this trial (10.0 - 562.3 mg/kg) revealed that the preparation has dose-dependent antinociceptive effect; the ED₅₀ was 315.7 ± 85.5 mg/kg. The effect was higher in the inflammatory phase of the assay which was corroborated with the carrageenan test in mice; the most effective dose in this trial was 100 mg/kg.

The primary fraction obtained by partitioning the active aqueous extract with ethyl acetate and dichloromethane were also active, and once more the effect was dose-dependent. The dichloromethane fraction was the most active with a remarkable effect at the highest dose tested (562.3 mg/kg) in the inflammatory phase of the bioassay, the activity was statistically significant in comparison with the reference drug (DIC, 31.6 mg/kg) ($p < 0.01$).

The dichloromethane fraction was chemically investigated using different chromatographic procedures. These processes yielded three novel δ -elemánólide sesquiterpene lactones, which were characterized by spectroscopic and spectrometric

techniques. These lactones were designed with the trivial names of zinagrandinolides D-F (2-4).

Chromatographic profiles of the organic fractions of dichlorometane and ethyl acetate obtained from the infusion by partition were established by Ultra Efficiency Liquid Chromatography with coupled photodiode array detector coupled to electrospray ionization mass spectrometry (CLUE-PDA-ESI-EM). The isolated metabolites were identified in both spectra by the analysis of their UV spectra, retention times, and mass/charge ratio (m/z) of the protonated or deprotonated molecule.

1. ANTECEDENTES

El nombre de la familia Asteraceae (Compositae) proviene del término latino “aster” que significa “estrella” y alude a la forma de las inflorescencias (Freire-Fierro, 2004). Entre las fanerógamas, las asteráceas constituyen una familia muy diversa y la más ampliamente distribuida; ésta cuenta con cerca de 1450 géneros y entre 20,000-30,000 especies en el mundo. En América, esta familia tiene una amplia representación y, tan sólo en México existen 373 géneros, 3080 especies nativas, y más de 29 géneros introducidos (Redonda-Martínez & Villaseñor-Ríos, 2011).

La importancia del estudio de la familia Asteraceae radica en que evolutivamente es la más exitosa dentro de las fanerógamas. Su expansión continua ha sido acompañada por diversos cambios anatómicos-morfológicos y metabólicos que le han permitido desarrollar nuevos mecanismos de defensa, como la formación de conductos laticíferos, la producción de alcaloides, terpenoides no aromáticos y aceites esenciales, entre otros. La familia incluye plantas de importancia económica, tanto alimenticias, medicinales, ornamentales e industriales (Cabral & Casco, 2010).

1.1. El género *Zinnia*

El género *Zinnia* (Asteraceae) se presume originario de México. Las primeras especies se llevaron a Europa en 1753 y seis años después Carlos Linneo bautizó el género en honor a Johann Gottfried Zinn, su profesor de botánica en la Universidad de Göttingen, Alemania (Stafleu & Cowan, 1988). *Zinnia* es un género relativamente pequeño con alrededor de 20 especies, de las cuales 11 especies son del Nuevo Mundo; pertenece a la tribu Heliantheae, subtribu Zinninae junto con los géneros *Tragoceros*, *Philactis*, *Aganippea*, *Samvitalia* y *Heliopsis* (Torres, 1963). Las especies de *Zinnia* se distribuyen en el continente americano desde el sur de los Estados Unidos de América

del Norte hasta Argentina (Bashyal, *et al.*, 2006; Motawe, *et al.*, 2015). En México, se encuentran distribuidas a lo largo de todo su territorio (**Figura 1**).

Algunas especies de *Zinnia* han sido reconocidas en gran medida por su valor ornamental, especialmente *Z. elegans*, *Z. haageana*, y *Z. angustifolia*, las cuales se cultivan ampliamente. Las especies con presunto valor medicinal son *Z. grandiflora*, *Z. linearis*, *Z. angustifolia*, y *Z. maritima*, estas dos últimas conocidas como “aceitilla” en Jalisco, dónde su decocción se dice que es “buena para la sangre” (Torres, 1963); mientras que *Z. linearis*, propia de la misma región, se utiliza para tratar dolores de estómago (Rose, 1899).

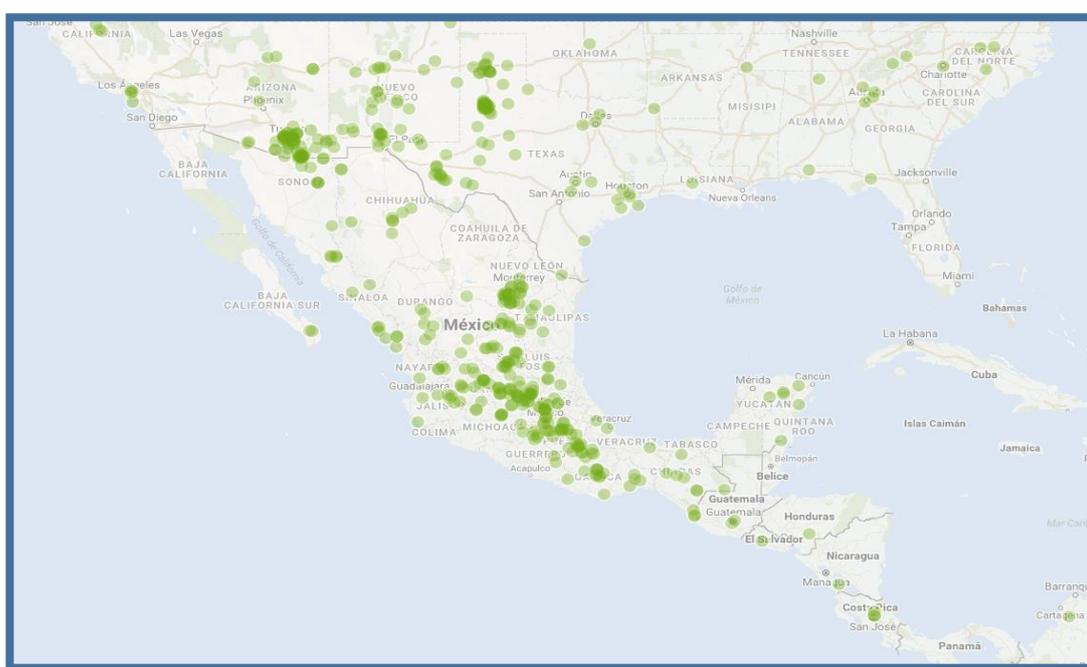


Figura 1. Distribución del género *Zinnia* en México. Imagen obtenida de Google INEGI, 2018. El naturalista.com [en línea] Consultado el 18 de enero de 2018. Disponible en: <http://www.naturalista.mx/taxa/132450-Zinnia>

Desde el punto de vista fitoquímico, los compuestos representativos del género *Zinnia* pertenecen a dos grandes grupos: flavonoides y lactonas sesquiterpénicas. Los flavonoides presentes en este género pertenecen a las categorías de las antocianidinas, flavonas, flavonoles, auronas y chalconas. Así, en *Z. elegans* se han encontrado ocho flavonoides derivados de campferol y luteolina, y antocianinas derivadas de la pelargonidina y la cianidina. En *Z. pauciflora*, el flavonoide más abundante en las flores es la apigenina-7-(4-aceto)-xilósido, y el campferol-7-glucoramnósido. En *Z. linearis*, se han

encontrado chalconas como la marina y auronas como la sulfureina y maritimeina (Harborne, *et al.*, 1983; Yamaguchi, *et al.*, 1990; Motawe, *et al.*, 2015).

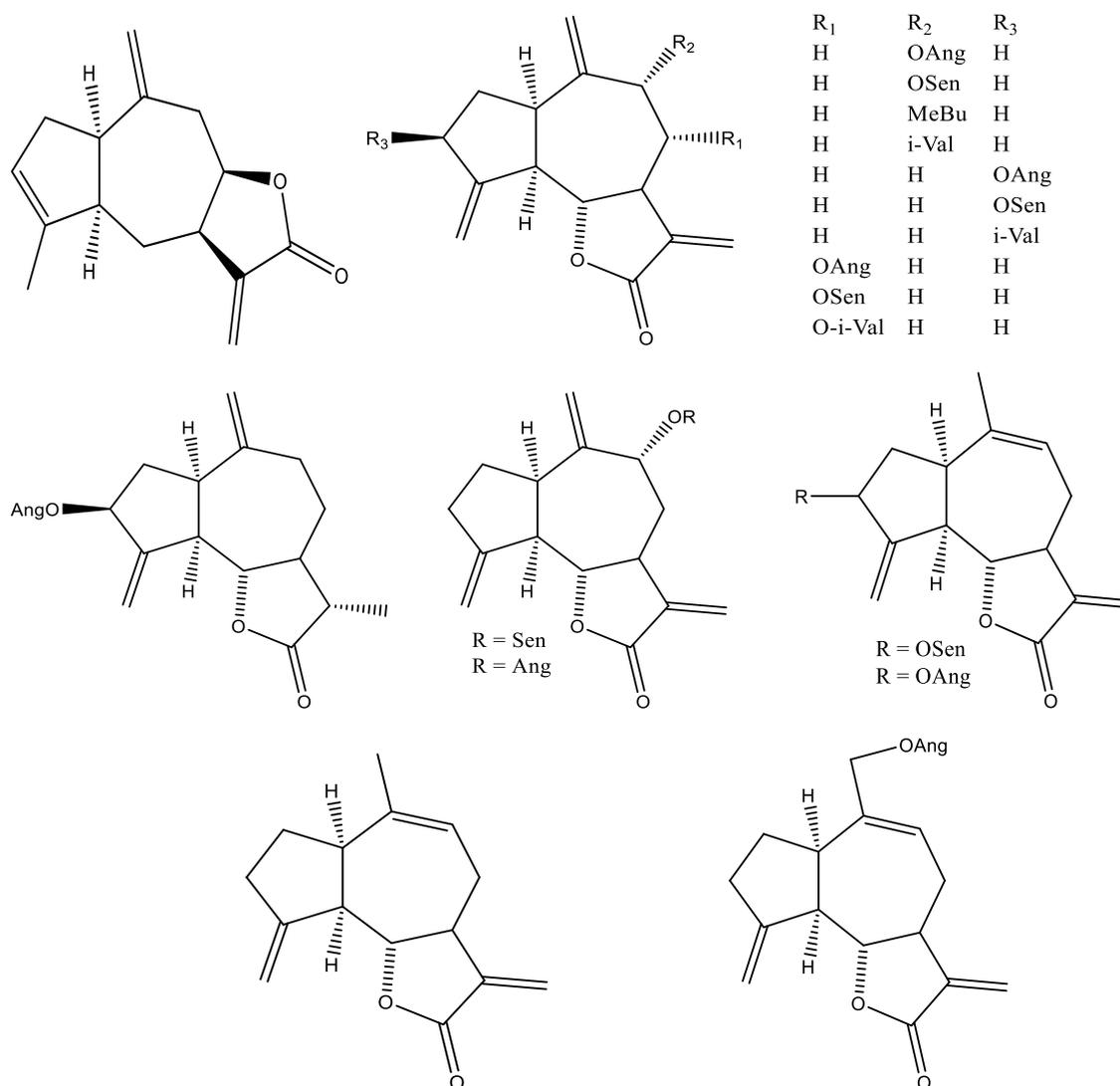


Figura 2. Guayanólidas aisladas del género *Zinnia*

Las lactonas sesquiterpénicas, por su parte, son los compuestos más comunes en el género *Zinnia*, ya que se han aislado de todas las especies estudiadas hasta ahora: *Z. grandiflora*, *Z. peruviana*, *Z. pauciflora*, *Z. multiflora*, *Z. juniperifolia*, *Z. citrea*, *Z. flavicomis*, *Z. angustifolia*, *Z. elegans*, *Z. baageana*, *Z. linearis*, *Z. tenuiflora*, *Z. verticillata*, *Z. acerosa* (Bohlmann, *et al.*, 1979; Bohlmann, *et al.*, 1981; Herz & Govindan, 1981; Herz & Govindan, 1982;

Ortega & Maldonado, 1982; Ortega, *et al.*, 1983; Ortega & Maldonado, 1985; Ortega, *et al.*, 1995). Dentro de este grupo de compuestos, las elemanólidas son las más abundantes en el género, pero también se han encontrado guayanólidas, germacranólidas y eudesmanólidas; estas últimas se ilustran en las **figuras 2, 3 y 4** (Bohlmann, *et al.*, 1981; Ortega, *et al.*, 1983).

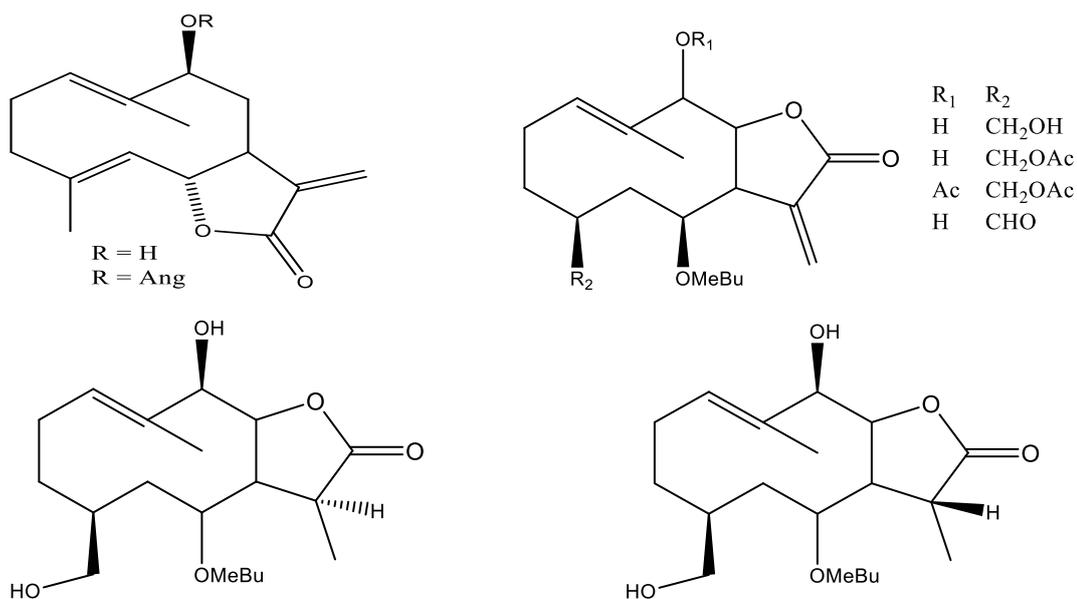


Figura 3. Germacranólidas aisladas del género *Zinnia*

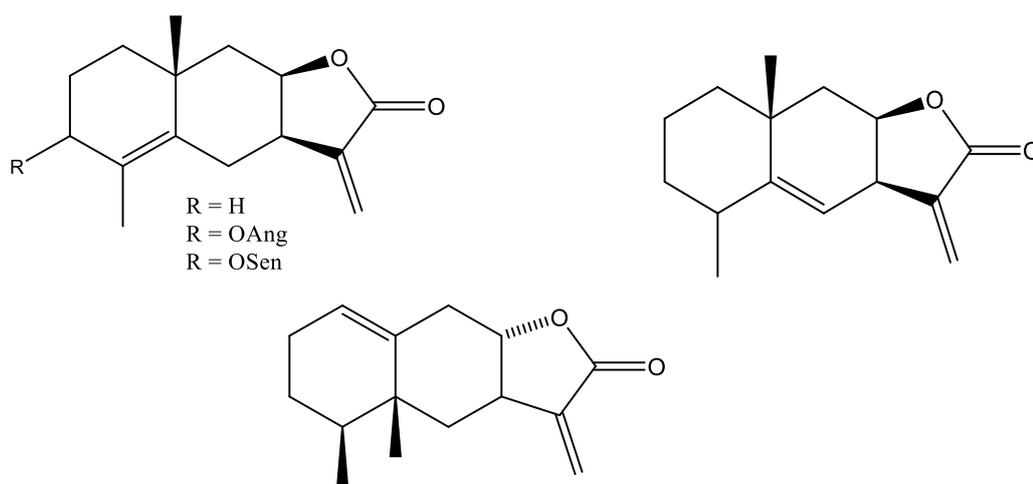


Figura 4. Eudesmanólidas aisladas del género *Zinnia*

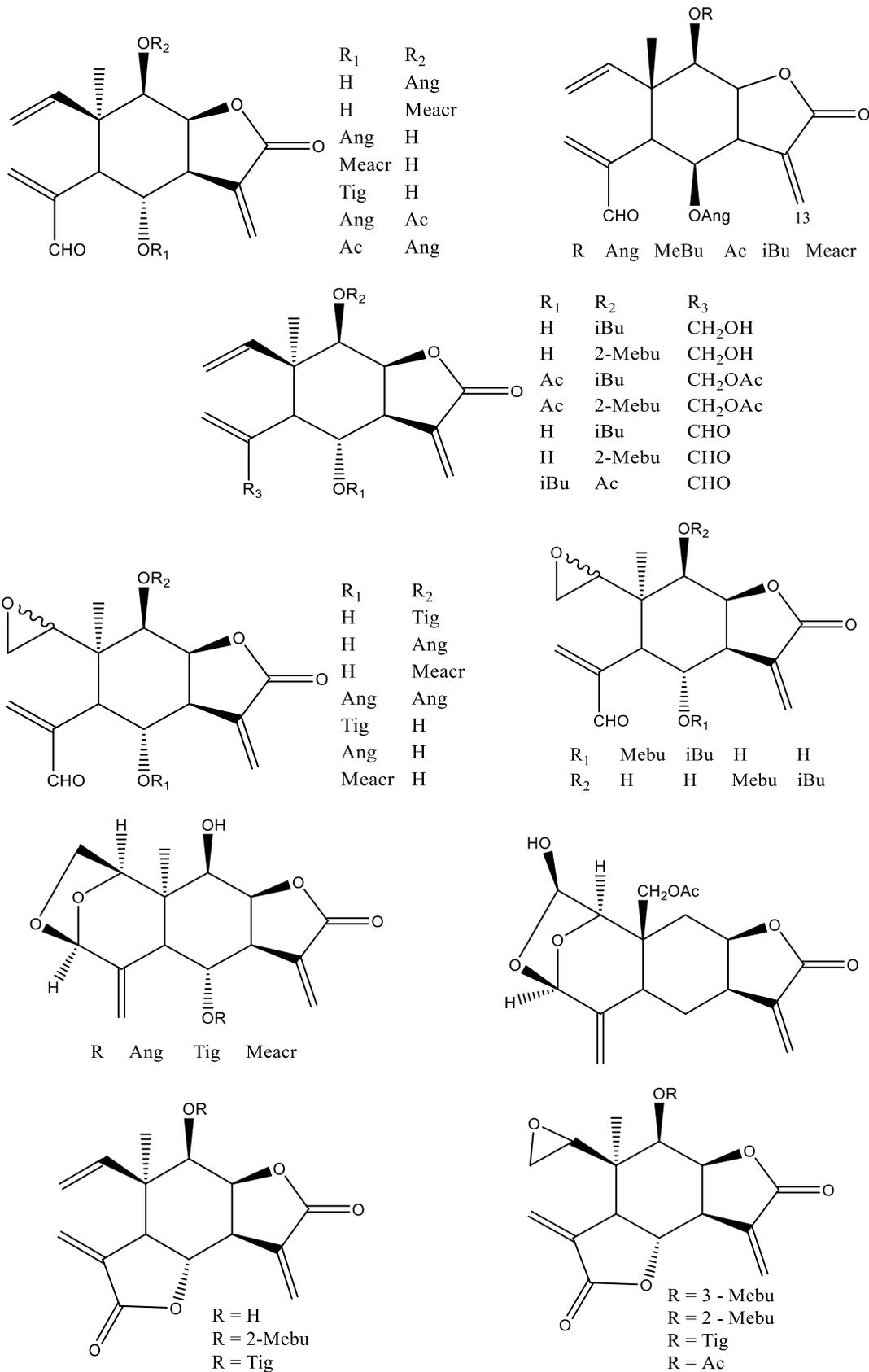


Figura 5. γ - Elemanolidas aisladas del género *Zinnia*

Las elemanólidas representan un grupo pequeño de lactonas sesquiterpénicas que biogenéticamente derivan de las germacranólidas. Estructuralmente, todas las elemanólidas contienen un ciclo de carbonos de seis miembros que soporta una lactona de cinco miembros (γ -elemanólidas), o de seis miembros (δ -elemanólidas) (Bashyal, *et al.*, 2006). Las γ -elemanólidas están distribuidas ampliamente en varios géneros de la familia Asteraceae, mientras que las δ -elemanólidas están restringidas al género *Zinnia*. A la fecha, se han obtenido cinco de estos compuestos en *Z. grandiflora*, *Z. juniperifolia*, y *Z. citrea*. (Bashyal, *et al.*, 2006). En la **figura 5** se ilustran las γ -elemanólidas del género *Zinnia*, mientras que las δ -elemanólidas, principalmente las presentes en *Z. grandiflora*, se detallaran más adelante.

Otros compuestos que se han aislado de las especies de *Zinnia* incluyen el germacreno D, *p*-cimeno, derivados del geranilgeraniol, y el pentaineno, un precursor de los heterociclos azufrados (Bohlmann, *et al.*, 1981; Zoghbi, *et al.*, 2000).

Desde el punto de vista farmacológico, las δ -elemanólidas de las especies de *Zinnia* no han sido evaluadas; sin embargo, tres γ -elemanólidas dilactonas, las zinaflavinas de *Zinnia flavicoma* demostraron actividad citotóxica en las líneas celulares HEp-2c (carcinoma humano de laringe) y L929 (células fibroblásticas de tejido conectivo de murinos normales) (Ortega & Maldonado, 1985; Bashyal, *et al.*, 2006).

1.1.1. *Zinnia grandiflora*

Zinnia grandiflora Nuttall (Sinónimo: *Crassina grandiflora* Nuttall) se conoce comúnmente en México como tepozana del burro o tepozana del becerro y en los Estados Unidos como Rocky Mountain *Zinnia* (*Zinnia* de las montañas Rocallosas). Se distribuye principalmente en el sur de los Estados Unidos, en las Grandes Planicies y el suroeste adyacente, incluyendo Arizona, Nuevo México, Colorado, Kansas, Oklahoma y Texas. En México, se encuentra en los estados de Chihuahua, Coahuila, Sonora y Tamaulipas. (Bashyal, *et al.*, 2006) (**Figura 6**)

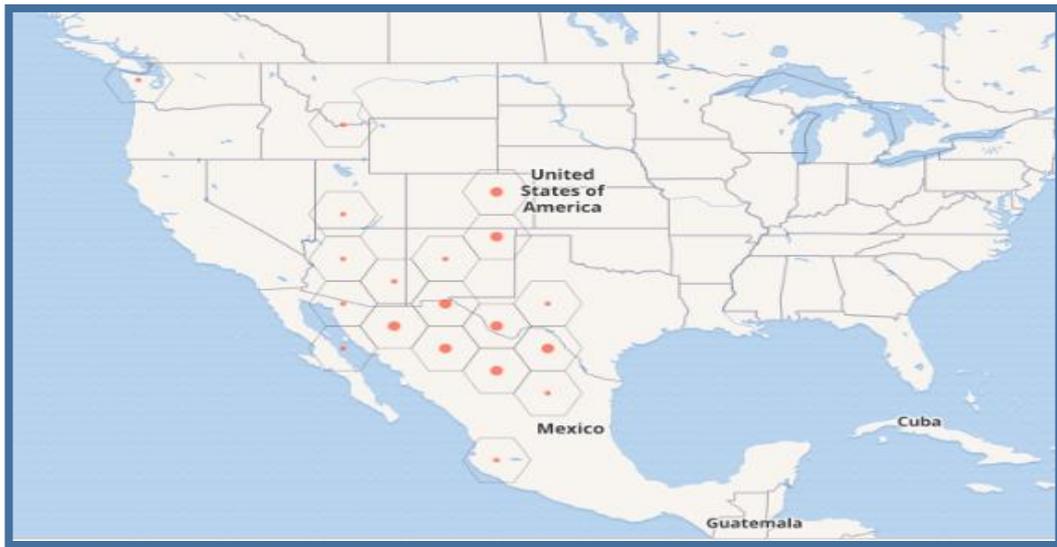


Figura 6. Distribución de *Zinnia grandiflora* en México y EUA. Imagen obtenida de GBIF. Global Biodiversity Information Facility [en línea] Consultado el 18 de enero de 2018. Disponible en: <https://www.gbif.org/species/3111778>

Es una planta perenne de bajo crecimiento en forma de montículo de 6-8 pulgadas, con numerosas flores amarillas brillantes de 3 a 6 rayos. Generalmente, posee varios tallos cortos, frondosos, y muy ramificados de base leñosa con numerosas cabezas de flores pequeñas, lo que hace que la planta sea casi como un arbusto. Presenta hojas diminutas en forma de aguja, que en conjunto forman una estera que se cubre de musgo cuando la planta no está en flor (**Figura 7**) (Miller, 1991).



Figura 7. *Zinnia grandiflora*. A) Hojas. B) Flores. C) Planta completa
 Fotos por Joseph A. Marcus y Charlie McDonald [en línea] Consultado el 18 de enero de 2018. Disponible en: www.wildflower.org y www.fs.fed.us

1.1.1.1. Usos tradicionales

El uso de *Z. grandiflora* se reporta principalmente en la etnobotánica de los grupos nativos norteamericanos. Los Navajo, nación indígena estadounidense que se establecieron en el suroeste, en los estados de Arizona, Nuevo México, Utah y Colorado, utilizan esta planta para tratar problemas de garganta y nariz (Elmore, 1944). Por su parte, los Ramah Navajo, hacen uso de la decocción de planta para tratar dolores de estómago, acidez estomacal y como catártico; así también, se reporta su uso como un emético ceremonial (Vestal, 1952). Los indios de Acoma (asentados desde hace 2000 años) y Laguna de Nuevo México, la utilizan para tratar golpes, sudor excesivo, dolores de estómago, agruras, fiebre, y problemas de garganta, nariz y riñones; mientras que las flores, en específico, se usan como tinte de color amarillo (Swank, 1932). De manera similar, los indios Zuni de la misma región utilizan el cataplasma de la planta molida para tratar hematomas, para la fiebre en baño de vapor, y la infusión fría de las flores para el lavado de ojos (Stevenson, 1915). Por otro lado, en México únicamente se encuentra en la literatura el reporte de Robert M. Zingg (1932), quien documentó el uso de *Z. grandiflora* en el estado de Chihuahua como astringente para la diarrea, y los reportes de comunicación personal de su uso en la misma región para el tratamiento de la diabetes por el Dr. Robert Bye (2017).

1.1.1.2. Farmacología y Química

Los estudios químicos previos sobre la especie sólo han permitido el aislamiento de lactonas sesquiterpénicas del tipo δ -elemánólidas: la 6R-(2''-hidroxiisobutanoiloxi)-8S-acetoxi-15-oxo-1S, 2-epoxi-3,11(13)-elemandien-12,9-ólida, y las denominadas zinagrandinólidas A-C, cuya estructura se muestra en la **Figura 8**. Desde el punto de vista farmacológico se ha reportado la actividad citotóxica del extracto hexánico de la planta y de las cuatro δ -elemánólidas antes mencionadas (Herz & Govidan, 1982; Bashyal, *et al.*, 2006).

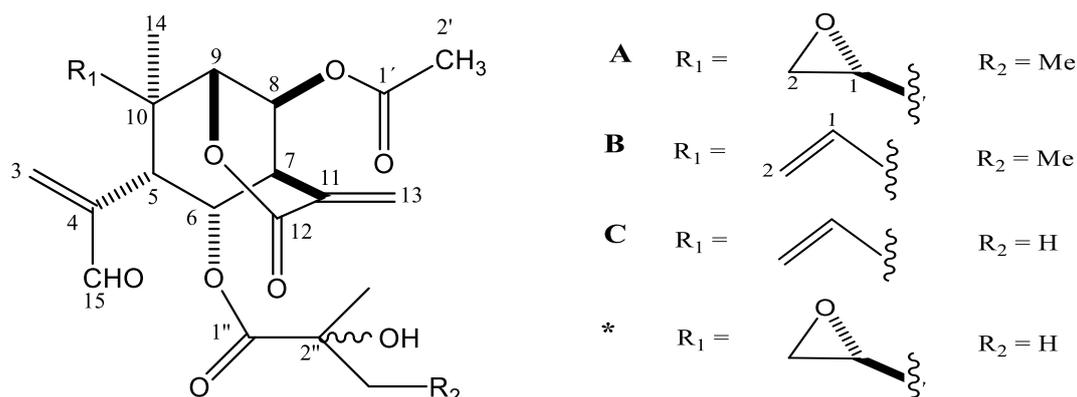


Figura 8. Lactonas sesquiterpénicas, tipo δ -elemanólidas de *Z. grandiflora*. * 6R-(2''-hidroxiisobutanoiloxi)-8S-acetoxi-15-oxo-1S, 2-epoxi-3,11(13)-elemandien-12,9-ólida. **A-C**, zinagrandinólidas. (Bashyal, *et al.*, 2006)

1.2. Dolor y Nocicepción

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés) lo define como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño tisular actual o potencial, o descrito en términos de tal daño (IASP, 1994). La importancia del dolor se debe a que es un mecanismo de defensa, o bien, una señal de alarma para proteger al organismo y aumentar la supervivencia del individuo. Sin embargo, la medición preclínica del dolor *per se* continua siendo un reto, ya que en pacientes, el dolor se evalúa y cuantifica mediante expresión verbal, lo cual no es posible en animales.

La nocicepción en cambio es un proceso neuronal mediante el cual se codifican y procesan los estímulos potencialmente dañinos contra los tejidos. Se trata de una actividad aferente (sensitiva) del sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP) producida por la estimulación de unas terminaciones nerviosas libres especializadas llamadas nociceptores o "receptores del dolor" que sólo responden a los cambios por encima del umbral del sistema, ya sean de naturaleza química (por ejemplo: polvo de chile en los ojos), mecánica (por ejemplo: pellizcar, golpear) o térmica (calor y frío) (King, *et al.*, 2016; Ang, *et al.*, 2017).

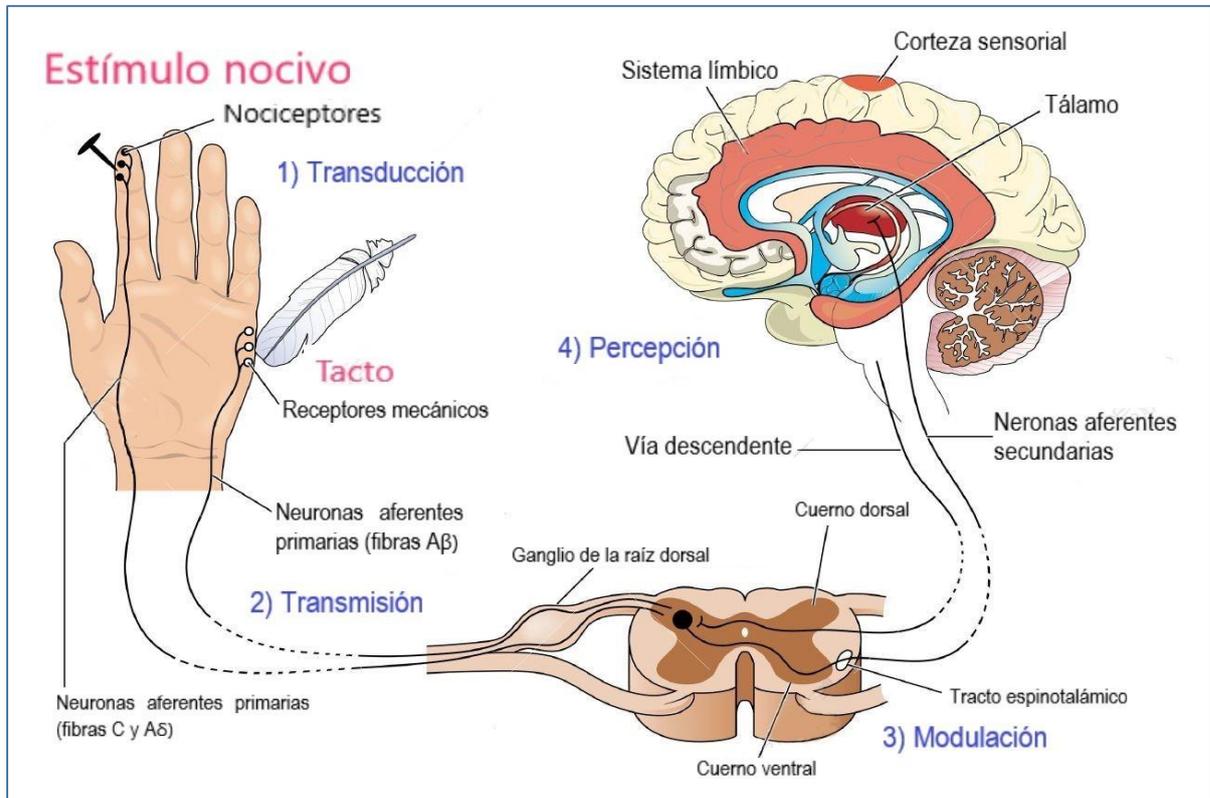
Desde el punto de vista neurofisiológico, la percepción del dolor precisa de la participación de ambos sistemas nerviosos, central y periférico (Romera, *et al.*, 2000), porque se producen: 1) una sensación corporal con cualidades como las reportadas durante la estimulación del daño tisular, 2) una sensación asociada con una amenaza experimentada, y 3) un sentimiento de disgusto u otra emoción negativa basada en una amenaza experimentada (Prince, 1999).

Por otro lado, la nocicepción, se refiere al proceso neuronal únicamente, mediante el cual un estímulo nocivo se traduce y codifica a través del SNC y SNP (King, *et al.*, 2016; Ang, *et al.*, 2017) y, en el cual, la información nociceptiva afecta de manera única al sensorio, genera una respuesta conductual; produce reflejos somáticos y autonómicos, y genera actitudes intencionales que cooperan con las respuestas reflejas para restaurar la homeostasis y proteger al organismo. (Vierck, 2006; Barrot, 2012)

1.2.1. Neurofisiología de la nocicepción

La vía neuroanatómica y neurofisiológica de la nocicepción se inicia periféricamente en tejidos donde una población celular lesionada de cualquier forma, genera una modificación en el microambiente de los receptores periféricos del dolor (nociceptores localizados en piel, músculo, esqueleto y vísceras), desencadenando una compleja secuencia de eventos que engloban al aferente primario, al ganglio de la raíz posterior, al asta dorsal medular y al resto de la vía nociceptiva (Eblen-Zajjur, 2005). Desde el punto de vista histológico, los nociceptores son terminaciones periféricas de las neuronas bipolares que tienen su soma en los ganglios raquídeos y cuyo axón centripeto penetra en el asta dorsal de la médula espinal. La activación de los nociceptores puede realizarse directamente, pero normalmente se realiza a través de diversos mediadores que ejercen una acción excitatoria o inhibitoria de las terminaciones nerviosas aferentes, actuando sobre receptores específicos o en los canales iónicos de la membrana. El resultado final es la modificación de la permeabilidad iónica y la génesis de impulsos que viajan al SNC (Romera, *et al.*, 2000; King, *et al.*, 2016). Una vez activado

el nociceptor comienza el proceso fisiológico del dolor, el cual está constituido por cuatro etapas: transducción, transmisión, modulación y percepción (**Esquema 1**).

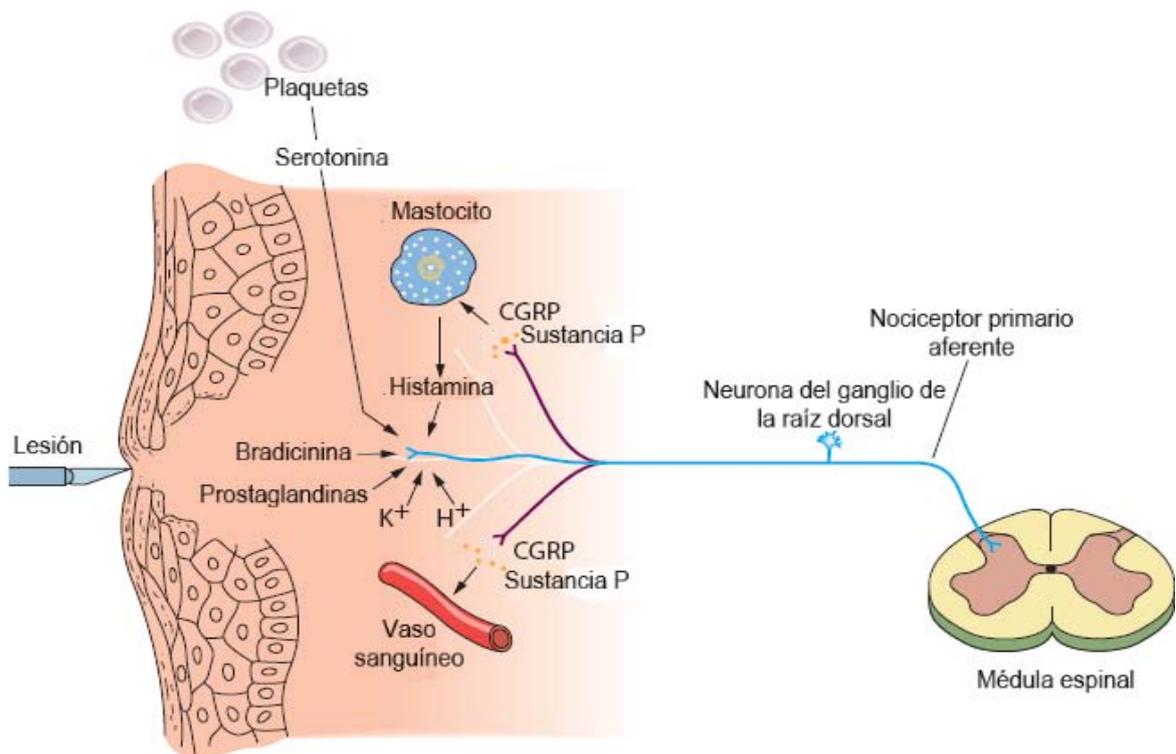


Esquema 1. Proceso fisiológico del dolor. 1) Traducción: El estímulo nociceptivo (térmico, mecánico o químico) se transforma en potenciales de acción en las terminales de las fibras aferentes periféricas. 2) Transmisión: los potenciales de acción viajan a través de la vía aferente primaria hasta llegar a la médula espinal. 3) Modulación: en la médula espinal se forman sinápsis con neuronas que suben a centros superiores. 4) Percepción: integración de la señal nociceptiva en la corteza somatosensorial. (Imagen modificada de: ID 56635420 © Gnanavel Subramani. Dreamstime.com)

Un estímulo nervioso o lesión tisular es capaz de inducir la producción de una gran cantidad de mediadores proinflamatorios (**Esquema 2**) cuyo efecto se traduce en la despolarización de la membrana neuronal a través de diversos mecanismos. Los principales mediadores y su función se mencionarán en los párrafos siguientes.

La sustancia P (SP), la bradicinina (BK), las prostaglandinas (PG), la histamina (HT), los hidrogeniones y el ATP son capaces de activar receptores en la membrana del aferente primario e incrementar la actividad intracelular de la fosfolipasa C (PLC)

(enzima que cataliza la hidrólisis de polifosfatidilinositol en inositol trifosfato y diacilglicerol), con lo que se incrementa la concentración de calcio intracelular, reduciendo la permeabilidad de la membrana al ion potasio con su consecuente despolarización. La permeabilidad de la membrana tanto para el ion calcio como para el ion sodio se potencia por efecto de neurotransmisores como glutamato, que actúa específicamente sobre los receptores ionotrópicos del tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), el ácido amino metil propionato (AMPA) y el kainato (Ka). (Guevara, 2004; Eblen-Zajjur, 2005). La HT, PG, y otros mediadores como la serotonina (5-HT) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) son capaces de despolarizar la membrana al incrementar la actividad de la adenilato ciclasa y, con ello, los niveles de AMPc intracelular. (Eblen-Zajjur, 2005)



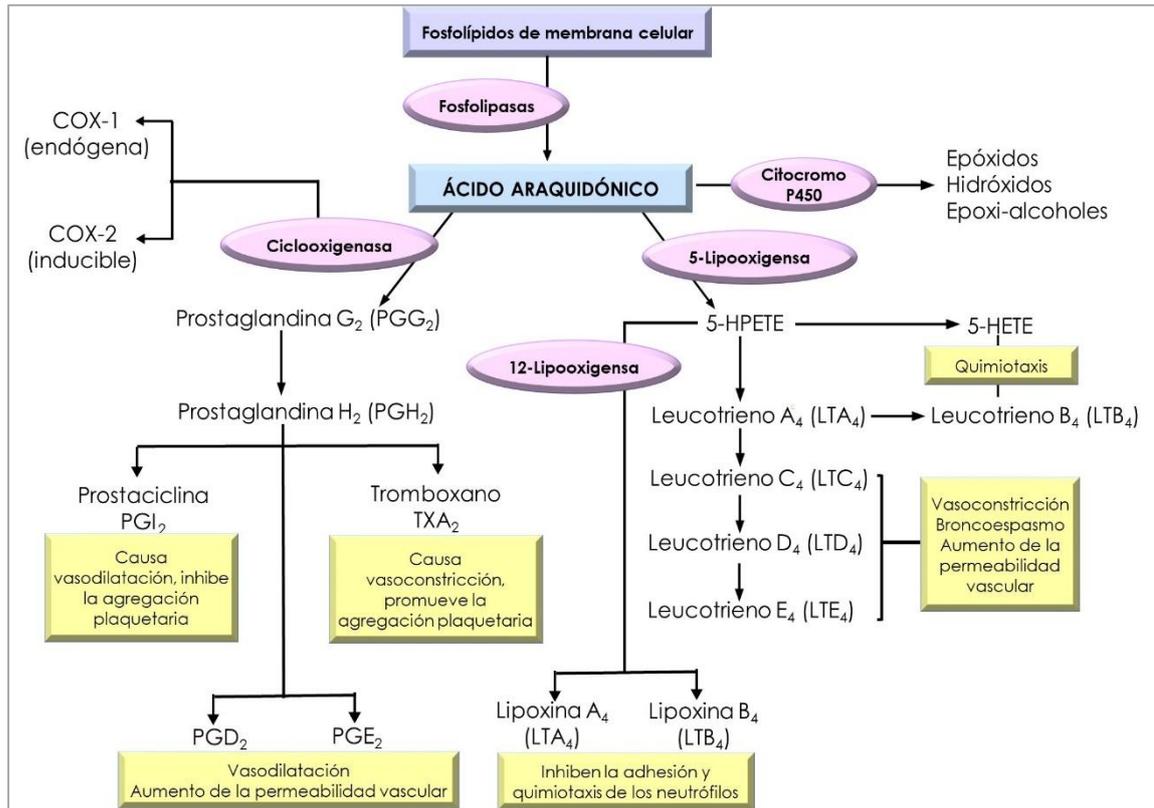
Esquema 2. Mediadores involucrados en la respuesta nociceptiva. (Modificado de: Nestler, E.J., et al. *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience*, 3er Edición: www.neurology.mhmedical.com)

1.2.2. Inflamación

La inflamación se puede definir como la respuesta no específica del huésped a una gran variedad de lesiones tisulares (Ramos, *et al.*, 2004). Cuando existe un daño tisular, como en una enfermedad autoinmune, una quemadura o al ser expuesto a un agente irritante, el sistema inmune libera mediadores inflamatorios que activan y sensibilizan al sistema nociceptivo (Barrot, 2012).

El proceso inflamatorio involucra la generación de interleucinas a partir de la IL-1 y el TNF α , y que se continúa con la IL-6. Estos factores promueven la liberación de aminoácidos excitatorios como el glutamato, péptidos de la vía nociceptiva como la SP y neuroquininas, que a su vez promueven la consecuente liberación de HT, proteasas, citocinas y eicosanoides (prostaglandinas inflamatorias, tromboxanos y leucotrienos), responsables de la vasodilatación, inducción de eritema, fiebre y sensibilización de los aferentes primarios (Eblen-Zajjur, 2005).

La producción de eicosanoides constituye uno de los sucesos más importantes en el proceso de la inflamación. La cadena metabólica de producción de eicosanoides, ocurre en primer lugar en los fragmentos de membrana (fosfolípidos) generados por la lesión tisular y sobre los cuales actúa la fosfolipasa A2 (PLA2), enzima citosólica de alto peso molecular encargada de producir ácido araquidónico libre. El ácido araquidónico se metaboliza a través de la vía de la ciclooxigenasa (COX), cuya actividad es producto de dos isoenzimas: una constitutiva (COX-1) y otra inducible por los componentes de la cadena inflamatoria (COX-2). Esta vía da lugar a prostaciclina, tromboxanos y prostaglandinas. De estas últimas, la prostaglandina E2 (PGE2) constituye el eicosanoide predominante en la cadena inflamatoria. Por otro lado, el ácido araquidónico puede también metabolizarse por la vía de las lipooxigenasas que dan lugar a leucotrienos y lipoxinas y, por último, a través de la vía del citocromo P450 que forma derivados epóxidos (**Ver Esquema 3**) (Eblen-Zajjur, 2005; Barreno, 2008).



Esquema 3. El metabolismo del ácido araquidónico en el proceso de inflamación. El ácido araquidónico se libera a partir de la actividad de fosfolipasas, específicamente la fosfolipasa A2 (PLA2), que actúa a partir de los fosfolípidos de las membranas celulares generados por la lesión tisular. El ácido araquidónico se convierte en la prostaglandina G2 (PGG₂), que a su vez se transforma en la prostaglandina H2 (PGH₂), por las enzimas ciclooxigenasas COX-1 y COX-2. Se considera que la COX-1 se expresa constitutivamente para mantener la homeostásis. La COX-2, por otro lado, es la enzima inducible, involucrada en la regulación de la inflamación. La vía de COX da lugar a las prostaglandinas, tromboxanos y prostaciclínas. El ácido araquidónico puede ser metabolizado a través de otras dos vías enzimáticas: lipooxigenasas, que dan lugar a leucotrienos (a partir de hidroperóxidos) y lipoxinas; y citocromo P450 que forma derivados epóxidos. (Barreno,

1.2.3. Modelos animales para estudios de nocicepción

El proceso nociceptivo puede ser estimado en animales a partir de la evaluación de una conducta o la medición de una respuesta a un estímulo específico. Un estímulo nocivo puede ser definido por su naturaleza física, su sitio de aplicación y por lo que ha ocurrido previamente en el tejido en ese sitio. Por ejemplo, el calor estimula selectivamente los termorreceptores y nociceptores, pero la baja potencia calorífica de los estímulos convencionales restringen su utilidad. Los estímulos químicos, por otro lado, difieren de los térmicos por el inicio progresivo de su efectividad, la duración de su

acción y el hecho de que tienen una naturaleza cierta e ineludible. Los modelos experimentales que emplean estímulos químicos son, indudablemente, los más similares al dolor clínicamente agudo. En la **Cuadro 1** se resumen las principales pruebas de nocicepción utilizadas en la investigación biomédica del dolor. (Barrot, 2012; Ang, *et al.*, 2017)

Cuadro 1. Pruebas de nocicepción (Barrot, 2012)					
Prueba	Modalidad	Estímulo	Parámetro medido	Especies	Condición
Retirada de la cola	Térmico, calor	T Fija	Latencia de retirada (s)	Rata, ratón	+++
Plato caliente	Térmico, calor	T Fija (48-55 °C)	Latencia de retirada/salto (s)	Rata, ratón	+++
Plantar	Térmico, calor	T Fija	Latencia de retirada (s)	Rata, ratón	+++
Plato frío	Térmico, frío	T Fija	Conteo (n)	Rata, ratón	+/-
Acetona	Térmico, frío	Aplicación por gotas	Conteo (n) o duración (s) o comportamiento nociceptivo	Rata (ratón)	+
Plato caliente dinámico	Térmico, caliente	Rampa de T	Conteo y respuesta umbral (T)	Rata, ratón	+

Plato frío dinámico	Térmico, frío	Rampa T	Conteo y respuesta umbral (T)	Rata, ratón	+/-
Von Frey	Mecánico	Presión múltiple fija	Umbrales de retirada (g)	Rata, ratón	+++
Randall-Selitto	Mecánico	Rampa de presión	Retirada y umbral de vocalización (g)	Rata	+++
Medidores de deformación	Mecánico	Rampa de presión	Umbral de retirada (g)	Rata	++
Formalina	Químico	Inyección de pata	Conteo (n)	Rata, ratón	+++
<p>+++, pruebas clásicas, estandarizadas; ++, prueba reciente; +, pruebas con algunas dificultades técnicas; +/-, procedimientos delicados; s, segundos; n, número; T, temperatura; g, gramos.</p>					

En el presente trabajo se eligió el modelo de la formalina, el cual ofrece información sobre la estimulación nociceptiva que genera este agente químico. Al ser también un modelo de inflamación localizada, genera la posibilidad de explorar el potencial antiinflamatorio al mismo tiempo (Ortega, *et al.*, 2002). La actividad antiinflamatoria observada en la fase 2 de la formalina puede corroborarse mediante modelos que se basen en la habilidad de las sustancias o compuestos para reducir el edema en la pata de la rata o ratón después de la administración de un agente flogístico, como es la carragenina, sustancia de elección para la evaluación de agentes antiinflamatorios, ya que no es antigénica, no presenta efectos sistémicos, tiene un alto

grado de reproducibilidad, y el proceso inflamatorio en respuesta a la misma depende completamente de la localización del estímulo (Winter, *et al.*, 1962).

1.2.3.1. Modelo de la formalina

Este modelo, introducido primero por Dubuisson y Dennis (1977), además de ser una prueba de nocicepción debido a la irritación en respuesta al estímulo químico, también puede ser considerado como un modelo de dolor inflamatorio a corto plazo, ya que induce inflamación periférica en la pata trasera del animal tras la inyección de un pequeño volumen de formalina (formaldehído diluido). La respuesta bifásica observada en animales en esta prueba, simula el dolor intenso que la sustancia provoca en los seres humanos (Ortega, *et al.*, 2002; Barrot, 2012). Este modelo resulta de interés por diversas razones:

- La inyección de formalina induce comportamientos de nocicepción persistentes que son dependientes de su concentración.
- Los cambios en los comportamientos nociceptivos responden de manera paralela a los cambios en las respuestas autonómicas.
- La nocicepción provocada por la formalina genera una respuesta de aversión, la cual es una medida que simula el estímulo nocivo que produce disgusto.
- El algógeno provoca la potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica y los cambios celulares en la médula espinal que mimetizan, en parte, el dolor experimental a largo plazo de la columna vertebral y que puede ser importante para el estudio de los estados del dolor en humanos. (Dubuisson & Dennis, 1997; Ang, *et al.*, 2017)

En roedores, la inyección de la formalina resulta en reflejos de retirada, lamidas, mordiscos o sacudidas de la pata del animal que son cuantificables y se caracteriza por una reacción de comportamiento bifásico que se describe a continuación:

- La fase inicial o primera fase: Se presenta alrededor de los primeros 10 minutos después de la inyección de formalina, seguida de un periodo de inactividad. Esta

fase se relaciona con la estimulación directa de los nociceptores y es sensible a los anestésicos locales.

- Segunda fase: Dura de 20 a 40 minutos e involucra mecanismos tanto inflamatorios como de sensibilización dentro del cuerno dorsal espinal. Esta segunda fase responde a varios fármacos con acción analgésica establecida clínicamente, como los opioides, los analgésicos antiinflamatorios esteroidales y no-esteroidales, antagonistas de NMDA, o gabapentina. (Barrot, 2012)

La nocicepción de la formalina está mediada en parte, por la excitación regulada por TRPA1 (Receptores de Potencial Transitorio de anquirina 1, de la familia de canales iónicos) de las fibras nociceptoras periféricas C y A δ . Las respuestas nociceptivas, especialmente las de la segunda fase, están parcialmente mediadas por la sensibilización espinal marcada por la plasticidad neuronal y celular, con un periodo predominante de descarga de los nociceptores C. (Vierck, 2006; Barrot, 2012; Ang, *et al.*, 2017). Análisis neuroquímicos han permitido establecer que durante esta prueba las neuronas colinérgicas y gabaérgicas del sistema septo-hipocampal son excitadas por lo que los niveles de acetilcolina y GABA, respectivamente, se incrementan en el hipocampo. Otro hallazgo importante es la inducción de la proteína c-Fos en el cuerno dorsal espinal de la rata que refleja los comportamientos inducidos por la formalina en la segunda fase (Guevara, 2004; Ang, *et al.*, 2017).

La participación de mecanismos antiinflamatorios que se observan en la segunda fase del modelo de la formalina, puede ser corroborada mediante la aplicación de otro modelo animal que involucre éstos mismos mecanismos de manera más específica, como lo es el modelo del edema de pata inducido por carragenina, el cual es ideal para el estudio de la inflamación aguda, ya que involucra la producción de mediadores como prostaglandinas y leucotrienos (De Faveri Favero, *et al.*, 2014)

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México, el empleo de la herbolaria para aliviar diversos padecimientos y enfermedades forma parte de la vida cotidiana de la población. Las razones son varias: el apego a las tradiciones, la firme creencia de que lo natural es sinónimo de inocuo, la falta de acceso a una atención médica oportuna y el alto costo de los medicamentos alopáticos. Desafortunadamente, no existe información científica suficiente sobre las plantas medicinales nacionales y sus preparados tradicionales que sustente su uso y respalde su eficacia, calidad, inocuidad, desarrollo sustentable, composición química, entre otros aspectos farmacéuticos (FHEUM, 2013). Por esta razón, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el marco de su estrategia sobre medicina tradicional 2014 – 2023, ha realizado numerosos llamados a sus países miembros para que investiguen científicamente, de forma sistemática y multidisciplinaria, los principales recursos utilizados en las prácticas médicas tradicionales con la finalidad de acceder a éstos de manera segura, asequible y efectiva; y con ello promover un servicio de salud integral, reglamentado y supervisado por los organismos gubernamentales correspondientes (OMS, 2013). Esta investigación debe abordar el estudio de aspectos etnobotánicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos y preclínicos de la planta en estudio, ya que sólo así será posible garantizar su uso racional.

Es por lo anterior que en la presente investigación se pretende determinar el potencial antinociceptivo a nivel preclínico de la infusión de *Zinnia grandiflora* con el fin de aportar evidencias farmacológicas que respalden las propiedades analgésicas y antiinflamatorias que se le atribuyen en diversas comunidades indígenas del sur de los Estados Unidos (Stevenson, 1915; Swank, 1932; Elmore, 1944; Vestal, 1952), y en los estados mexicanos de Chihuahua, Coahuila, Sonora y Tamaulipas (Bye, 2017: comunicación personal). De ser posible también se pretende determinar al menos uno de sus principios activos con el fin de sentar las bases para estudios químicos posteriores que permitan definir algunas de las pruebas de identidad y composición de *Z. grandiflora*.

3. HIPÓTESIS

Los antecedentes etnobotánicos de *Zinnia grandiflora*, así como consideraciones de tipo quimiotaxonómico, sugieren que el preparado tradicional de la especie posee propiedades analgésicas y antiinflamatorias debido a la presencia de compuestos susceptibles de purificación mediante la aplicación de métodos químicos apropiados.

4. OBJETIVOS

4.1. General

Determinar la eficacia preclínica de la infusión de *Zinnia grandiflora* como agente antinociceptivo en el modelo de la formalina en ratones.

4.2. Específicos

- a) Establecer la toxicidad aguda del extracto acuoso de *Z. grandiflora* y calcular la DL₅₀.
- b) Establecer el efecto del extracto acuoso de *Z. grandiflora* a diferentes dosis en el modelo de la formalina en ratones para así construir la curva dosis-respuesta y calcular la DE₅₀ del preparado.
- c) Realizar un estudio biodirigido del extracto acuoso con el propósito de obtener al menos un principio activo del preparado, para lo cual se utilizará el mismo ensayo farmacológico indicado en el inciso b y los procedimientos fitoquímicos convencionales.
- d) Caracterizar los principios activos aplicando aplicando las técnicas espectroscópicas y espectrométricas contemporáneas.
- e) Establecer el perfil cromatográfico de la infusión de *Z. grandiflora* mediante cromatografía de líquidos con el objetivo de contribuir al desarrollo de los parámetros de identidad de la especie.

5. METODOLOGÍA

5.1. Material vegetal

Las partes aéreas de *Zinnia grandiflora* fueron recolectadas en Chihuahua por el Dr. Robert Bye y la M. en C. Edelmira Linares 38402., investigadores del Instituto de Biología de la UNAM, quienes realizaron también la identificación botánica de la misma y depositaron una muestra de referencia en el Herbario Nacional (MEXU). El material vegetal se recibió seco por lo que se procedió a pulverizar la planta en un molino de cuchillas Thomas Wiley Modelo 4.

5.2. Preparación del extracto acuoso de *Z. grandiflora*

El extracto acuoso se preparó vía infusión a partir de las partes aéreas secas y molidas de *Z. grandiflora*, de acuerdo a los datos proporcionados por el botánico acerca de la posología de la planta en su uso tradicional. Para ello se colocaron 20 g del material vegetal en contacto con 1 L de agua a ebullición durante 30 min. Al cabo de este tiempo, el preparado se filtró para descartar el material vegetal. La infusión resultante se concentró a sequedad utilizando un rotaevaporador (BUCHI R-II-HB) adaptado a una bomba de vacío (BUCHI V-710). El rendimiento del extracto acuoso total fue de 18.2 % (18.2 mg/ g de droga cruda). Este proceso se repitió tantas veces como fue necesario a partir de la droga cruda.

5.3. Estudios químicos

5.3.1. Fraccionamiento preliminar de la infusión de *Z. grandiflora*

La infusión se fraccionó preliminarmente mediante la técnica de reparto con los disolventes orgánicos hexano (Hex), diclorometano (CH₂Cl₂) y acetato de etilo (AcOEt).

La extracción con cada uno de los disolventes se realizó exhaustivamente por triplicado, utilizando 500 mL por cada 500 mL de infusión. Las fracciones orgánicas resultantes en cada caso se secaron primero sobre Na₂SO₄ anhidro y, posteriormente, se concentraron a sequedad en un rotaevaporador (Helidolph Laborota 4000). Los rendimientos fueron 1.42 mg, 11.78 mg y 25.49 mg por g de droga cruda para la partición con Hex, CH₂Cl₂ y AcOEt, respectivamente.

5.3.2. Aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios

El fraccionamiento de los extractos y la purificación de los compuestos por cromatografía en columna abierta (CCA) se llevó a cabo en columnas de vidrio de distintas dimensiones empacadas con Sephadex® (LH-20; Sigma-Aldrich-Fluka, MO, EE.UU.) o con gel de sílice (60, 0.063-0.200; Merck, NJ, EE.UU.), empleando diversos sistemas de elución y aplicando técnicas fitoquímicas convencionales.

La fracción de AcOEt (2.643 g) se sometió a fraccionamiento primario mediante CCA sobre Sephadex (volumen muerto 350 mL), la cual se eluyó de manera isocrática utilizando como disolvente MeOH. Se colectaron eluatos de 10 mL los cuales se reunieron por su similitud cromatográfica para generar doce fracciones primarias (A01-A12). Este proceso permitió el aislamiento de 11.9 mg de luteolina (**1**) a partir de la fracción A10.

Luteolina (1): Sólido amarillo; p.f. 328-330 °C; ¹H RMN (CD₃OD, 700 MHz) δ_H (ppm): 7.37 (1H, m, H-6'), 7.37 (1H, m, H-2'), 6.90 (1H, d, J=8.4, H-5'), 6.53 (1H, s, H-3), 6.43 (1H, s, H-8) y 6.20 (1H, s, H-6). La identidad de la luteolina fue verificada por comparación con los valores espectroscópicos reportados en la literatura (El-Shafey & AbdElgawad, 2012).

La fracción de CH₂Cl₂ (9.359 g) se sometió a fraccionamiento primario mediante CCA sobre gel de sílice (253 g) desactivado al 10 %, la elución se realizó con un gradiente el cual comenzó con un sistema de Hex-AcOEt (90:10 → 0:100) e incrementado la polaridad hasta un sistema de AcOEt-MeOH (0:100 → 80:20). Se colectaron eluatos

de 50 mL los cuales se reunieron por su similitud cromatográfica para generar 22 fracciones secundarias (B1-B22).

Para la purificación de la fracción B10 por CLAE, se utilizó un cromatógrafo Waters equipado con una bomba cuaternaria modelo 2535, y dos detectores, uno de UV 2998 con arreglo de fotodiodos y un detector de ELSD 2424, y un colector de fracciones automático. De manera preliminar se utilizó la columna analítica de fase reversa XBridge Shield RP-18 (5 μm , 4.6 \times 250 mm) con un gradiente de elución empleando MeCN y H₂O_{dd} acidificada con 0.1% de ácido fórmico, a flujo de 1 mL/min; y posteriormente se utilizó la columna preparativa XBridgePrep Shield RP-18 (5 μm , 19 \times 250 mm), con un sistema de elución escalado, con flujo de 17.1 mL/min, e inyecciones de 150 μL (14.28 mg). El gradiente de elución utilizado se presenta en la **Cuadro 2**. El control del equipo, la adquisición y el procesamiento de los datos se realizó en el programa Empower v.3.0 (Waters, Miliford, MA, EE.UU.). De este fraccionamiento se obtuvieron tres compuestos puros: **2** (233.0 mg), **3** (92.7 mg) y **4** (9 mg).

Cuadro 2. Gradiente de elución utilizado en la purificación por CLAE de la fracción B10 obtenida del fraccionamiento primario con CH₂Cl₂.

Tiempo (min)	% MeCN	% H ₂ O (0.1% de ac. fórmico)
0	50	50
2	50	50
10	0	100
20	0	100

Zinagrandinólida D (2): Sólido blanco cristalino; p.f. 75-77 °C; ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ_{H} (ppm): 6.76 (1H, s, H-13), 6.60 (1H, d, $J=0.8$ Hz, H-3), 6.16 (1H, cc, $J=7.2, 1.6$ Hz, H-3'), 6.05 (1H, d, $J=0.8$ Hz, H-3), 6.01 (1H, dd, $J=17.4, 11.0$ Hz, H-1), 5.87 (1H, s, H-13), 5.59 (1H, dd, $J=3.6, 2.0$ Hz, H-8), 5.12 (1H, dd, $J=10.8, 0.8$ Hz, H-2), 5.06 (1H, dd, $J=3.2$ Hz, H-6), 5.04 (1H, dd, $J=16.8, 0.8$ Hz, H-2), 4.41 (1H, t, $J=2.4$ Hz, H-9), 3.43 (1H, d, $J=3.2$ Hz, H-5), 3.34 (1H, ddd, $J=7.0, 3.0, 0.8$ Hz, H-7), 2.66 (1H, sep, $J=7.0$ Hz, H-2"), 1.93 (3H, dc, $J=7.2, 1.6$ Hz, H-4'), 1.82 (3H, q, $J=$

1.6 Hz, H-5'), 1.47 (3H, s, H-14), 1.29 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-3''), 1.25 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-4''); ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} (ppm): 176.0 (C-1''), 171.0 (C-15), 166.7 (C-1'), 163.0 (C-12), 141.0 (C-1), 140.8 (C-3'), 135.6 (C-4), 133.5 (C-13), 132.1 (C-11), 132.0 (C-3), 127.0 (C-2'), 115.6 (C-2), 85.0 (C-9), 76.6 (C-6), 64.4 (C-8), 45.4 (C-10), 43.4 (C-7), 35.0 (C-5), 34.5 (C-2''), 20.5 (C-5'), 19.3 (C-4''), 18.9 (C-3''), 17.7 (C-14), 16.1 (C-4').

Zinagrandinólida E (3): Sólido blanco cristalino; p.f. 76-78 °C; ^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} (ppm): 6.75 (1H, s, H-13), 6.59 (1H, d, $J = 0.8$ Hz, H-3), 6.15 (1H, cc, $J = 7.2$, 1.6 Hz, H-3'), 6.04 (1H, s, H-3), 5.99 (1H, dd, $J = 17.4$, 11.0 Hz, H-1), 5.87 (1H, s, H-13), 5.58 (1H, dd, $J = 3.6$, 2.0 Hz, H-8), 5.11 (1H, d, $J = 11.2$ Hz, H-2), 5.06 (1H, dd, $J = 3.2$ Hz, H-6), 5.03 (1H, d, $J = 17.2$ Hz, H-2), 4.41 (1H, t, $J = 2.2$ Hz, H-9), 3.43 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, H-5), 3.33 (1H, dd, $J = 6.4$, 3.2 Hz, H-7), 2.46 (1H, sex, $J = 7.0$ Hz, H-2''), 1.92 (3H, dc, $J = 7.2$, 1.6 Hz, H-4'), 1.82 (3H, q, $J = 1.6$ Hz, H-5'), 1.76 (1H, sex, $J = 7.6$ Hz, H-3''), 1.53 (1H, ddd, $J = 14.0$, 7.5, 6.5 Hz, H-3''), 1.46 (3H, s, H-14), 1.27 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-5''), 0.93 (3H, t, $J = 7.6$ Hz, H-4''); ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} (ppm): 175.7 (C-1''), 171.8 (C-15), 166.7 (C-1'), 163.1 (C-12), 141.0 (C-1), 140.7 (C-3'), 135.7 (C-4), 133.6 (C-13), 132.2 (C-11), 131.9 (C-3), 127.0 (C-2'), 115.6 (C-2), 85.1 (C-9), 76.6 (C-6), 64.3 (C-8), 45.3 (C-10), 43.4 (C-7), 41.8 (C-2''), 34.8 (C-5), 26.6 (C-3''), 20.5 (C-5'), 17.6 (C-14), 17.1 (C-5''), 16.1 (C-4'), 11.9 (C-4'').

Zinagrandinólida F (4): Sólido vítreo; p.f. 59-61 °C; ^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} (ppm): 9.32 (1H, s, H-15), 6.78 (1H, s, H-13), 6.68 (1H, s, H-3), 6.23 (1H, s, H-3), 6.18 (1H, cc, $J = 7.4$, 1.6 Hz, H-3'), 5.88 (1H, dd, $J = 17.4$, 11.0 Hz, H-1), 5.86 (1H, s, H-13), 5.58 (1H, dd, $J = 3.6$, 2.0 Hz, H-8), 5.08 (1H, dd, $J = 10.8$, 0.8 Hz, H-2), 4.99 (1H, dd, $J = 3.2$ Hz, H-6), 4.97 (1H, dd, $J = 17.6$, 0.8 Hz, H-2), 4.42 (1H, t, $J = 2.4$ Hz, H-9), 3.48 (1H, d, $J = 3.2$ Hz, H-5), 3.35 (1H, ddd, $J = 6.8$, 3.2, 0.8 Hz, H-7), 1.93 (3H, dc, $J = 7.2$, 1.6 Hz, H-4'), 1.82 (3H, q, $J = 1.6$ Hz, H-5'), 1.58 (3H, s, H-4''), 1.55 (3H, s, H-3''), 1.46 (3H, s, H-14); ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} (ppm): 193.1, (C-15), 176.4 (C-1''), 166.7 (C-1'), 162.6 (C-12), 145.3 (C-4), 141.1 (C-1), 141.1 (C-3'), 139.2 (C-3), 133.9 (C-13), 131.6 (C-11), 126.9 (C-2'), 115.6 (C-2), 84.9 (C-9), 77.8 (C-8), 72.4 (C-2''), 64.1 (C-6), 45.1 (C-10), 43.2 (C-7), 32.3 (C-5), 27.7 (C-4''), 27.2 (C-3''), 20.5 (C-5'), 18.0 (C-14), 16.1 (C-4').

5.3.3. Establecimiento de los perfiles cromatográficos

Se estableció el perfil cromatográfico de las fracciones de CH_2Cl_2 y AcOEt . El análisis estas muestras se realizó en primera instancia por cromatografía en capa delgada (CCD) siguiendo las técnicas convencionales, empleando placas de aluminio de 0.25 mm de grosor recubiertas de gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck, NJ, EE.UU.) de distintas dimensiones utilizando distintos sistemas de elución. Se utilizó una lámpara de UV (254 y 365 nm) para la visualización de las placas y como agentes reveladores se utilizaron una solución de sulfato cérico amoniacal al 10 % en ácido sulfúrico [12 g de $\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_3$ en 22.5 mL de H_2SO_4 y 350 mL de H_2O], y H_2SO_4 al 10% en H_2O ; para desarrollar color en las placas se calentaron a 110 °C aproximadamente por un minuto.

Para la obtención de los perfiles cromatográficos de las fracciones por Cromatografía de Líquidos de Ultra Eficiencia acoplado a masas (CLUE-EM) se utilizó un cromatógrafo equipado con una bomba cuaternaria, un automuestreador, un detector de UV con arreglo de fotodiodos, una fuente de ionización en electrospray y un detector ELSD SQ2. Para el control del equipo, la adquisición y procesamiento de los datos se utilizó el programa Acquity (Waters, Miliford, MA, EE.UU.). Se utilizó una columna BEH C₁₈, con un gradiente de elución de MeCN y $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ (ácido fórmico 0.1%), con un flujo de 0.3 mL/min. El gradiente de elución utilizado se describe en la **Cuadro 3**. Las condiciones de ionización en los estudios por EM fueron las siguientes: voltaje del capilar (Kv): 3.5 (ionización positiva) y 2.5 (ionización negativa); Cono (V): 45.0; temperatura de la fuente: 120 °C; temperatura de desolvatación: 360 °C; flujo del gas de desolvatación (L/h): 571.

Cuadro 3. Gradiente de elución utilizado en el análisis cromatográfico por CLUE para el establecimiento de los perfiles cromatográficos de la fracción de CH₂Cl₂ y AcOEt de la infusión de *Z. grandiflora*.

Tiempo (min)	% MeCN	% H ₂ O (0.1% de ác. fórmico)
0.0	30	70
0.5	30	70
2.0	85	15
6.0	100	0
9.5	30	70
12.0	30	70

5.4. Estudios farmacológicos *in vivo*

Para la experimentación en animales se utilizaron ratones macho de la cepa ICR, con edad entre 3-4 semanas y peso corporal de 25-30 g que se obtuvieron a través de Envigo México RMS (Ciudad de México, México). Todos los animales de experimentación se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio, en ambiente controlado a una temperatura (22 ± 1 °C), ciclo de luz y oscuridad de 12 h, con acceso a alimento estándar y agua simple *ad libitum*, y un 70-80% de humedad relativa. Todos los protocolos experimentales se realizaron en conformidad con los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Salud Animal (NOM-062-ZOO-1999) y con los lineamientos internacionales para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NIH, 2011) y de acuerdo a los protocolos experimentales aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química, UNAM: FQ/CICUAL/235/17 (Modelo murino para establecer la toxicidad aguda de extractos vegetales y productos naturales de acuerdo al método de Lorke) y FQ/CICUAL/233/17 (Modelo murino para la evaluación del efecto antihiperálgico de especies de plantas medicinales y microorganismos fúngicos mexicanos).

5.4.1. Preparación y administración de las muestras

Todas las muestras se prepararon en suspensión utilizando como vehículo una solución salina isotónica (NaCl 0.9%, SSI) con 0.05 % de Tween 80. La administración se realizó vía oral (*p.o*) mediante sondas de acero inoxidable a razón de 0.2 mL/10 g de peso del animal. En la evaluación del potencial antinociceptivo, la formalina se administró vía subcutánea (*s.c.*) en el dorso de la extremidad posterior derecha del animal, mientras que en el modelo de edema de pata inducido por carragenina, ésta fue administrada vía intraplantar (*i.pl*). Ambas sustancias se administraron con jeringas hipodérmicas de 0.5 ml (31G × 8 mm) en volumen de 30 µl por pata.

5.4.2. Determinación de la toxicidad aguda en ratones

Para establecer la toxicidad aguda del extracto acuoso de *Z. grandiflora* se aplicó el protocolo descrito por Lorke (1983). Los tratamientos fueron administrados vía oral (*p.o*) en dos etapas independientes, para cada una se utilizaron doce ratones divididos en cuatro grupos (n=3). En la primera etapa, el extracto acuoso se administró a dosis de 10, 100 y 1000 mg/kg, mientras que en la segunda etapa se administraron dosis de 1600, 2900 y 5000 mg/kg. En cada etapa, se tuvo un grupo control el cual se administró únicamente con vehículo (SSI con 0.05 % de Tween 80). Después de cada administración, los animales fueron observados cuidadosamente durante 1 h para detectar signos y síntomas de toxicidad aguda como cambios en el comportamiento, o bien para registrar el número de muertes. Durante catorce días posteriores a la administración se registraron diariamente los pesos de todos los animales. Al cabo de este periodo, se sacrificó a los animales sobrevivientes en una cámara de CO₂ y se realizó la disección de los mismos para realizar un análisis macroscópico de los órganos internos (corazón, riñones, hígado y pulmones) en busca de lesiones. El cálculo de la dosis letal media (DL₅₀) se realizó a partir de la media geométrica entre la dosis más baja en donde se presentó la muerte de un animal y la dosis en la que no se presentó muerte; en caso en el que no se presente la muerte de algún animal de experimentación en ninguna de las

dosis ensayadas, se considera que la DL_{50} es mayor a 5 g/kg de peso corporal del animal (Lorke, 1983).

5.4.3. Evaluación del potencial antinociceptivo mediante el modelo de la formalina

Los ratones se sometieron a un proceso de acondicionamiento para lo cual se colocaron de manera individual dentro de cilindros de acrílico de 20 cm de diámetro × 40 cm de altura, a temperatura constante de 25 °C. Los tratamientos fueron administrados en dosis de 10, 31.6, 100, 316.2 y 562.3 mg/kg *p.o.*, en un volumen de 0.2 mL/10 g de peso corporal; mientras que el grupo vehículo recibió únicamente solución salina con 0.05 % de Tween 80. Como agente nociceptivo se empleó una solución de formalina al 2 % (preparado a partir de una solución de formaldehído al 37 % en agua inyectable). Luego de 30 minutos de la administración de los tratamientos, se aplicaron 30 µl de la solución de formalina de forma subcutánea en el dorso de la extremidad posterior derecha del ratón. La respuesta bifásica inducida por la formalina (lamer la pata administrada), se cuantificó en intervalos de 5 minutos durante media hora (Tjolsen, *et al.*, 1992; Yang, *et al.*, 2012) utilizando espejos de 40 × 40 cm detrás de los cilindros de acrílico para facilitar la observación. Como fármaco de referencia, se utilizó diclofenaco (DIC) a dosis de 31.6 mg/kg por vía oral (*p.o.*). Todos los grupos administrados (VEH, DIC, y tratamientos) fueron de seis animales ($n = 6$). Los animales se sacrificaron luego de concluido el procedimiento experimental y se calculó el área bajo la curva del curso temporal para la fase 1 y 2, y el área bajo la curva total.

5.4.3.1. Modelo del edema inducido por carragenina

Los ratones empleados para la prueba se dividieron en grupos de seis ($n = 6$): un grupo vehículo (VEH) que recibió únicamente SSI con 0.05 % de Tween 80; un grupo control, el cual se administró con el fármaco de referencia, diclofenaco (DIC) a dosis de 31.6 mg/kg en solución salina con 0.5 % de Tween 80; y tres grupos que se administraron

con el extracto acuoso a dosis de 31.6, 100 y 316.2 mg/kg. Todas estas administraciones se hicieron por vía oral (*p.o.*). Antes de comenzar el experimento los animales se sometieron a un proceso de acondicionamiento que consistió en colocarlos en un cilindro de acrílico transparente durante 30 min a temperatura controlada de 25 °C antes de la administración de cualquier tratamiento. Una vez finalizado el tiempo de acondicionamiento se administró a los animales, y se colocaron en los cilindros durante 30 minutos antes de la administración de la carragenina. Se administró de manera intraplantar (*i.pl*) en la extremidad posterior derecha una solución de carragenina en un volumen de 30 µl al 1% en solución salina. El volumen de la pata del ratón se midió utilizando un pletismómetro (modelo 7150, Ugo Basile, Italia), cada hora durante 6 horas después de la administración de la carragenina, mientras que el volumen basal se midió antes de la misma. Los animales fueron sacrificados utilizando una cámara de CO₂, una vez terminado el experimento y se calculó el área bajo la curva del curso temporal (Winter, *et al.*, 1962; Panthong, *et al.*, 1994; Mansour, *et al.*, 2014).

5.5. Análisis estadístico

Los datos se expresan como el promedio \pm el error estándar de la media (EEM). La estimación de la diferencia estadística significativa se calculó mediante un análisis de varianza (ANADEVA) de dos vías seguido de un análisis *post-hoc* de Bonferroni comparando con el grupo vehículo; o bien, se determinará mediante un ANADEVA de una vía seguida de un análisis *post-hoc* de Dunnett comparando con el grupo de vehículo o un análisis *post-hoc* de Tukey. El porcentaje de efecto antinociceptivo fue calculado a partir de los diferentes tratamientos en relación con el ABC del vehículo. La dosis efectiva media (DE₅₀) fue calculada a partir del método semilogarítmico (Tallarida, 2000) utilizando análisis regresión lineal. Para el cálculo de las diferencias estadísticas se utilizó el programa GraphPad Prism (version 5.0, GraphPad Inc., La Jolla, CA, EE.UU.).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Estudios farmacológicos

6.1.1. Toxicidad aguda del extracto acuoso

Para garantizar el uso de cualquier medicamento o preparado herbolario medicinal, el primer paso es la investigación sobre su toxicología, para lo cual, la determinación de la toxicidad aguda y la estimación de la DL_{50} es de importancia primordial. En el presente trabajo se utilizó el protocolo de Lorke (1983) para tal objetivo, el cual pretende el empleo de un mínimo de animales para la obtención de información adecuada y reproducible que permita evaluar la toxicidad aguda de cualquier sustancia desconocida. En este caso, los resultados de aplicar el protocolo mencionado indican que la administración oral del extracto acuoso de *Zinnia grandiflora* no provoca cambios en el comportamiento de los animales ni cambios físicos observables en los 14 días de experimentación de acuerdo al análisis estadístico que se hizo de la variación del peso de los animales durante ese periodo de tiempo (**Figura 9**). Tampoco se observaron daños macroscópicos a nivel de tejidos en ninguno de los animales diseccionados al término del experimento. En ninguna de las fases experimentadas se observó el deceso de ninguno de los animales (**Cuadro 4**), por lo que se determinó que la DL_{50} es mayor a 5 g/kg. Con lo anterior se concluye que la infusión de *Z. grandiflora* carece de efectos tóxicos agudos según los criterios propuestos por Lorke.

Cuadro 4. Toxicidad aguda del extracto acuoso de <i>Zinnia grandiflora</i> .			
Etapa 1		Etapa 2	
Dosis (mg/kg)	Mortalidad	Dosis (mg/kg)	Mortalidad
10	0/3	1600	0/3
100	0/3	2900	0/3
1000	0/3	5000	0/3

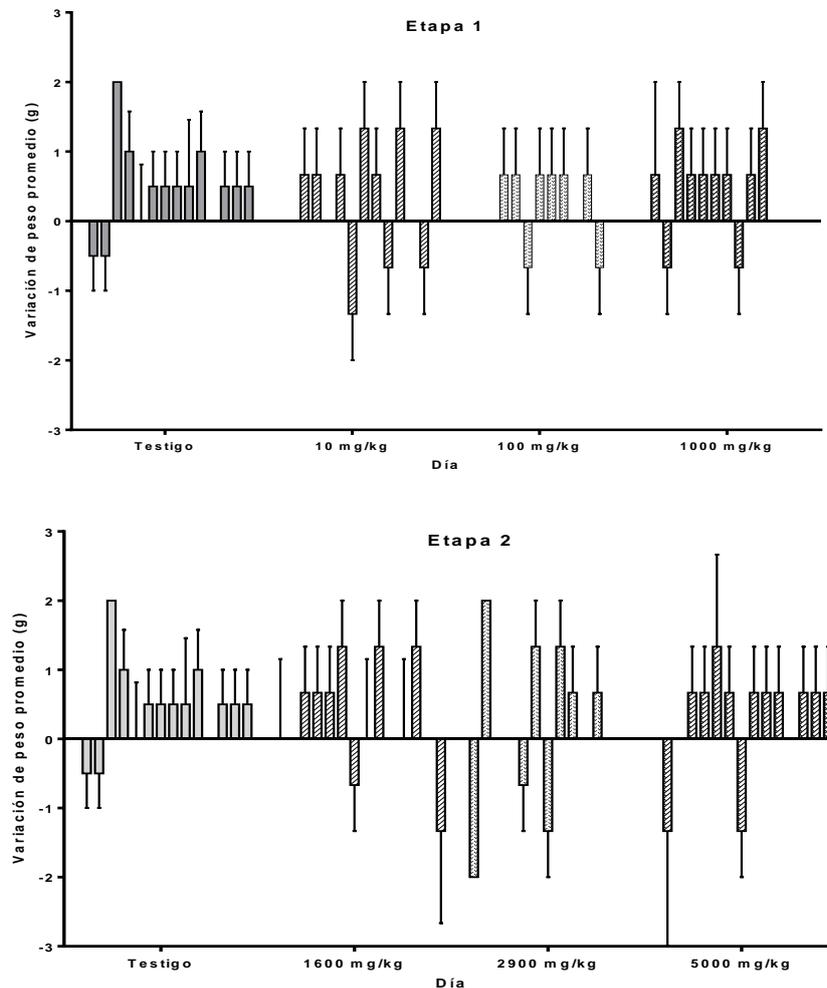


Figura 9. Aumento ponderal promedio de los pesos de los ratones después de la administración aguda del extracto acuoso de *Zinnia grandiflora* durante 14 días de observación.

6.1.2. Eficacia preclínica del extracto acuoso de *Z. grandiflora* como agente antinociceptivo

La aplicación de modelos animales para evaluar la eficacia preclínica de cualquier preparado o compuesto es imperante, ya que éstos proporcionan información oportuna que ayuda a comprender, por un lado, los mecanismos subyacentes del proceso en estudio y, por otro, los principios básicos que han de guiar la intervención terapéutica (Miller, 1985).

En esta investigación, se decidió utilizar el modelo de la formalina en ratones para evaluar la eficacia preclínica del extracto acuoso de *Z. grandiflora*. Este modelo permite evaluar si la actividad antinociceptiva está relacionada con un estímulo neurogénico o inflamatorio (De Faveri Favero, *et al.*, 2014), y utiliza la formalina (algésico) como estímulo químico nociceptivo que involucra un mecanismo de acción tanto periférico como central. Como control positivo, se eligió a la gabapentina y el diclofenaco. La gabapentina es un aminoácido derivado de GABA, que ejerce su acción mediante la unión a las subunidades accesorias $\alpha 2\delta$ de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, lo que resulta en una inhibición de la liberación de neurotransmisores excitatorios que se traduce en su efecto antinociceptivo y anticonvulsivo (Surcheva, *et al.*, 2017). El diclofenaco, al ser un fármaco analgésico antiinflamatorio no esteroideo, resulta útil para este tipo de ensayos, debido a que sus principales mecanismos de antinocicepción son la inhibición de COX, el aumento en la concentración de β -endorfinas en plasma; y activa la vía antinociceptiva del óxido nítrico-guanosín monofosfato cíclico (cGMP)-canales de potasio; mientras que algunos de sus mecanismos de acción antiinflamatoria incluyen también la inhibición de COX, del receptor de tromboxanos-prostanoides, y de enzimas lipooxigenasas, además de que afecta la liberación y recaptura de ácido araquidónico (Gan, 2010; Déciga-Campos, *et al.*, 2017).

Los resultados obtenidos en la aplicación de este modelo sugieren que el preparado tradicional de *Z. grandiflora* muestra actividad antinociceptiva al reducir el tiempo de lamida (s) en los ratones administrados con formalina a las diferentes dosis ensayadas (10 mg/kg – 562.3 mg/kg), como se puede observar en el curso temporal de la **Figura 10**.

El efecto antinociceptivo es dependiente de la dosis como se logra apreciar en los gráficos de porcentaje de antinocicepción y del área bajo la curva total (ABC_{total}) del tiempo de lamida (**Fig. 11 A-B**). Los efectos más notorios en comparación con el grupo VEH, se observan en las tres últimas dosis: la dosis de 100 mg/kg con un porcentaje de efecto promedio de 35.8 ± 3.6 %, y las dosis de 316.2 y 562.3 mg/kg con un porcentaje de efecto promedio muy similar, 49.5 ± 4.9 % y 57.6 ± 3.0 %, respectivamente. Los efectos inducidos por estas tres dosis son comparables al efecto producido por la

gabapentina ($45.7 \pm 3.5 \%$), sin embargo, a la dosis más alta existe una diferencia significativa de $p < 0.05$ en comparación con el diclofenaco ($37.7 \pm 4.5 \%$). A partir de la curva dosis-respuesta se calculó la DE_{50} con un valor de 315.73 ± 85.50 mg/kg de peso de acuerdo al modelo lineal semilogarítmico.

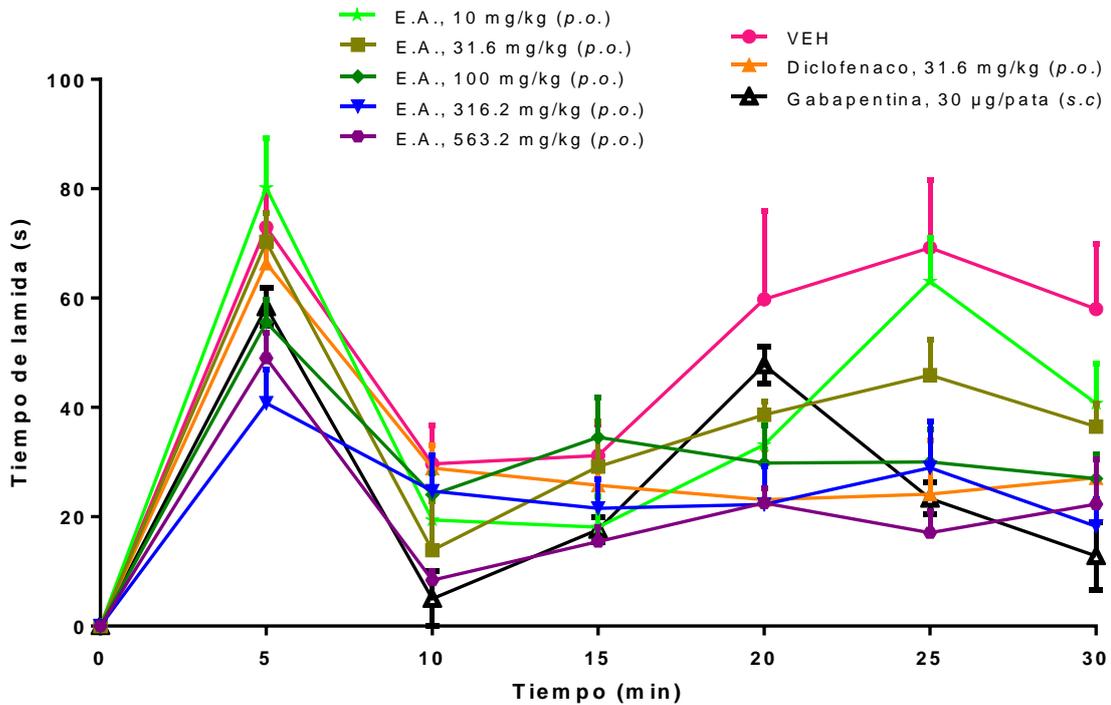


Figura 10. Curso temporal del efecto antinociceptivo del extracto acuoso (E.A.) de *Z. grandiflora* (10.0 -562.3 mg/kg) en el modelo de la formalina en ratones. VEH: vehículo (Solución salina 0.9%). DIC: diclofenaco (31.6 mg/kg, *p.o.*). GBP: gabapentina (30 µg/pata, *s.c.*). Cada medición representada como media \pm EEM con 6 ratones por grupo.

El efecto dosis-respuesta del extracto acuoso se mantiene en ambas fases del ensayo. En la fase 1 (5 - 10 min) (**Fig. 11-C**) se puede observar el efecto antinociceptivo máximo a la dosis de 316.2 mg/kg, mismo que se mantiene a la dosis de 562.3 mg/kg, ambas con una significancia estadística de $p < 0.001$ respecto al grupo VEH. Por otro lado, en la fase 2 del ensayo (10 – 30 min) (**Fig. 11-D**) es donde se observa un mayor efecto del extracto acuoso, a partir de la dosis de 100 mg/kg, que es comparable con el producido por ambos fármacos de referencia.

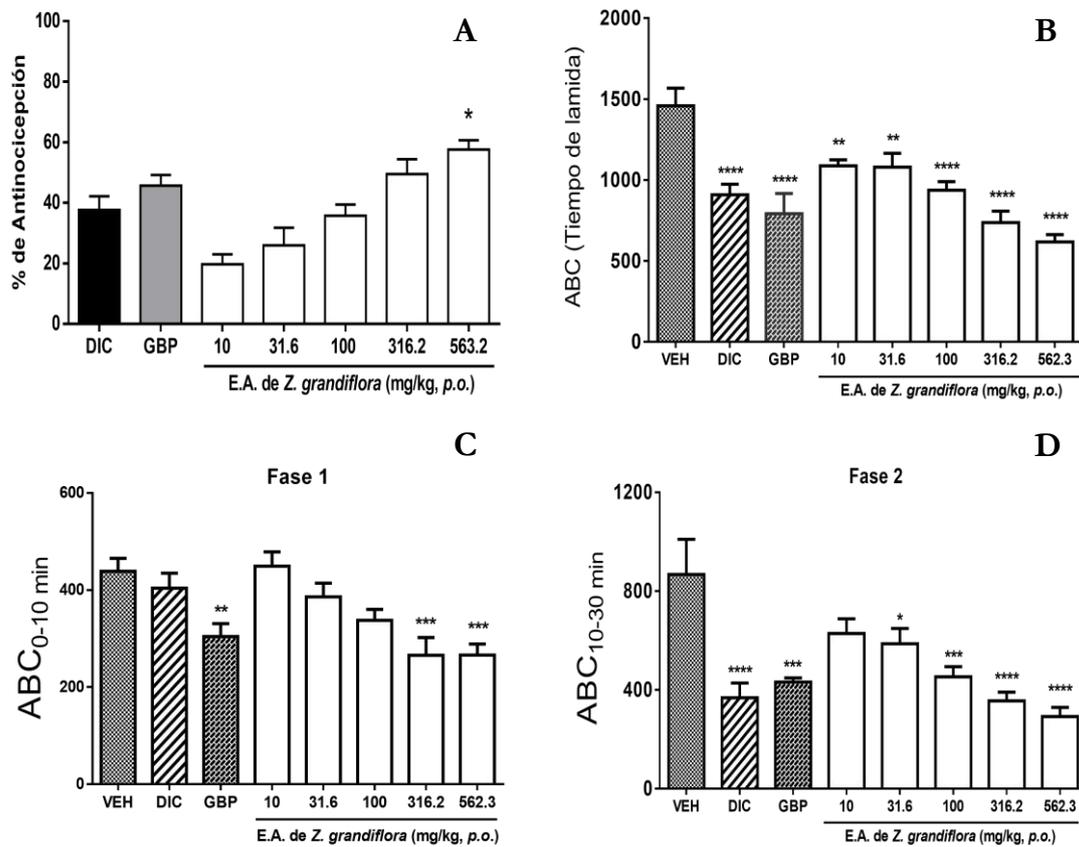


Figura 11. Efecto antinociceptivo del extracto acuoso (E.A.) de *Z. grandiflora* (10.0 – 562.3 mg/kg) en el modelo de la formalina en ratones. VEH: vehículo (Solución salina 0.9%). DIC: diclofenaco (31.6 mg/kg, p.o.). GBP: gabapentina (30 µg/pata, *s.c.*). (A) Porcentaje del efecto antinociceptivo (en relación al ABC de VEH), * $p < 0.05$, ANADEVAs de 1 vía seguido por test *post hoc* de Tukey comparado con DIC. (B) Gráfico de ABCtotal (min x s) del tiempo de lamida. (C) Gráfico del ABC de la fase 1. (D) Gráfico de ABC de la fase 2. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, y *** $p < 0.001$ de significancia estadística respecto a VEH, con ANADEVAs de 1 vía seguido por test *post hoc* de Dunnett. Cada medición representada como media \pm EEM con 6 ratones por grupo.

El dolor neurogénico, que se evalúa en la fase 1 de este modelo, es una consecuencia de la activación directa de las terminales nerviosas nociceptivas, mientras que el dolor inflamatorio, evaluado en la fase 2, está mediado por una combinación del mecanismo periférico involucrado y la sensibilización de la médula espinal. La formalina, al ser un agente químico irritante, induce un estado de nocicepción tónica, lo que produce incrementos en los niveles de diferentes mediadores en la médula, los cuales están relacionados tanto con la vía neurogénica (amino ácidos y cininas) como con la vía inflamatoria (histamina, prostaglandinas, leucotrienos, óxido nítrico y cininas) (Bars, et

al., 2001; De Faveri Favero, et al., 2014; Déciga-Campos, et al., 2017). Los resultados anteriores sugieren que el extracto acuoso presenta una actividad antinociceptiva que involucra tanto el dolor de origen neurogénico como inflamatorio, lo que justifica su uso etnofarmacológico para tratar padecimientos dolorosos (Stevenson, 1915; Swank, 1932; Elmore, 1944; Vestal, 1952).

Con la finalidad de corroborar las observaciones en la fase 2 del modelo de la formalina, se realizó la evaluación del extracto acuoso de *Z. grandiflora* en el modelo del edema de pata inducido por carragenina en ratones, cuyos resultados se muestran en la **Figura 12**.

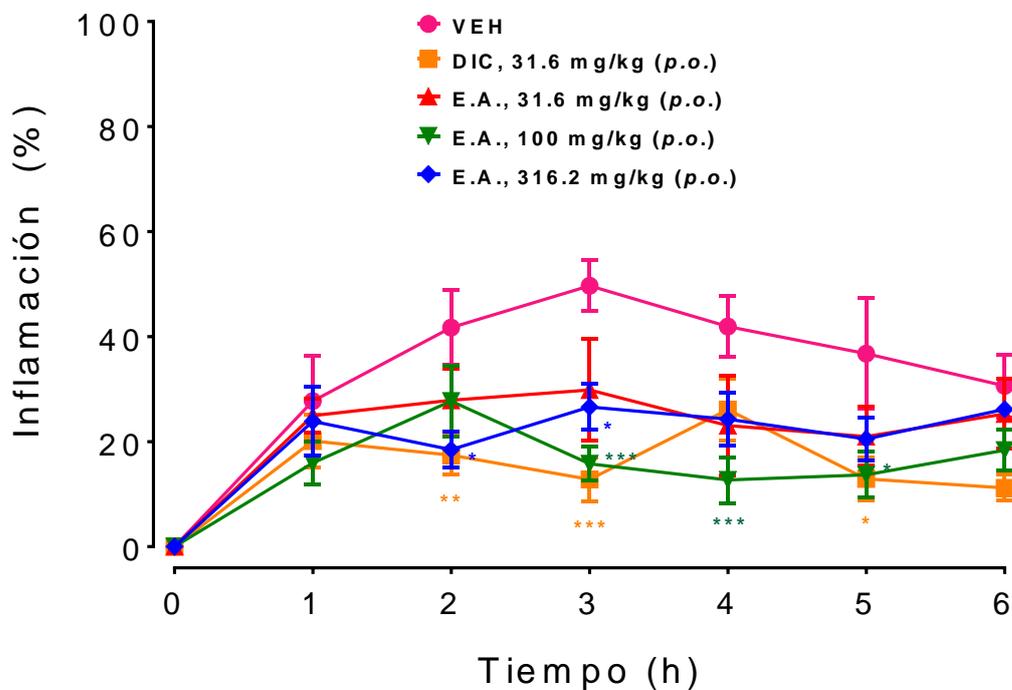


Figura 12. Efecto antiinflamatorio del extracto acuoso (E.A.) de *Z. grandiflora* (31.6 – 316.2 mg/kg) en el modelo del edema inducido por carragenina ratones. VEH: vehículo (Solución salina 0.9%). DIC: diclofenaco (31.6 mg/kg, p.o.). Cada medición representada como media \pm EEM con 6 ratones por grupo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, y *** $p < 0.001$ de significancia estadística respecto al control negativo (VEH) con ANADEVa de 2 vías seguido por test *post hoc* de Bonferroni.

La razón para la utilización de la carragenina como agente flogístico para la inducción del edema, es que esta posee varias ventajas sobre otro tipo de agentes inflamatorios, una de las más importantes es que se puede observar el efecto

antiinflamatorio de los agentes de prueba en una sola administración oral a dosis no tóxicas; además de que la variabilidad es relativamente baja utilizando esta sustancia (Winter, *et al.*, 1962).

Los resultados de este ensayo muestran que el extracto acuoso tiene un efecto antiinflamatorio que es más evidente a la dosis de 100 mg/kg, la cual muestra el porcentaje de inflamación menor a las 3 horas (15.77 ± 3.24 %) y 4 horas (12.69 ± 4.38 %) después de la administración la carragenina con una significancia estadística de $p < 0.001$ en comparación con VEH. Este método se ha convertido en uno de los más utilizados para estudiar la inflamación aguda. La carragenina, induce tanto la hipernocicepción como la formación del edema y evoca una respuesta inflamatoria y nociceptiva muy característica que está mediada por sustancias endógenas que estimulan nociceptores quimiosensitivos, los cuales desempeñan un papel más importante en el desarrollo del dolor inflamatorio (De Faveri Favero, *et al.*, 2014), principalmente la PGE2 y el NO, que están involucrados en la generación, persistencia y severidad del dolor (Kassim, *et al.*, 2010). Lo anterior respalda y complementa los resultados observados en la fase 2 del modelo de la formalina y, con base en ello, se sugiere que el efecto antinociceptivo del extracto acuoso de *Z. grandiflora* involucra tanto procesos neurogénicos como inflamatorios.

6.1.2.1. Fraccionamiento preliminar del extracto activo y evaluación biológica del extracto activo

Con el objetivo de encontrar los principios activos responsables de la actividad farmacológica del extracto acuoso de *Z. grandiflora*, se realizó el estudio fitoquímico evaluando las fracciones solubles en CH_2Cl_2 y AcOEt. Ambas fracciones fueron activas en el modelo de la formalina, siendo las dosis de 316.2 y 562.3 mg/kg las que presentaron un efecto mayor ($p < 0.0001$) respecto al grupo VEH, como se puede observar claramente en los gráficos de tiempo de lamida (s) contra tiempo de observación (min). (**Fig. 13 y 14**) y ABCtotal (**Fig. 15-B y 16-B**).

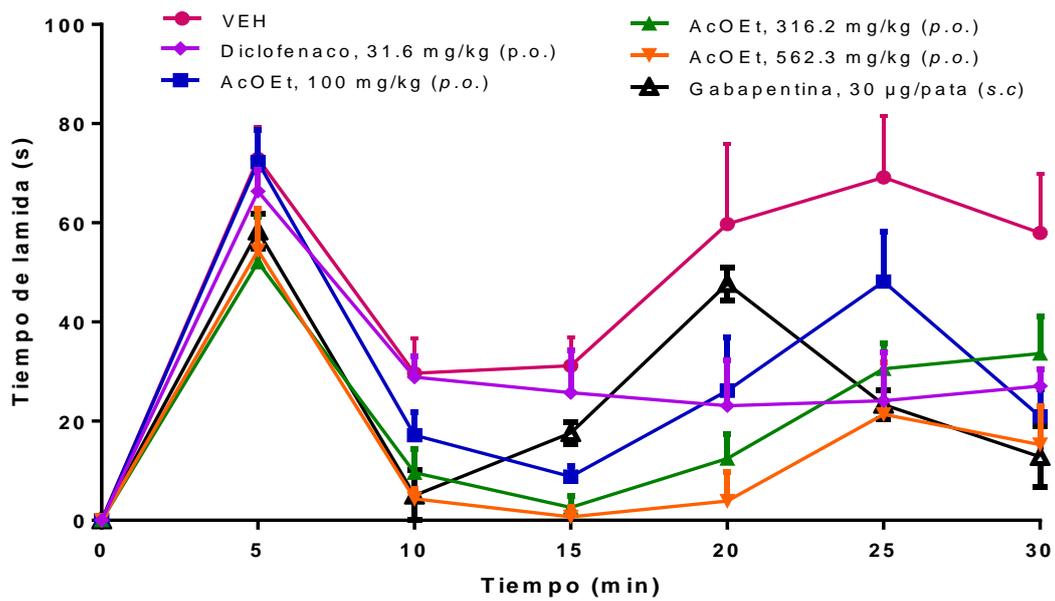


Figura 13. Curso temporal del efecto antinociceptivo de la fracción de AcOEt de la infusión de *Z. grandiflora* (100.0 – 562.3 mg/kg) en el modelo de la formalina en ratones. VEH: vehículo (Solución salina 0.9%). DIC: diclofenaco (31.6 mg/kg, *p.o.*). GBP: gabapentina (30 µg/pata, *s.c.*). Cada medición representada como media ± EEM con 6 ratones por grupo.

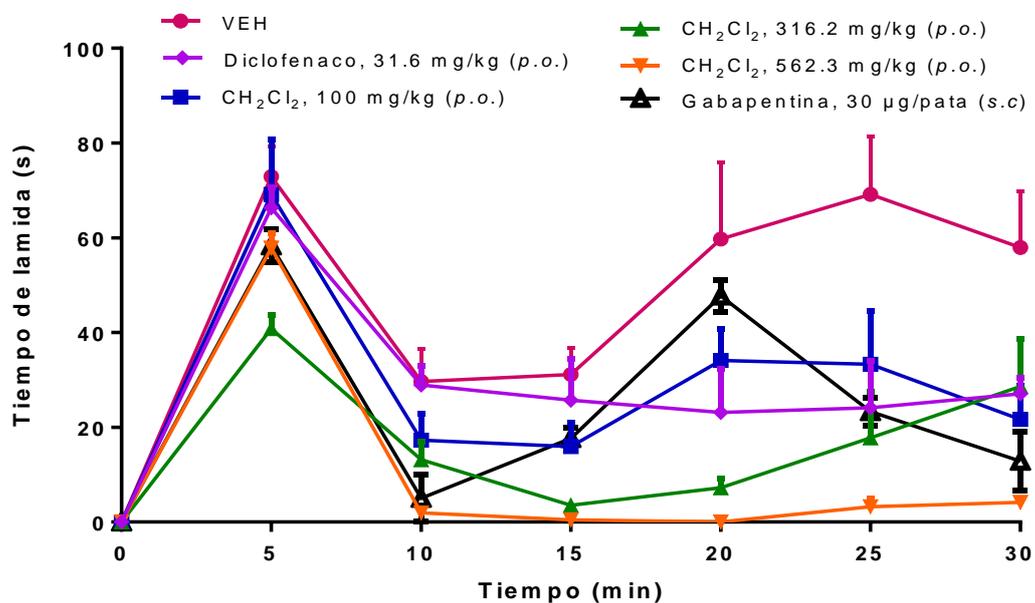


Figura 14. Curso temporal del efecto antinociceptivo de la fracción de CH₂Cl₂ de la infusión de *Z. grandiflora* (100.0 – 562.3 mg/kg) en el modelo de la formalina en ratones. VEH: vehículo (Solución salina 0.9%). DIC: diclofenaco (31.6 mg/kg, *p.o.*). GBP: gabapentina (30 µg/pata, *s.c.*). Cada medición representada como media ± EEM con 6 ratones por grupo.

En los gráficos de porcentaje de antinocicepción (**Fig. 15-A y 16-A**) se puede observar que el efecto máximo de ambas fracciones se observó a la dosis más alta con un porcentaje de efecto promedio de $65.6 \pm 9.6 \%$ para la fracción de AcOEt, y de $77.5 \pm 1.2 \%$, y con diferencias estadísticamente significativas respecto a los fármacos de referencia.

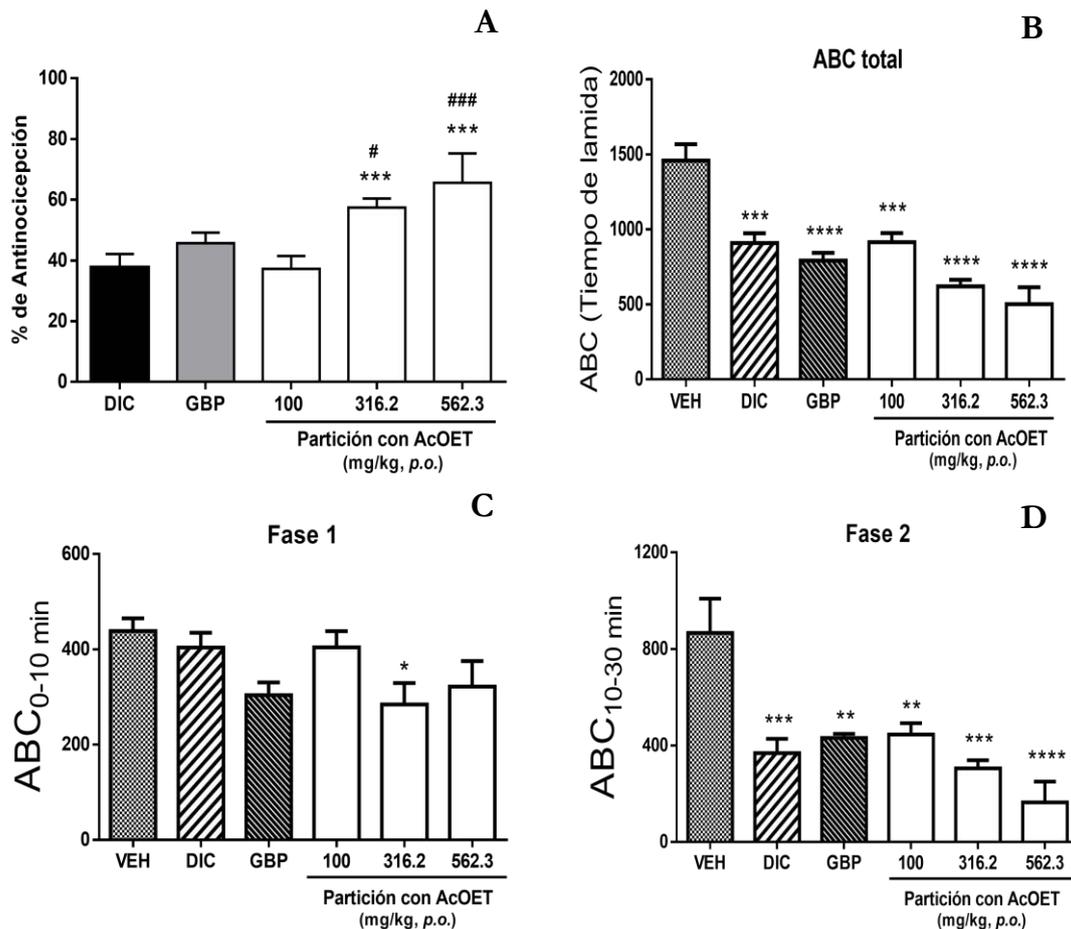


Figura 15. Efecto antinociceptivo de la fracción de AcOEt de la infusión de *Z. grandiflora* (100.0 – 562.3 mg/kg) en el modelo de la formalina en ratones. VEH: vehículo (Solución salina 0.9%). DIC: diclofenaco (31.6 mg/kg, p.o.). GBP: gabapentina (30 µg/pata, s.c.). (A) Porcentaje del efecto antinociceptivo (en relación al ABC de VEH), ANADEVA de 1 vía seguido por test *post hoc* de Tukey, * $p < 0.05$ comparado con DIC, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, y ### $p < 0.001$ comparado con GBP. (B) Gráfico de ABC_{total} (min x s) del tiempo de lamida. (C) Gráfico del ABC de la fase 1. (D) Gráfico de ABC de la fase 2. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, y *** $p < 0.001$ de significancia estadística respecto a VEH, con ANADEVA de 1 vía seguido por test *post hoc* de Dunnett. Cada medición representada como media \pm EEM con 6 ratones por grupo.

En el análisis por fases, se puede observar que ambas fracciones presentan actividad tanto en la fase neurogénica como en la fase inflamatoria [**Figura 15 y 16 (C-**

D)]; sin embargo, es evidente que ambas tienen un mayor efecto en esta última, y que ese efecto es dosis-dependiente, con un máximo a la dosis de 562.3 mg/kg. Así también, la fracción de CH₂Cl₂ fue la más activa de las dos. Cabe destacar que esta fracción aunque presenta una buena actividad en ambas fases, no existe una respuesta dosis dependiente en la fase 1, cuyo máximo se encuentra a la dosis de 316.2 mg/kg. En contraste, en la fase inflamatoria (fase 2), se observa una marcada tendencia dosis-respuesta.

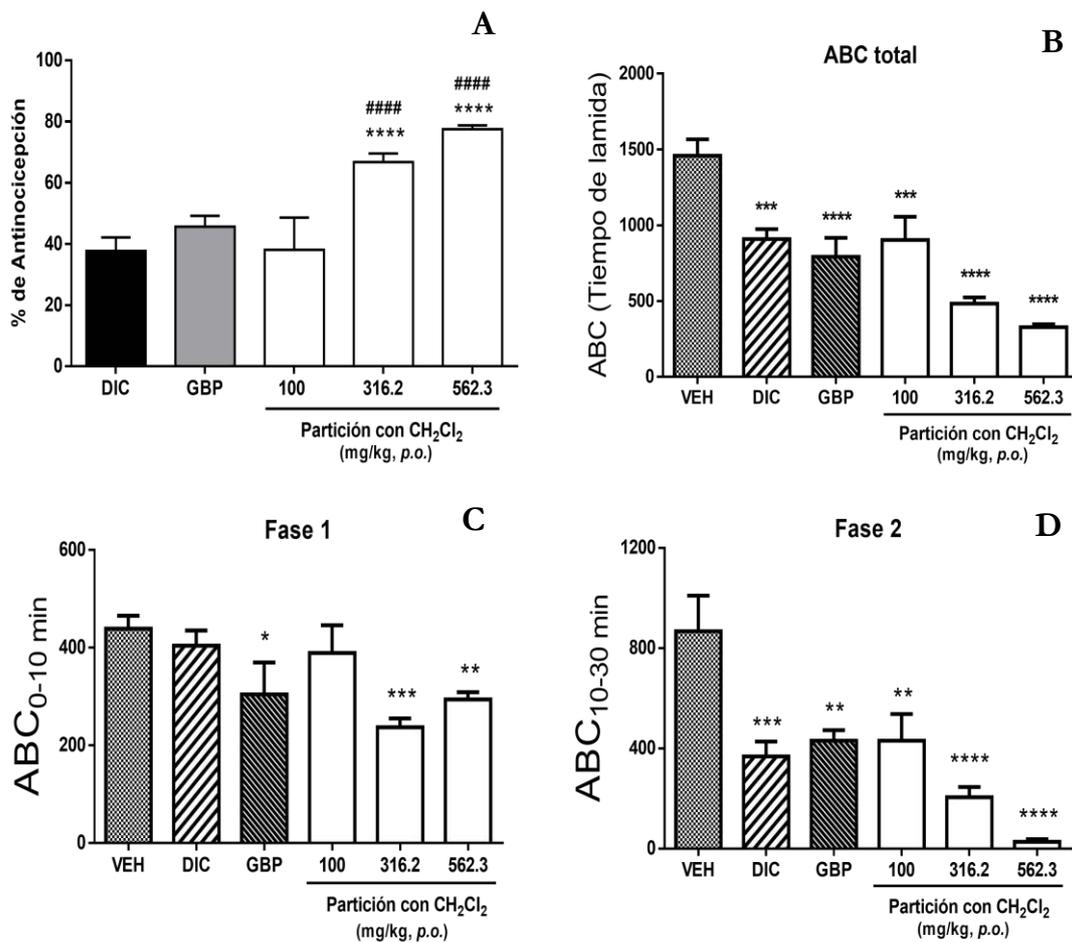


Figura 16. Efecto antinociceptivo de la fracción de CH₂Cl₂ de la infusión de *Z. grandiflora* (100.0 – 562.3 mg/kg) en el modelo de la formalina en ratones. VEH: vehículo (Solución salina 0.9%). DIC: diclofenaco (31.6 mg/kg, p.o.). GBP: gabapentina (30 µg/pata, s.c.). (A) Porcentaje del efecto antinociceptivo (en relación al ABC de VEH), ANADEVAs de 1 vía seguido por test *post hoc* de Tukey, *p < 0.05, **p < 0.01, y ***p < 0.001 comparado con DIC, #p < 0.05, ##p < 0.01, y ###p < 0.001 comparado con GBP. (B) Gráfico de ABC_{total} (min x s) del tiempo de lamida. (C) Gráfico del ABC de la fase 1. (D) Gráfico de ABC de la fase 2. *p < 0.05, **p < 0.01, y ***p < 0.001 de significancia estadística respecto a VEH, con ANADEVAs de 1 vía seguido por test *post hoc* de Dunnett. Cada medición representada como media ± EEM con 6 ratones por grupo.

6.1.3. Aislamiento de los principios mayoritarios de la fracción activa de CH_2Cl_2

Considerando que la fracción de CH_2Cl_2 fue la más activa, se inició con el estudio fitoquímico de la misma, utilizando fundamentalmente técnicas cromatográficas, tanto de columna abierta como de CLAE. Resultado de estos procesos fue el aislamiento de tres lactonas sesquiterpénicas novedosas que se caracterizaron por métodos espectroscópicos (RMN, IR, Rayos X) y espectrométricos (ESI-EM).

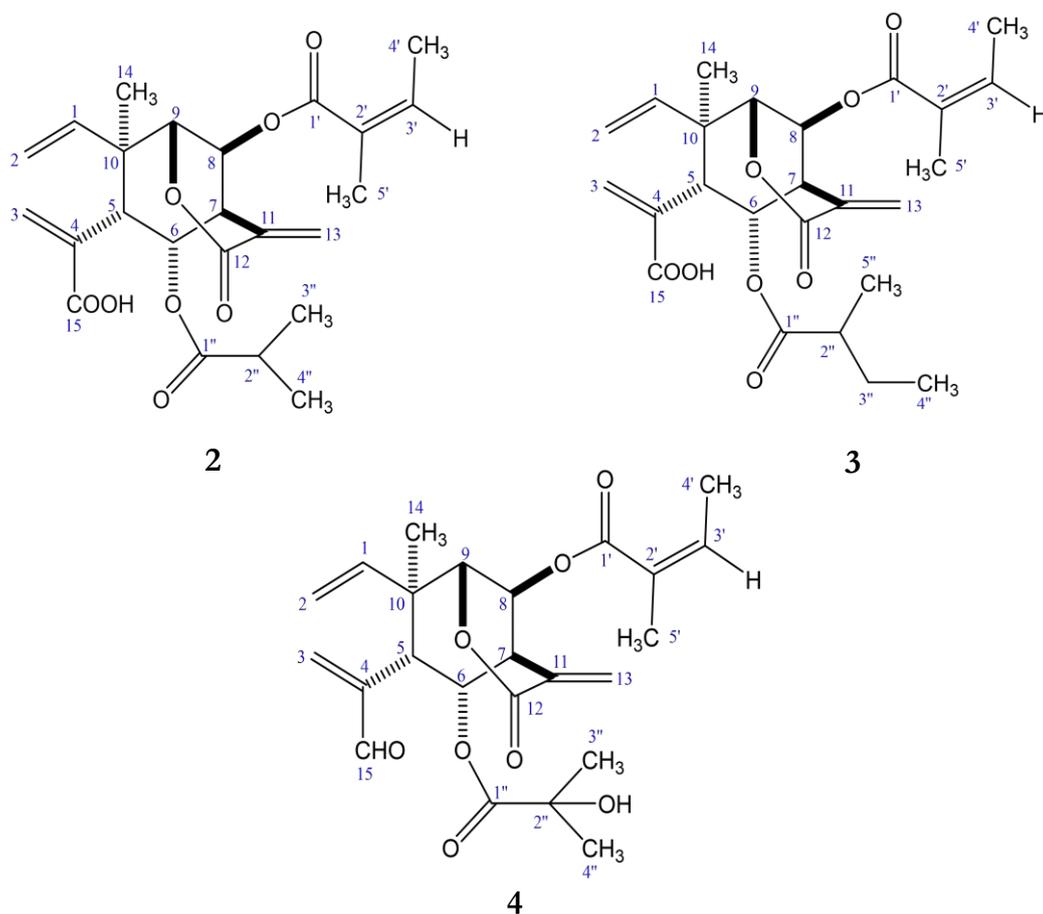


Figura 17. Metabolitos novedosos aislados de la fracción de CH_2Cl_2 de *Z. grandiflora*: zinagrandinólidas D-F (**2-4**)

Los productos **2-3** se obtuvieron como cristales blancos en forma de agujas, mientras que el producto **4** se obtuvo como un sólido vítreo. Sus fórmulas moleculares

se obtuvieron por espectrometría de masas de alta resolución tipo ESI en modo positivo. En los espectros correspondientes, los iones para las moléculas cationizadas $[M+H]^+$ se observaron en una m/z de 447.20216, 461.21852, 447.20330, respectivamente (**Anexo 2**). A partir de éstos, se establecieron las formulas moleculares $C_{24}H_{30}O_8$, $C_{25}H_{32}O_8$, $C_{24}H_{30}O_8$, respectivamente. Los espectros de baja resolución obtenidos por la misma técnica se ilustran en las **Figuras 15-17**. En los espectros en el IR se observan las bandas características de los grupos funcionales hidroxilo ($\sim 3237\text{ cm}^{-1}$), carbonilo de ácido ($\sim 1631\text{ cm}^{-1}$ en los casos de **2** y **3**) o aldehído insaturado ($\sim 1725\text{ cm}^{-1}$ en el caso de **4**), y carbonilo del éster de la δ -lactona ($\sim 1735\text{ cm}^{-1}$). Los máximos de absorción en UV de los productos **2-4** se observaron a 208.7, 206.5 y 222.8 nm, respectivamente (**Fig. 18**).

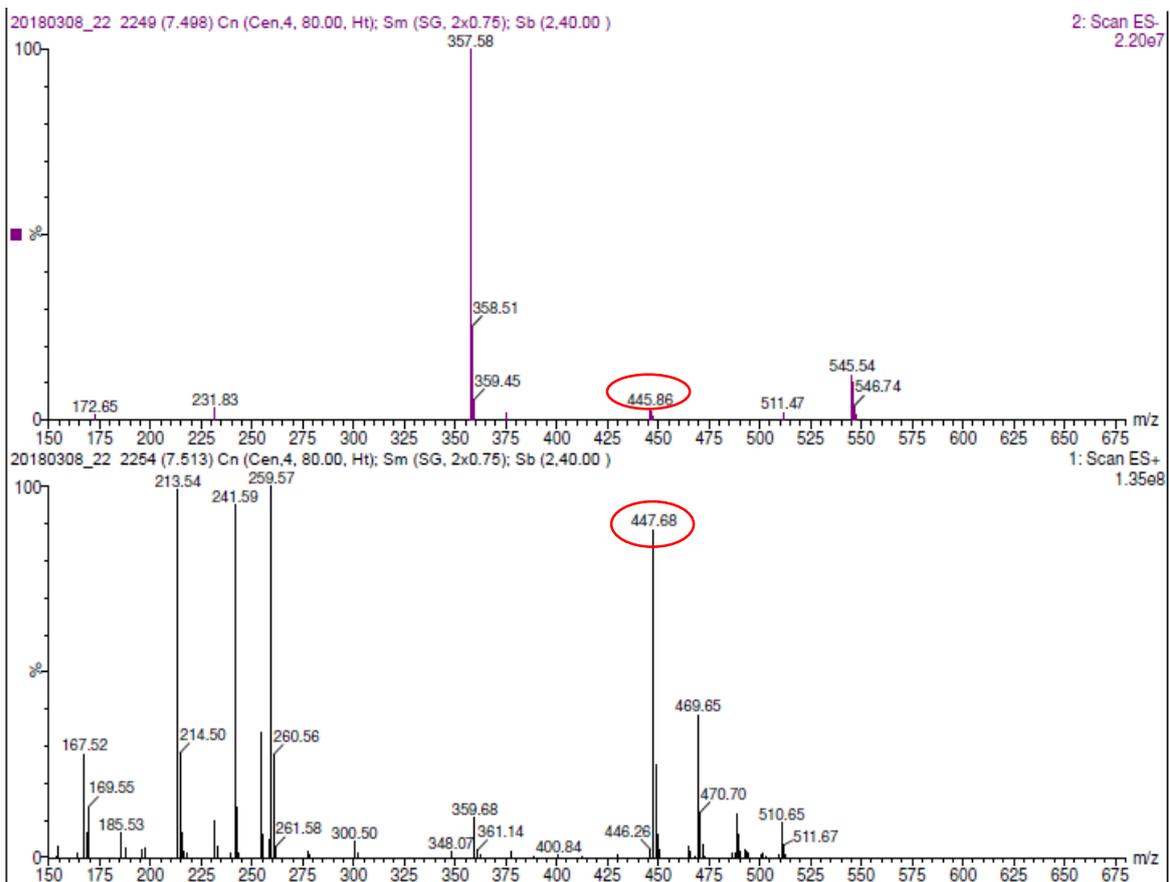


Figura 18. Espectro obtenido por CLUE-ESI-MS en el modo negativo (arriba) y positivo (abajo) de la Zinagrandinólida D

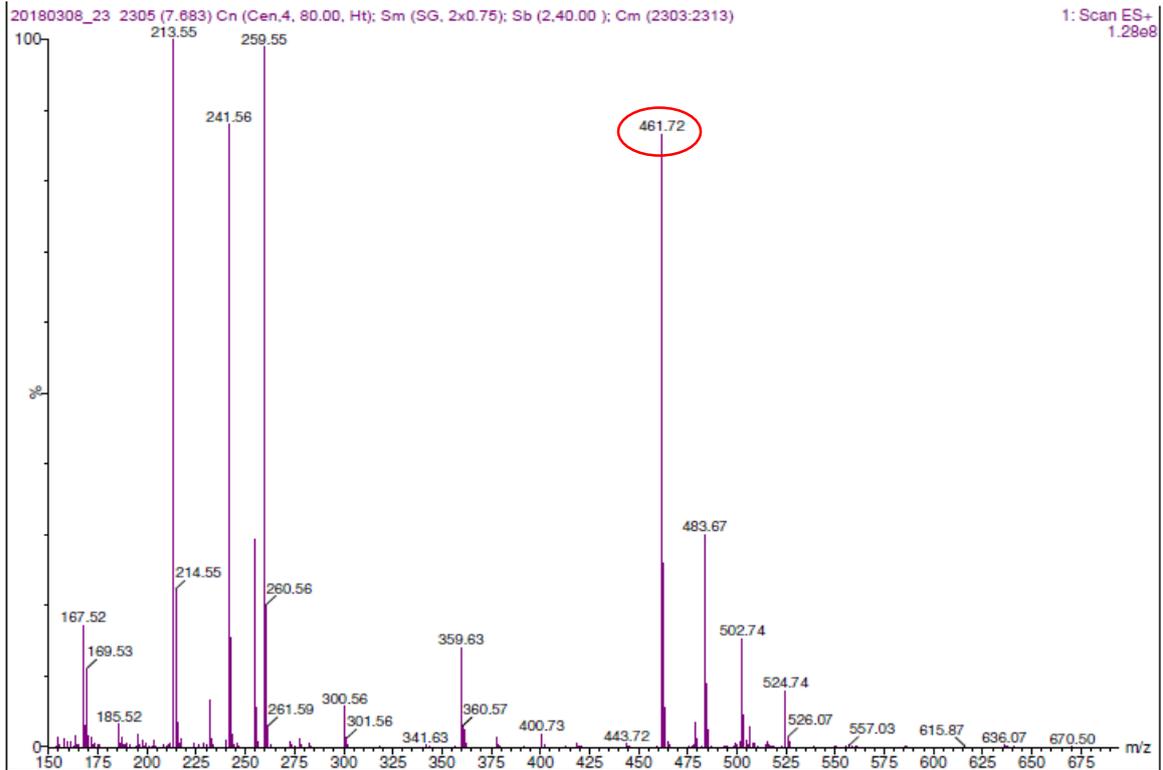


Figura 19. Espectro obtenido por CLUE-ESI-MS en el modo positivo de la Zinagrandinólida E

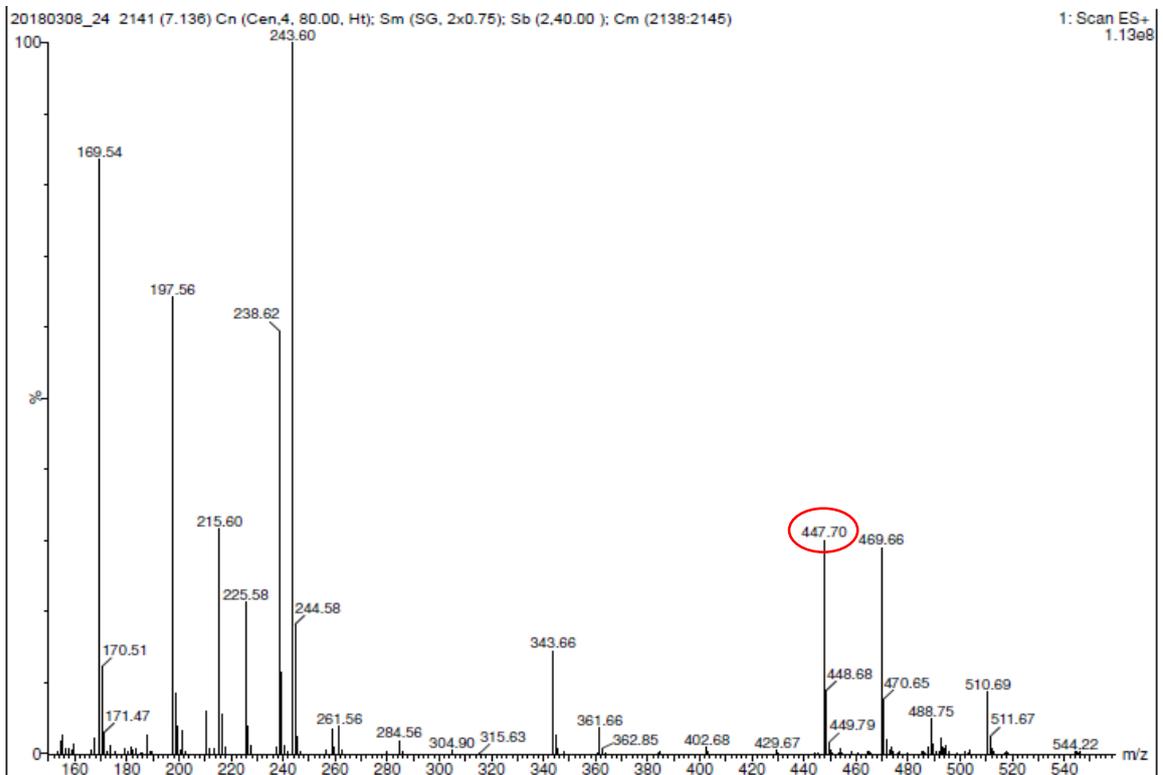


Figura 20. Espectro obtenido por CLUE-ESI-MS en el modo positivo de la Zinagrandinólida F

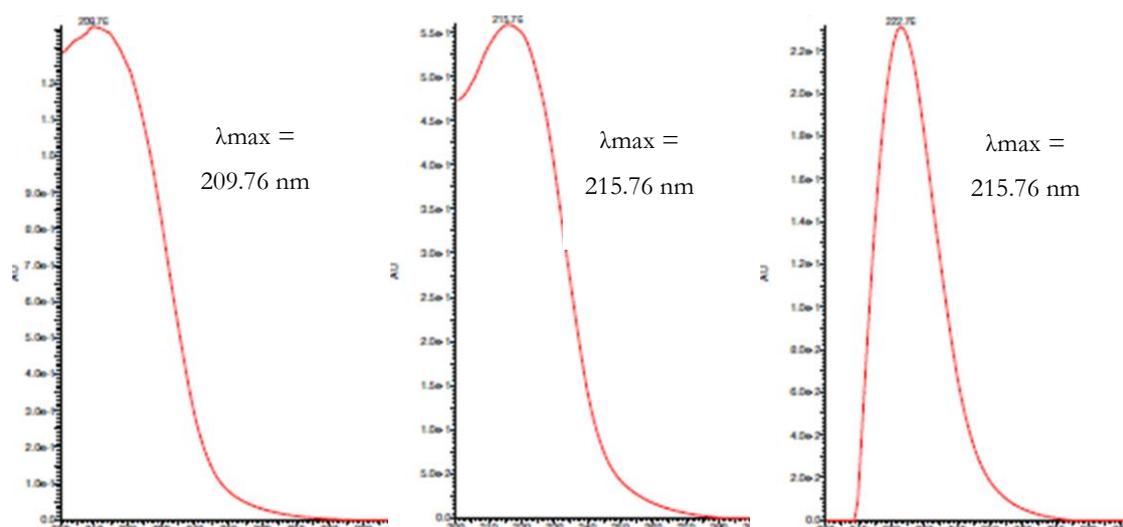


Figura 21. Perfiles de UV obtenidos por CLUE-PDA de las Zinagrandinólidas D-F

Los espectros de RMN de los productos **2-4** muestran gran similitud con los reportados por Bashyal y colaboradores (2006), para las zinagrandinólidas (A-C), una serie de δ -elemanólidas, en las cuales el grupo lactónico α , β -insaturado se encuentra unido a un anillo carbocíclico de seis miembros mediante C-7 y C-9. Por lo anterior, se propone que los compuestos aquí descritos se denominen con los nombres triviales de zinagrandinólidas D-F ya que corresponden a miembros de esta serie homóloga. La caracterización de estos productos se describe en los párrafos siguientes.

Zinagrandinólida D (2) La información proporcionada por los espectros de RMN ^1H (**Cuadro 5**) y los experimentos en dos dimensiones COSY (**Fig. 22**) y TOCSY (**Fig. 25**) permite distinguir cuatro sistemas de espín independientes. El primero se trata de un sistema ABX constituido por tres dobles de dobles en δ 6.01 ($J = 17.4, 11.0$ Hz), 5.12 ($J = 10.8, 0.8$ Hz) y 5.04 ($J = 16.8, 0.8$ Hz). El segundo sistema de espín es más complejo y contiene cinco protones que de acuerdo a sus desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento se refieren a un residuo de tipo -CHCH(O)CHCH(O)CH(O)-, y corresponden a los protones en las posiciones 5-9 del anillo de seis miembros del núcleo de la lactona δ -elemanólida. El tercero corresponde a un sistema de espín ABX₃ que se conforma por un quintuplete en δ 1.82 ($J = 1.6$ Hz), un cuarteto cuarteteado en δ 6.16 ($J = 7.2, 1.6$ Hz) y un doblete cuarteteado en δ 1.93

($J = 7.2, 1.6$ Hz) y que es indicativo de un residuo del ácido angélico que esterifica a una función carbonílica del núcleo base (Joseph-Nathan, *et al.*, 1984). Por último, se encuentra un sistema de espín tipo AB₂ constituido por un septuplete en δ 2.66 ($J = 7.0$) y dos dobletes en δ 1.29 ($J = 6.8$) y δ 1.25 ($J = 6.8$) que identifica a una unidad de tipo isobutirato. El espectro de RMN de ¹³C analizado con ayuda del experimento HSQC (**Fig. 26**) muestra la presencia de cinco metilos, tres metilenos olefínicos, ocho metinos (tres sobre carbonos oxigenados y dos sobre dobles enlaces) y siete carbonos cuaternarios (tres carbonilos de éster y tres de carbonos olefínicos) y corroboró los residuos detectados en el espectro de RMN ¹H.

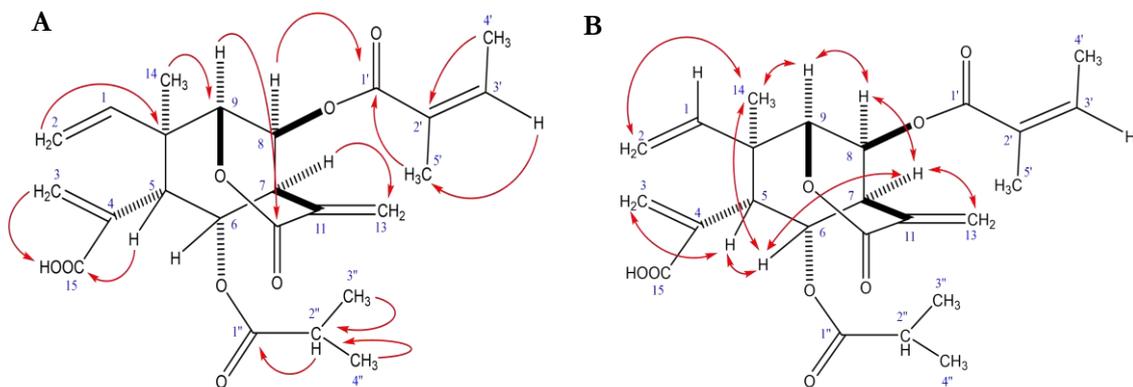


Figura 22. Principales correlaciones observadas en el experimento de A) HMBC y B) NOESY para la Zinagrandinólida D.

Las correlaciones observadas en el espectro de HMBC (**Fig. 19-A y 27**) permitieron la elucidación de la estructura propuesta para el compuesto (**2**). Así, la correlación de H-2 (δ_H 5.12, 5.04) \rightarrow C-1 (δ_C 141.0) permitió establecer que el sistema de espín ABX antes descrito se encuentra unido al anillo de seis miembros de la δ -lactona; H-3 (δ_H 6.60, 6.05) \rightarrow C-4 (δ_C 135.6), otro de los metilenos olefínicos, corresponde a la insaturación α,β del ácido carboxílico (C-15, δ_C 171.0); mientras que el tercer metileno olefínico, H-13 (δ_H 6.76, 5.87) \rightarrow C-11 (δ_C 132.1) corresponde a la insaturación α,β propia de la δ -lactona. Este experimento también permitió establecer las uniones sobre el anillo de seis miembros de la δ -elementólida de un metilo (C-14, δ_C 17.7), el residuo de angelato y el anillo hexacíclico que contiene a la lactona, a partir de las correlaciones H-14 (δ 1.47) \rightarrow C-10 (δ_C 45.4), H-8 (δ 5.59) \rightarrow C-1' (δ_C 166.7) y H-9

(δ 4.41) \rightarrow C-12 (δ c 163.0), respectivamente. La conformación de la estructura molecular se realizó a partir de las correlaciones observadas en los espectros NOESY (**Fig. 19-B y 23**) y ROESY (**Fig. 24**). Un análisis por difracción de rayos X de los cristales permitió confirmar inequívocamente la estructura de este compuesto, cuya vista tridimensional se muestra en la **figura 29**. Los datos cristalográficos de la zinagrandinólida D se presentan en el **Anexo 1**.

Cuadro 5. Datos de RMN de ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) en CDCl_3 de la Zinagrandinólida D			
Posición	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	Tipo de C
1	6.01 dd (11.0, 17.4)	141.0	CH
2a	5.12 dd (0.8, 10.8)	115.6	CH ₂
2b	5.04 dd (0.8, 16.8)		
3a	6.60 d (0.8)	132.0	CH ₂
3b	6.05 d (0.8)		
4		135.6	C
5	3.43 d (3.2)	35.0	CH
6	5.06 dd (3.2)	76.6	CH
7	3.34 ddd (0.8, 3.0, 7.0)	43.4	CH
8	5.59 dd (2.0, 3.6)	64.4	CH
9	4.41 t (2.4)	85.0	CH
10		45.4	C
11		132.1	C
12		163.0	C
13a	6.76 s	133.5	CH ₂
13b	5.87 s		
14	1.47 s	17.7	CH ₃
15		171.0	C
1'		166.7	C
2'		127.0	C
3'	6.16 cc (1.6, 7.2)	140.8	CH
4'	1.93 dc (1.6, 7.2)	16.1	CH
5'	1.82 q (1.6)	20.5	CH
1''		176.0	C
2''	2.66 sep (7.0)	34.5	CH
3''	1.29 d (6.8)	18.9	CH ₃
4''	1.25 d (6.8)	19.3	CH ₃

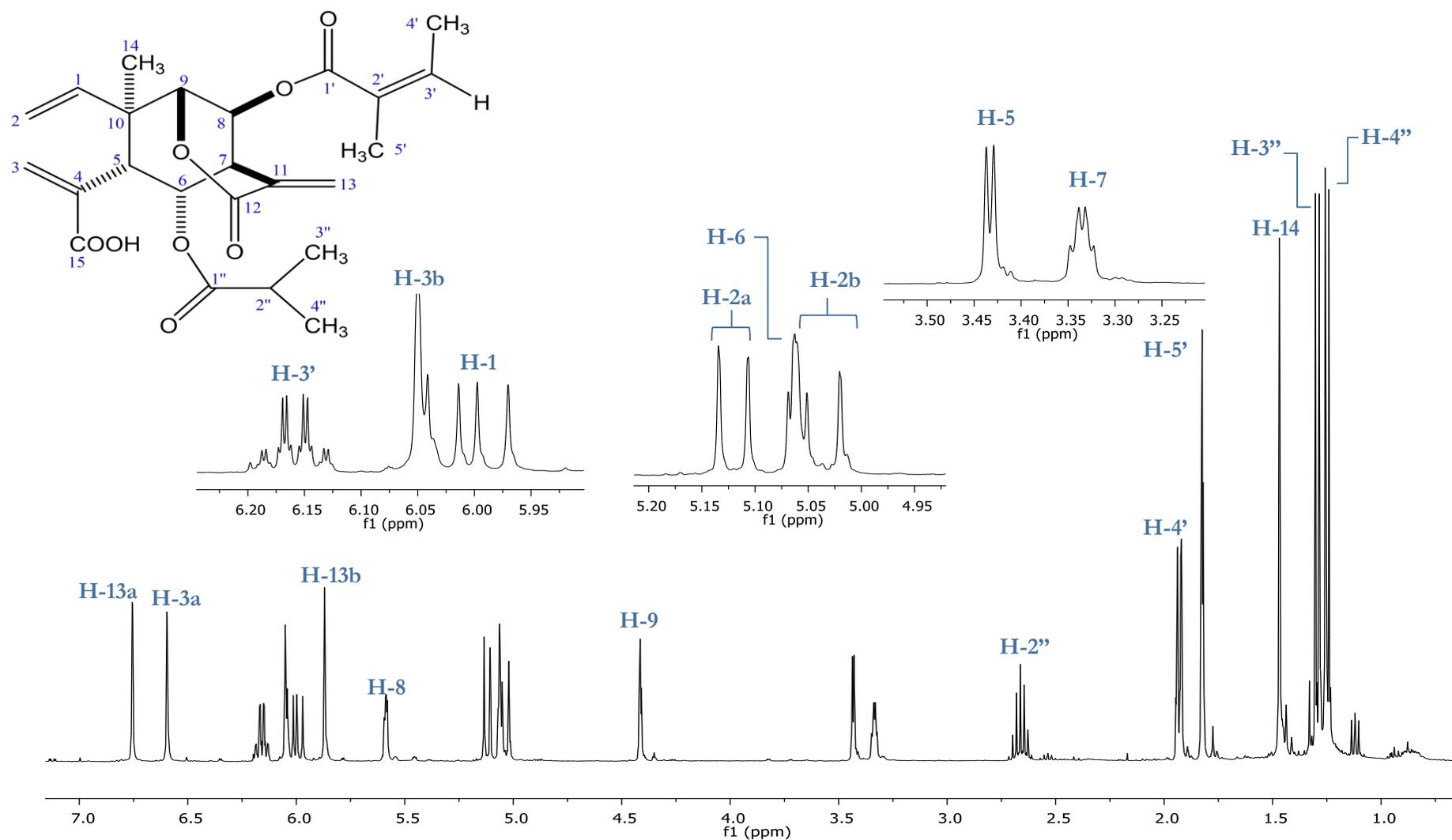


Figura 23. Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CD₃Cl₃) de la Zinagrandinólida D.

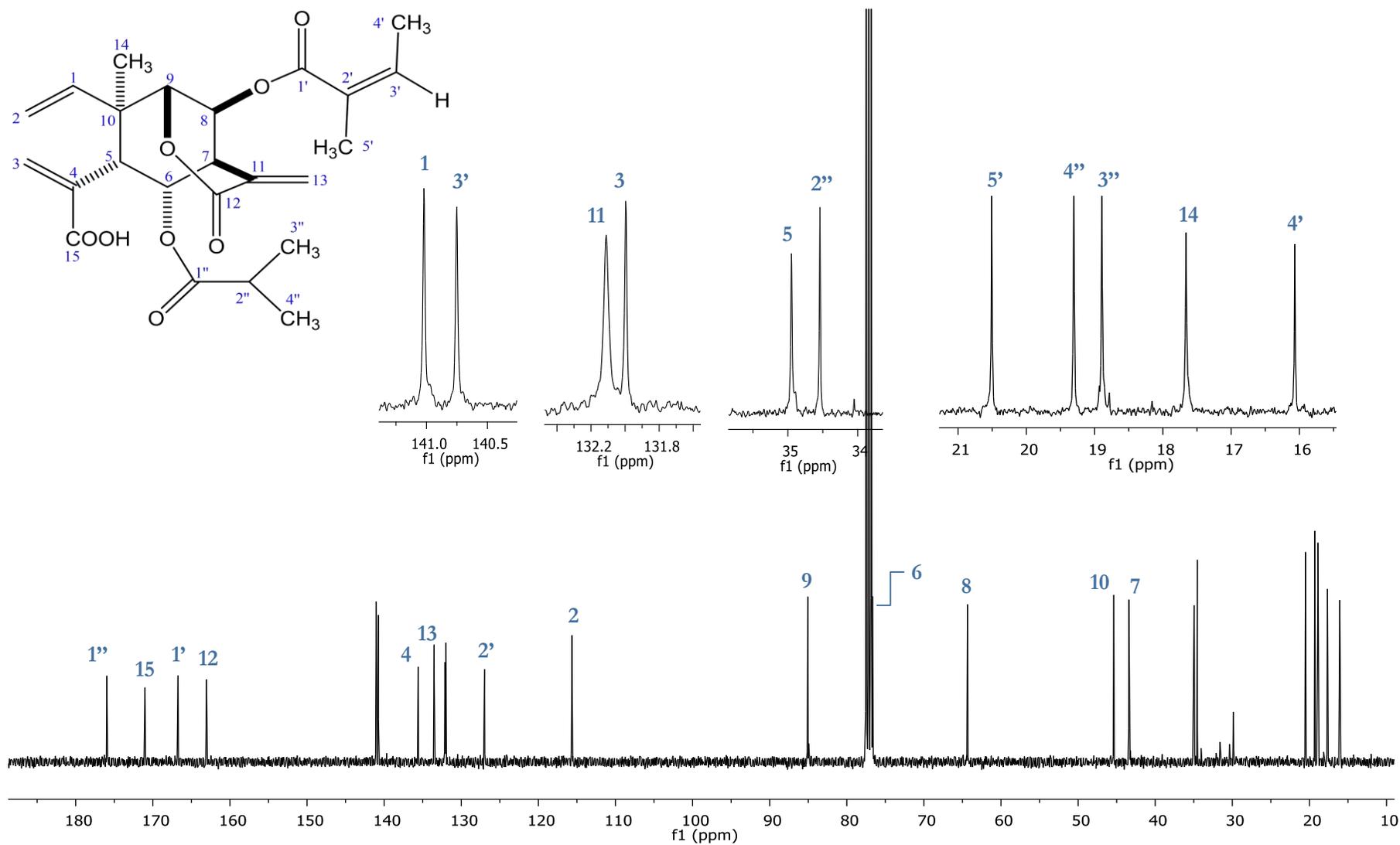


Figura 24. Espectro de ^{13}C -RMN (100 MHz, CD_3Cl_3) de la Zinagrandinólida D.

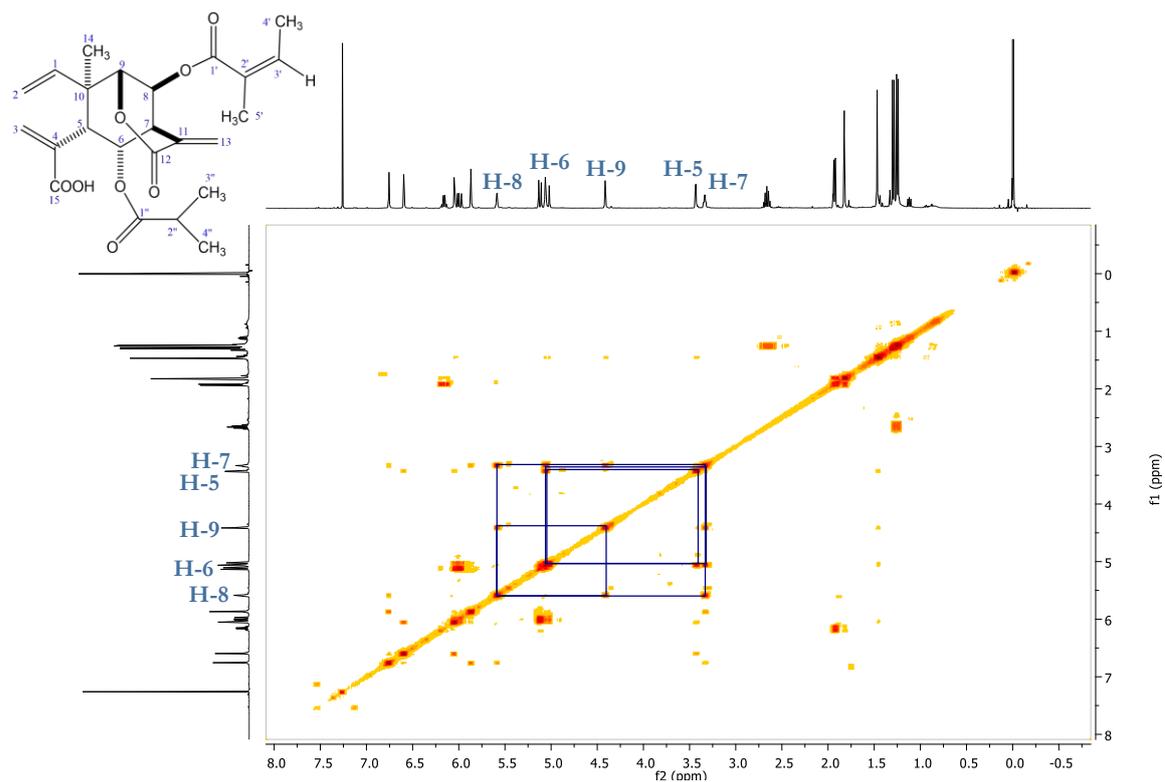


Figura 25. Correlaciones selectas en el espectro bidimensional COSY de Zinagrandinólida D

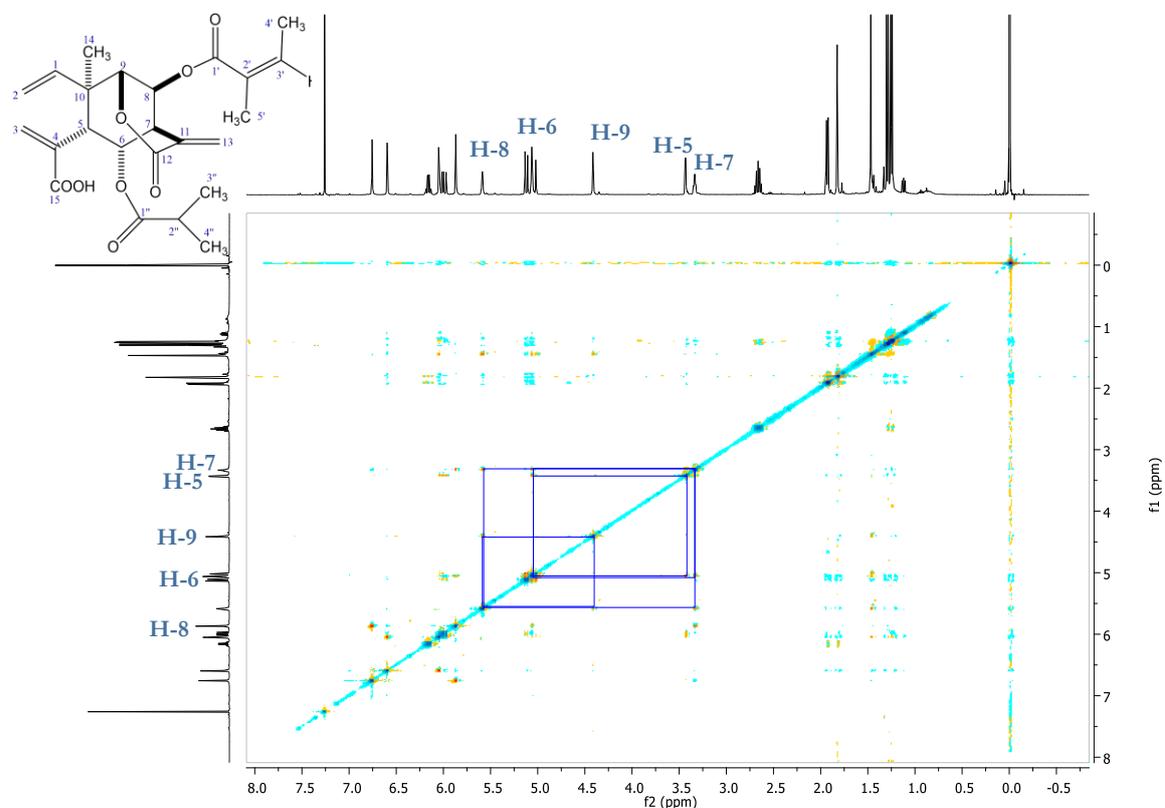


Figura 26. Correlaciones selectas en el espectro bidimensional NOESY de Zinagrandinólida D

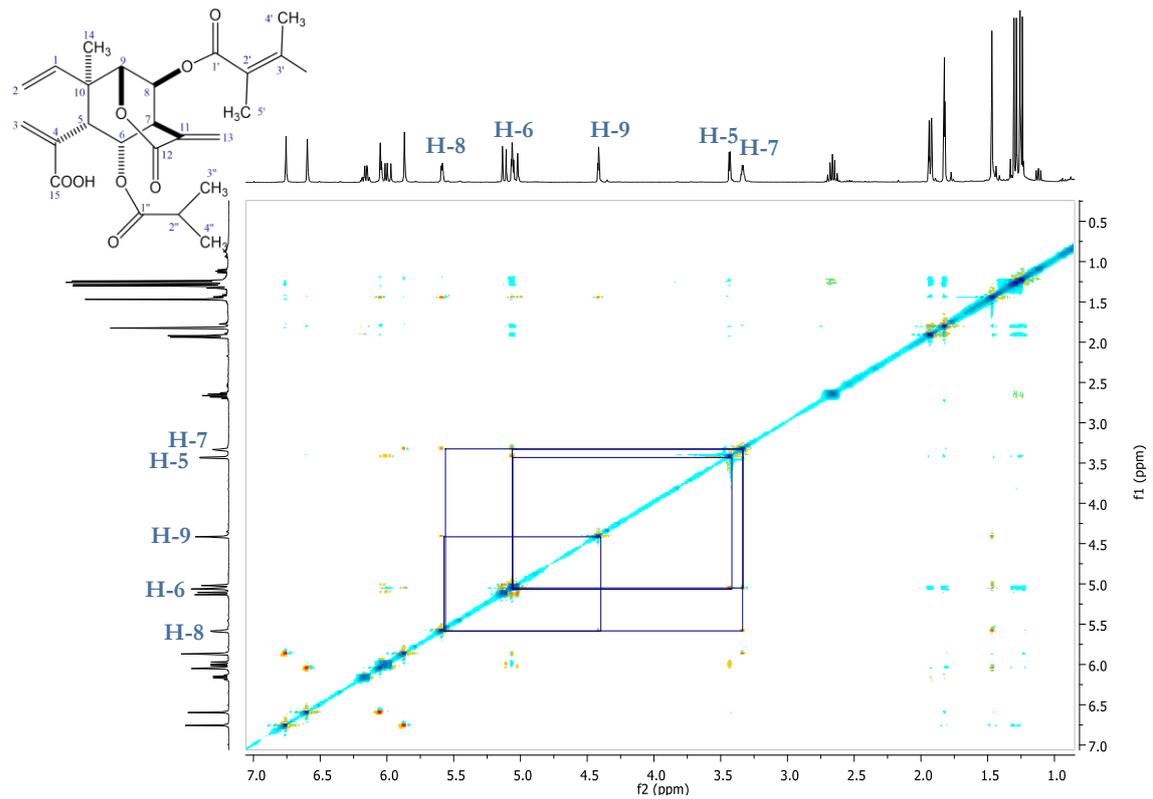


Figura 27. Correlaciones selectas en el espectro bidimensional ROESY de Zinagrandinólida D

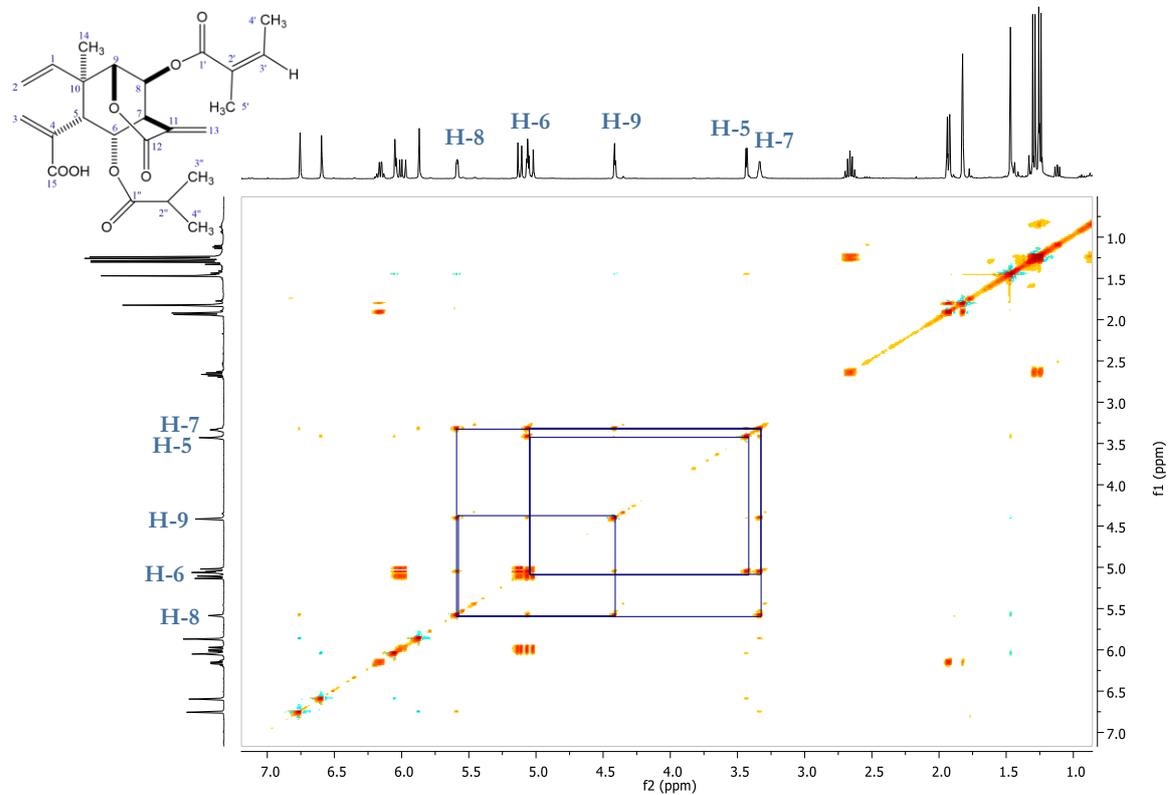


Figura 28. Correlaciones selectas en el espectro bidimensional TOCSY de Zinagrandinólida D

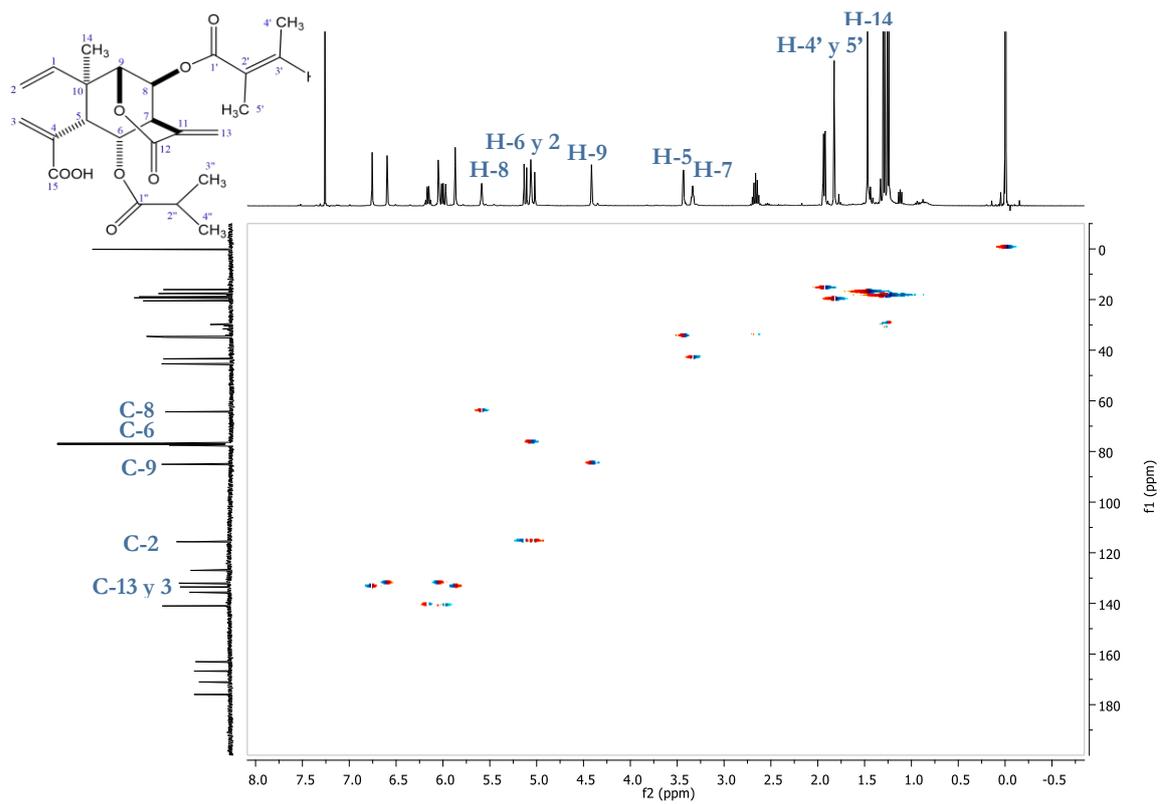


Figura 29. Correlaciones selectas en el espectro bidimensional HSQC de Zinagrandinólida D

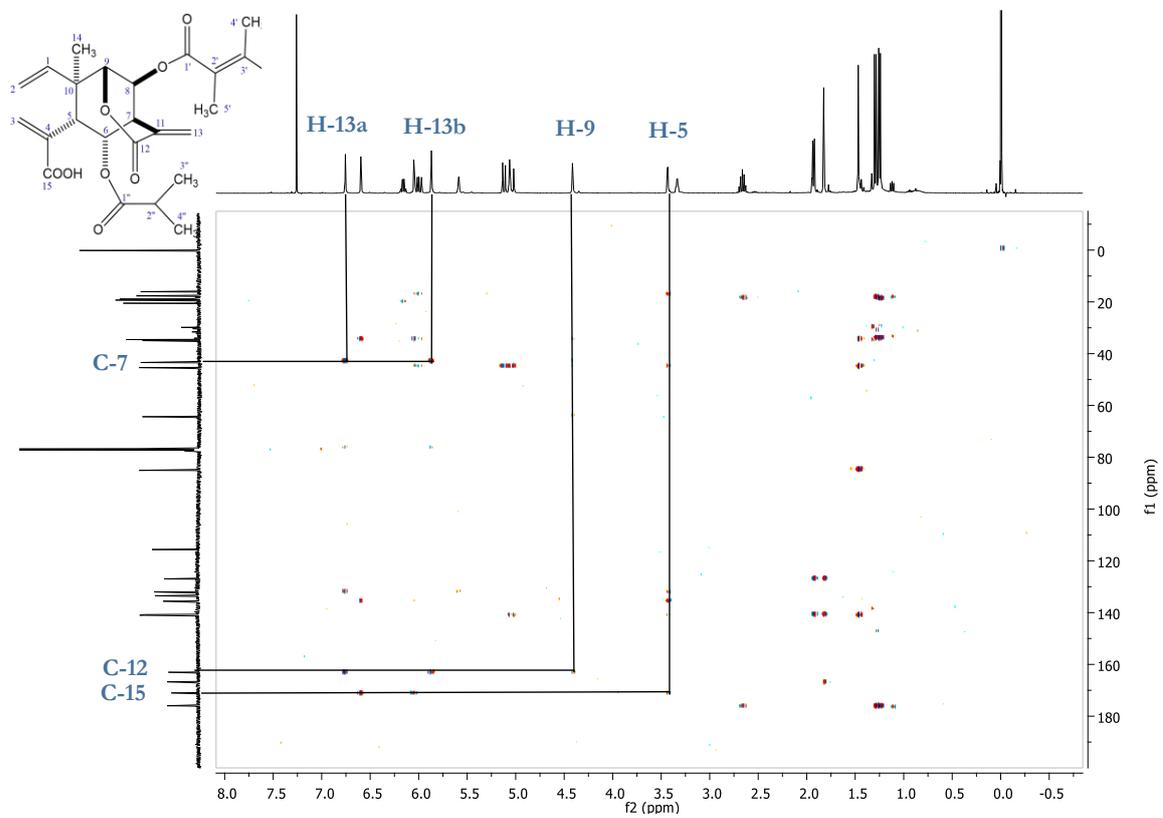


Figura 30. Correlaciones selectas en el espectro bidimensional HMBC de Zinagrandinólida D

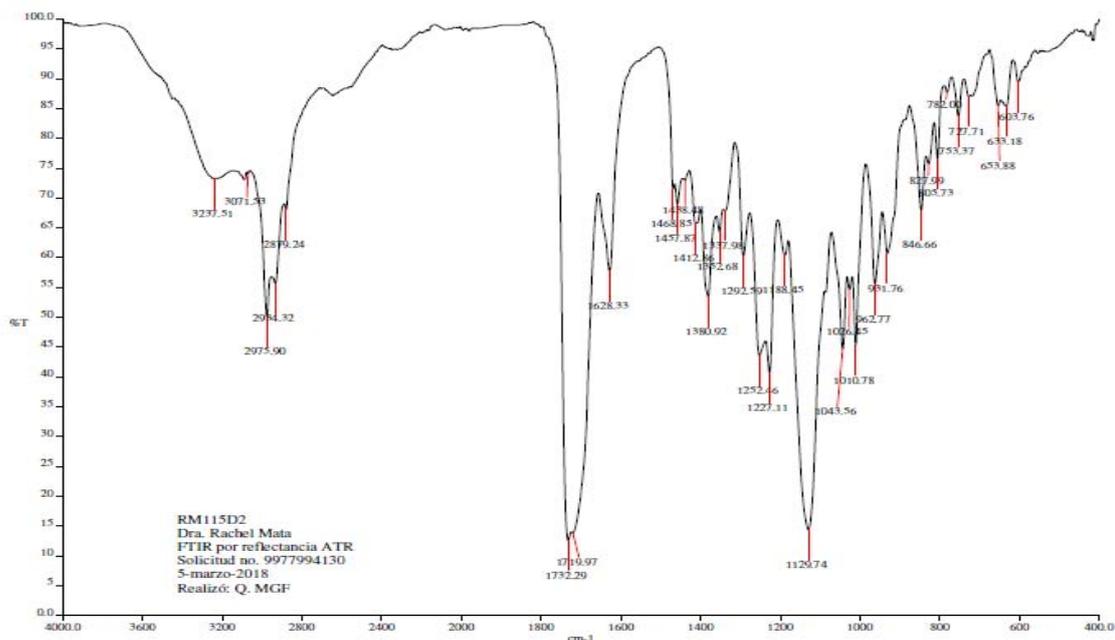


Figura 31. Espectro de FTIR por reflectancia ATR de Zinagrandinólida D

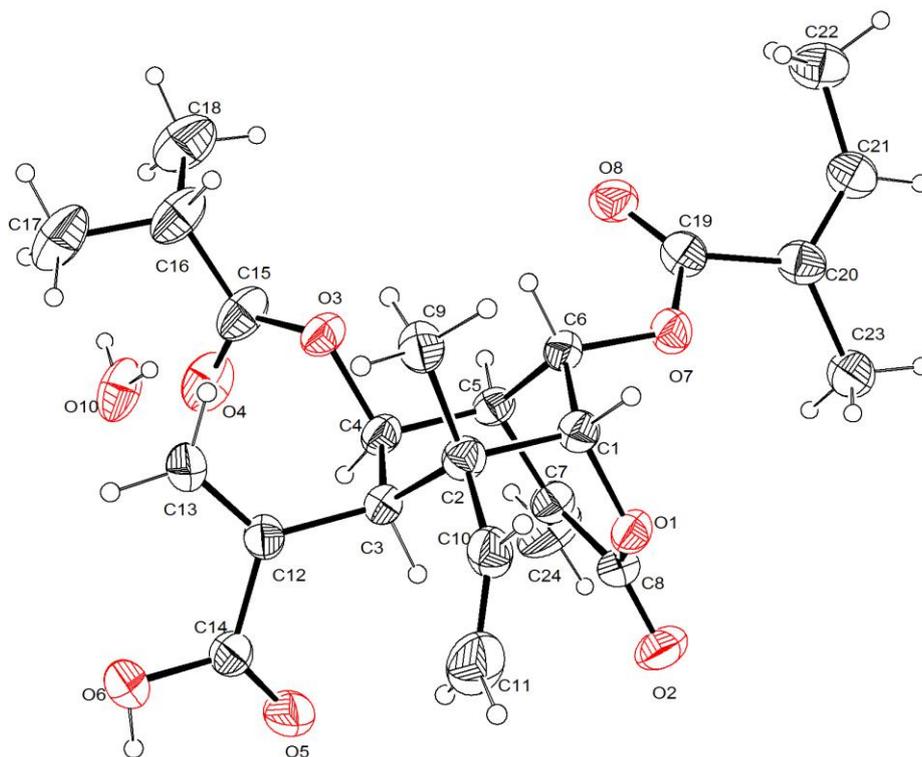


Figura 32. Estructura tridimensional de la zinagrandinólida D (2) resuelta por difracción de rayos X.

Zinagrandinólida E (3) La información obtenida al comparar los espectros de RMN ^1H y ^{13}C de **3** con los del compuesto **2** sugiere que ambos son iguales con excepción del residuo de ácido que esterifica al alcohol secundario de la posición C-6, que en este caso se identificó como el ácido 2-metil-butírico. En los experimentos de COSY y TOCSY (**Figuras 33 y 35**), este residuo se observa como un sistema de espín independiente que se compone por cinco tipos de protones: la señal de H-2'' se aprecia como un sextuplete en δ 2.46 ($J = 7.0$ Hz); el metileno C-3'' se observa como un sextuplete en δ 1.76 ($J = 7.6$) y un doble de doble de dobles en δ 1.53 ($J = 14.0, 7.5, 6.5$ Hz); el metilo terminal de esta unidad se distingue claramente en δ 0.93 ($J=7.6$ Hz) como un triplete cuya señal integra para tres protones; finalmente, la señal de H-5'', que integra también para tres protones, se distingue como un doblete en δ 1.27 ($J=7.2$ Hz). La estructura del sustituyente propuesto se corroboró con las correlaciones observadas en el espectro de HMBC que se pueden observar en las **Figuras 30-A y 37**.

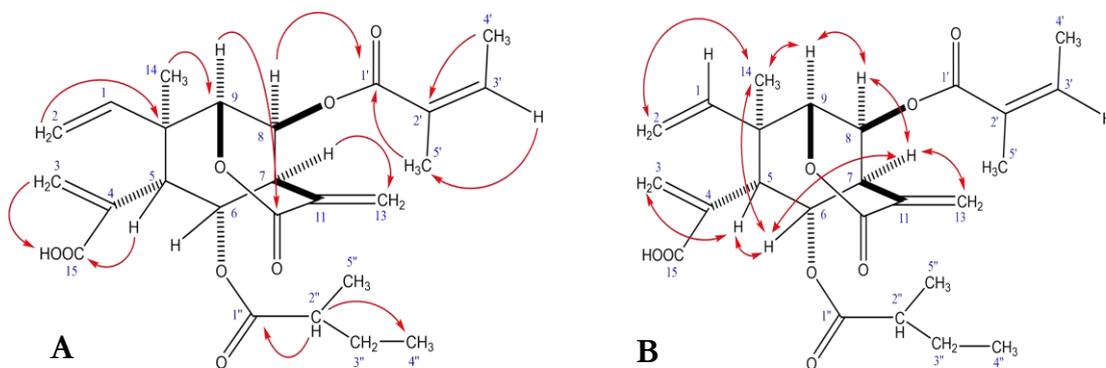


Figura 33. Principales correlaciones observadas en el experimento de A) HMBC y B) NOESY para la Zinagrandinólida E.

Cuadro 6. Datos de RMN de ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) en CDCl_3 de la Zinagrandinólida E			
Posición	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	Tipo de C
1	5.99 dd (11.0, 17.4)	141.0	CH
2a	5.11 d (11.2)	115.6	CH ₂
2b	5.03 d (17.2)		
3a	6.59 s	131.9	CH ₂
3b	6.04 s		
4		135.7	C
5	3.43 d (3.0)	34.8	CH
6	5.06 dd (3.2)	76.6	CH
7	3.33 dd (3.2, 6.4)	43.4	CH
8	5.58 dd (2.0, 3.6)	64.3	CH
9	4.41 t (2.2)	85.1	CH
10		45.3	C
11		132.2	C
12		163.1	C
13a	6.75 s	133.6	CH ₂
13b	5.87 s		
14	1.46 s	17.6	CH ₃
15		171.8	C
1'		166.7	C
2'		127.0	C
3'	6.15 cc (1.6, 7.2)	140.7	CH
4'	1.92 dc (1.6, 7.2)	16.1	CH
5'	1.82 q (1.6)	20.5	CH
1''		175.7	C
2''	2.46 sex (7.0)	41.8	CH
3''a	1.76 sex (7.6)	26.6	CH ₂
3''b	1.53 ddd (6.5, 7.5, 14.0)		
4''	0.93 t (7.6)	11.9	CH ₃
5''	1.27 d (7.2)	17.1	CH ₃

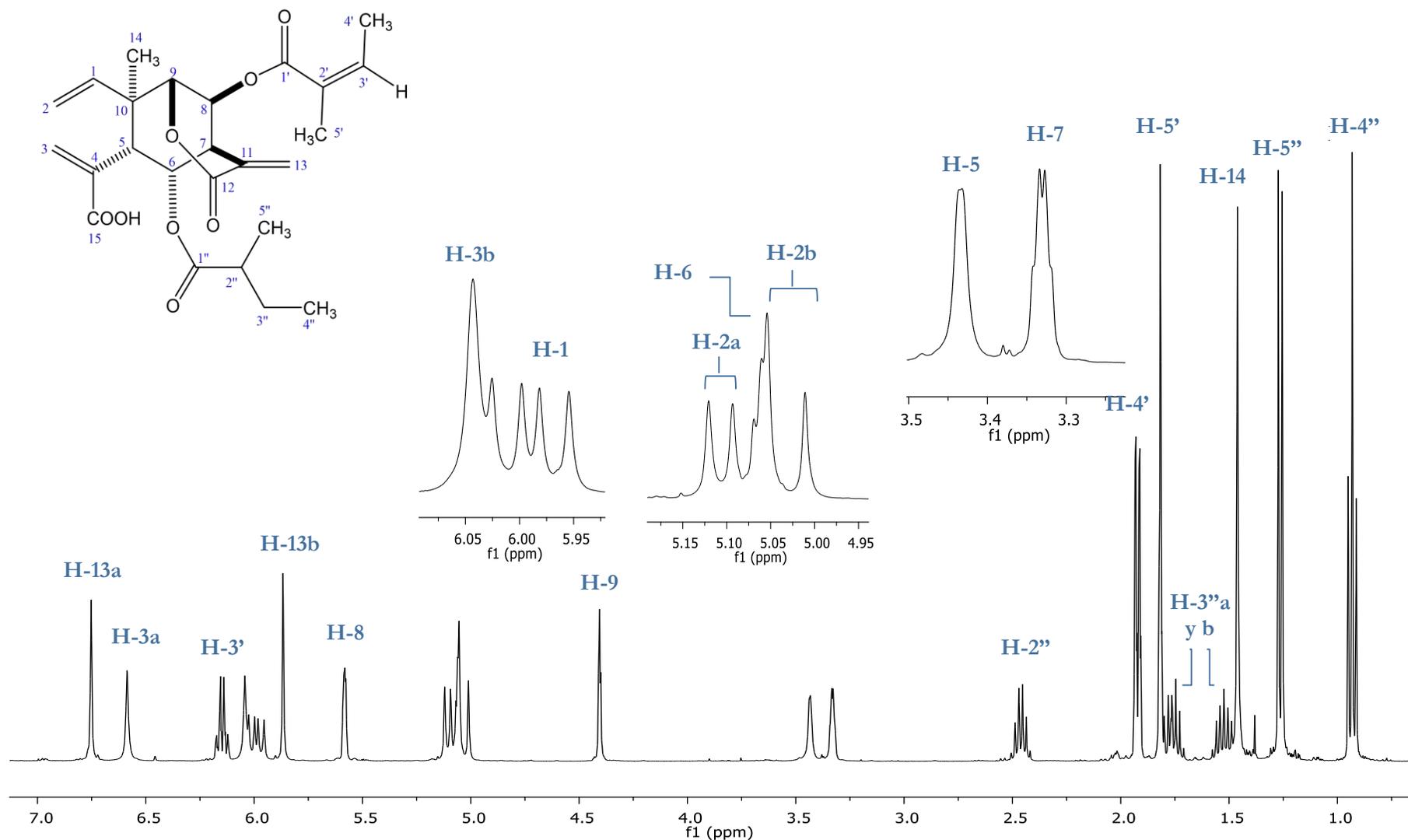


Figura 34. Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, CD₃Cl₃) de la Zinagrandinólida E.

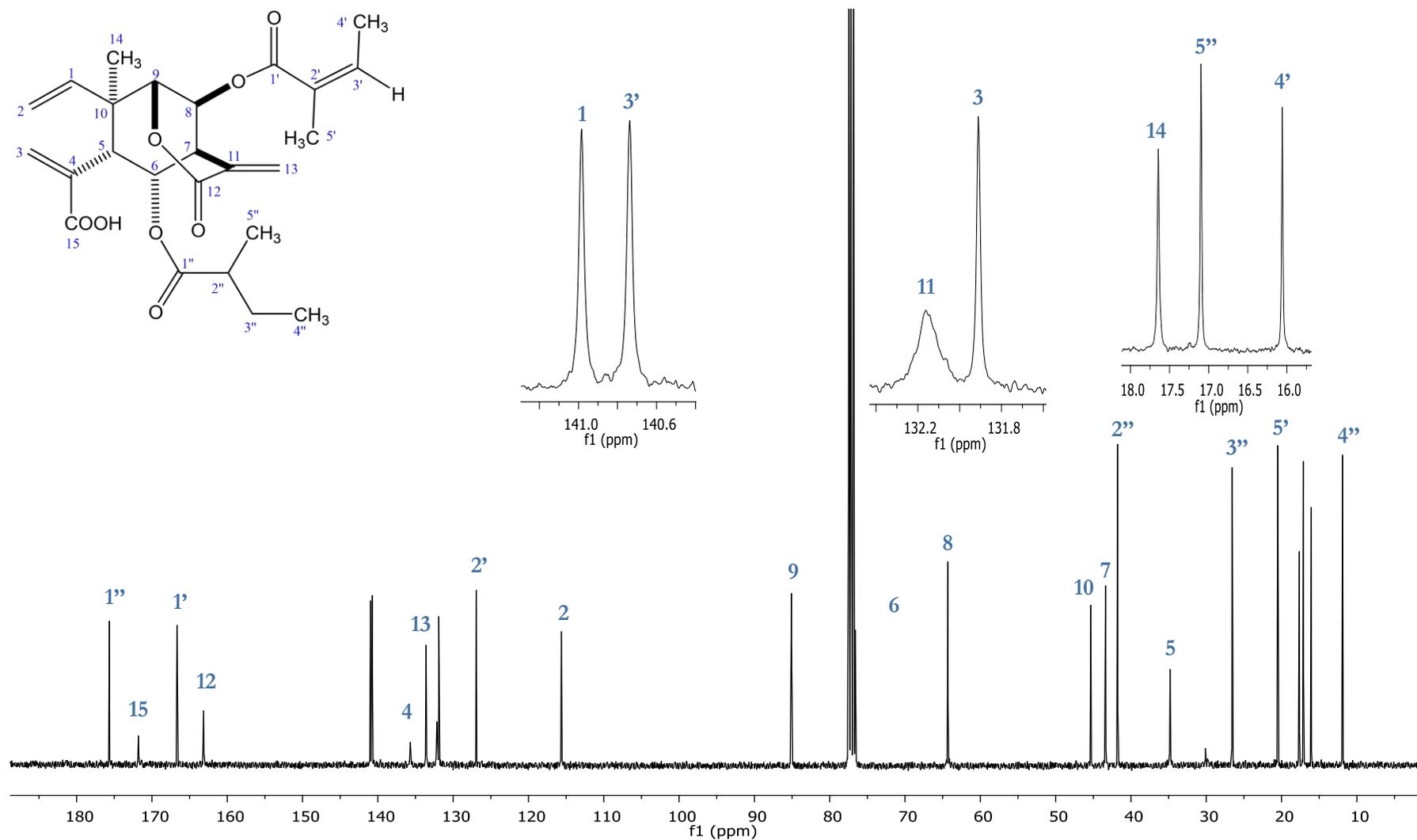


Figura 35. Espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, CD₃Cl₃) de la Zinagrandinólida E.

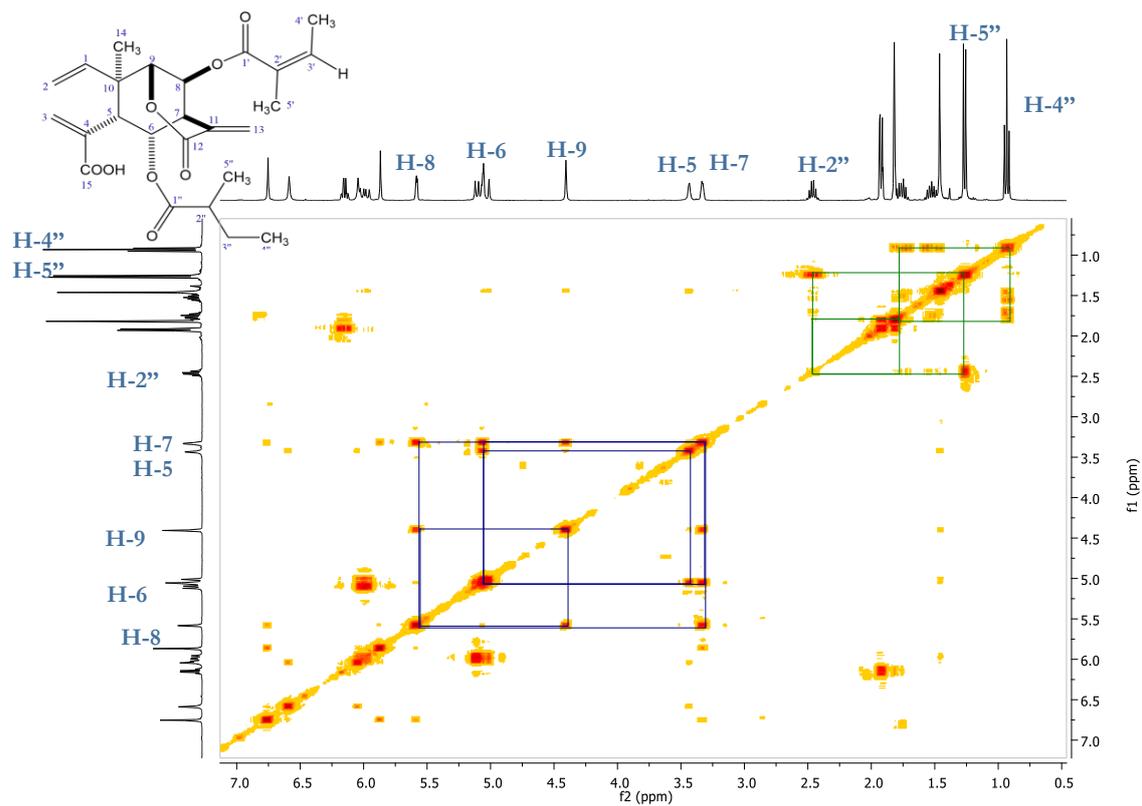


Figura 36. Correlaciones selectas en el espectro bidimensional COSY de Zinagrandinólida E

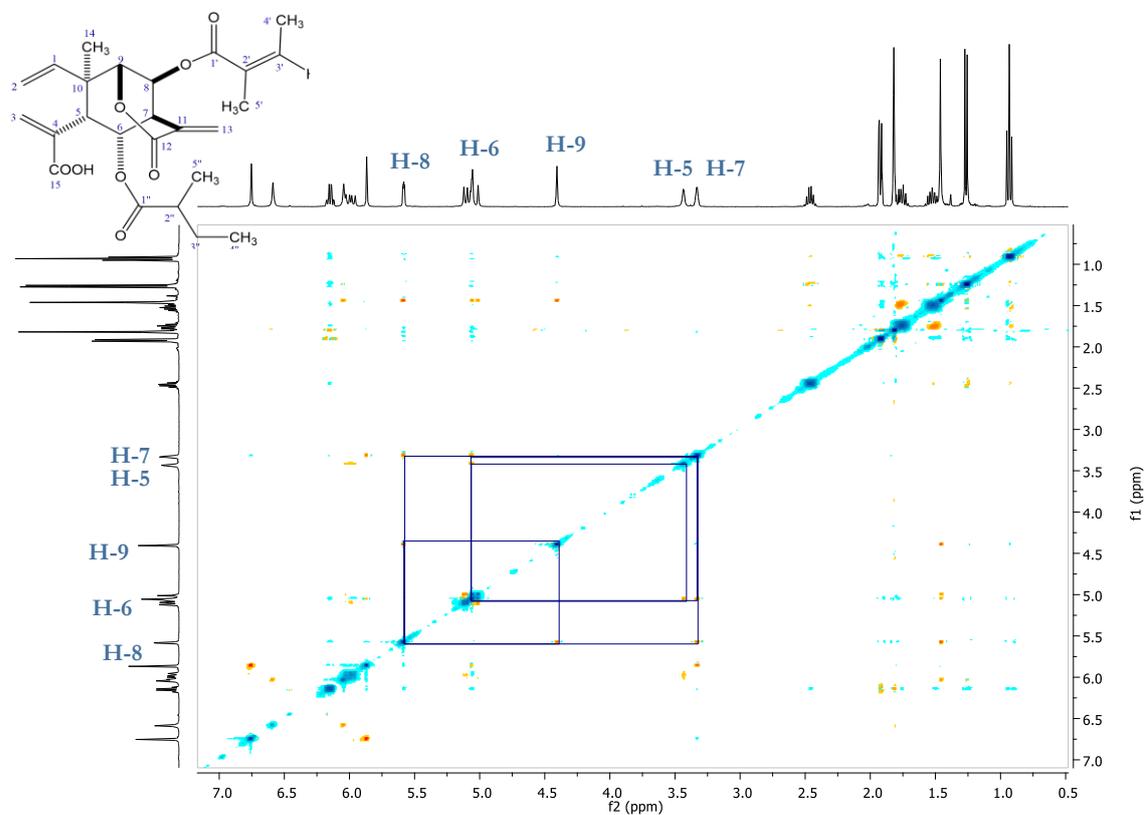


Figura 37. Correlaciones selectas en el espectro bidimensional NOESY de Zinagrandinólida E

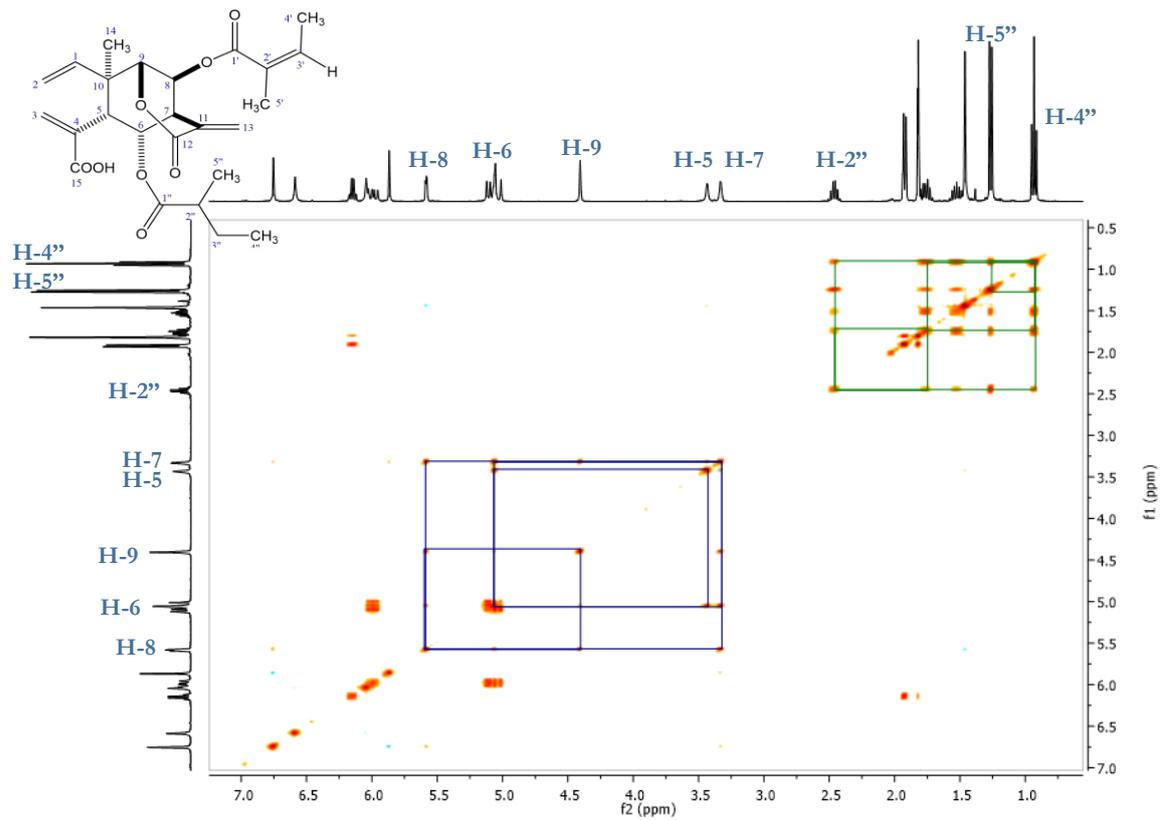


Figura 38. Correlaciones selectas en el espectro bidimensional TOCSY de Zinagrandinólida E

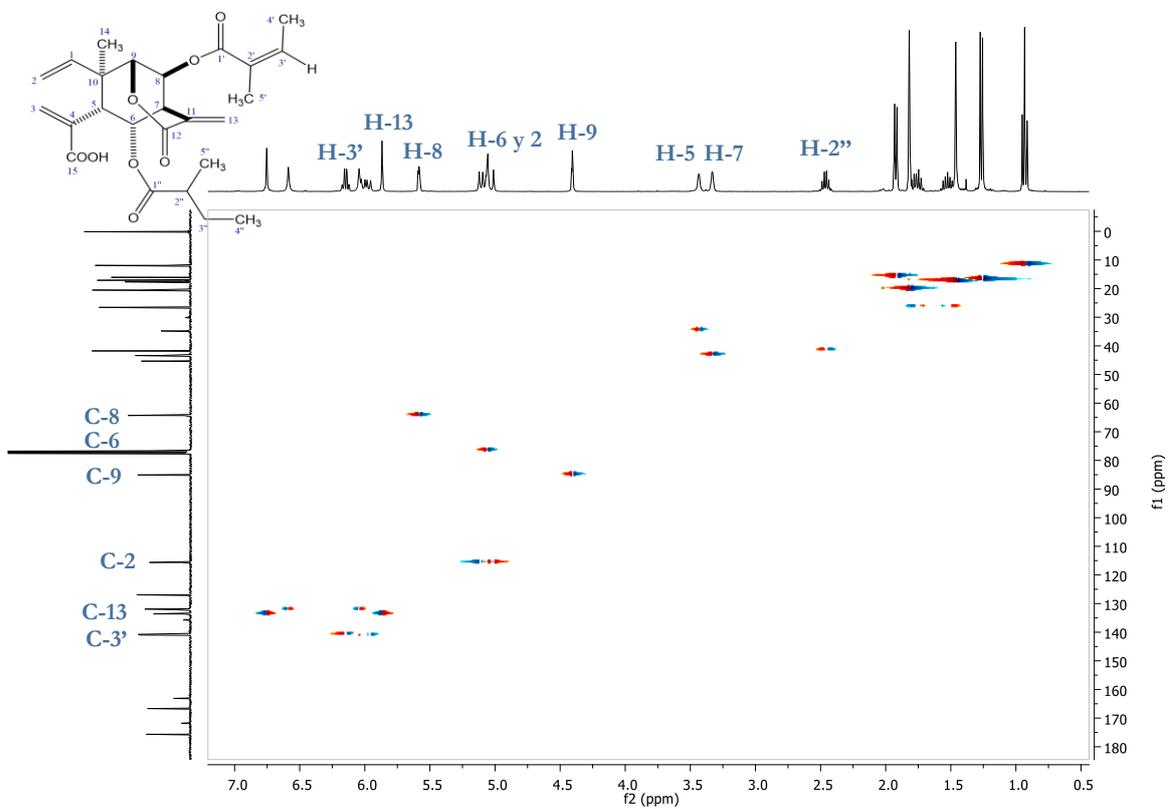


Figura 39. Correlaciones selectas en el espectro bidimensional HSQC de Zinagrandinólida E

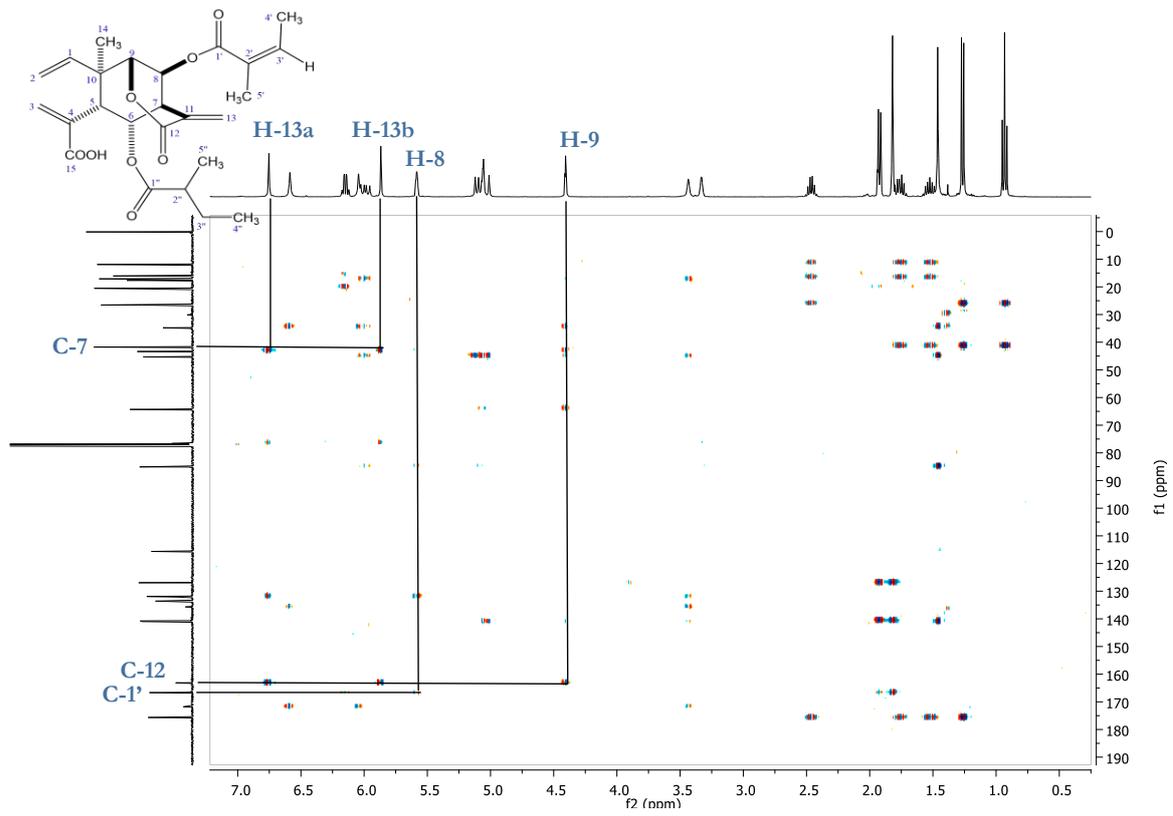


Figura 40. Correlaciones selectas en el espectro bidimensional HMBC de Zinagrandinólida E

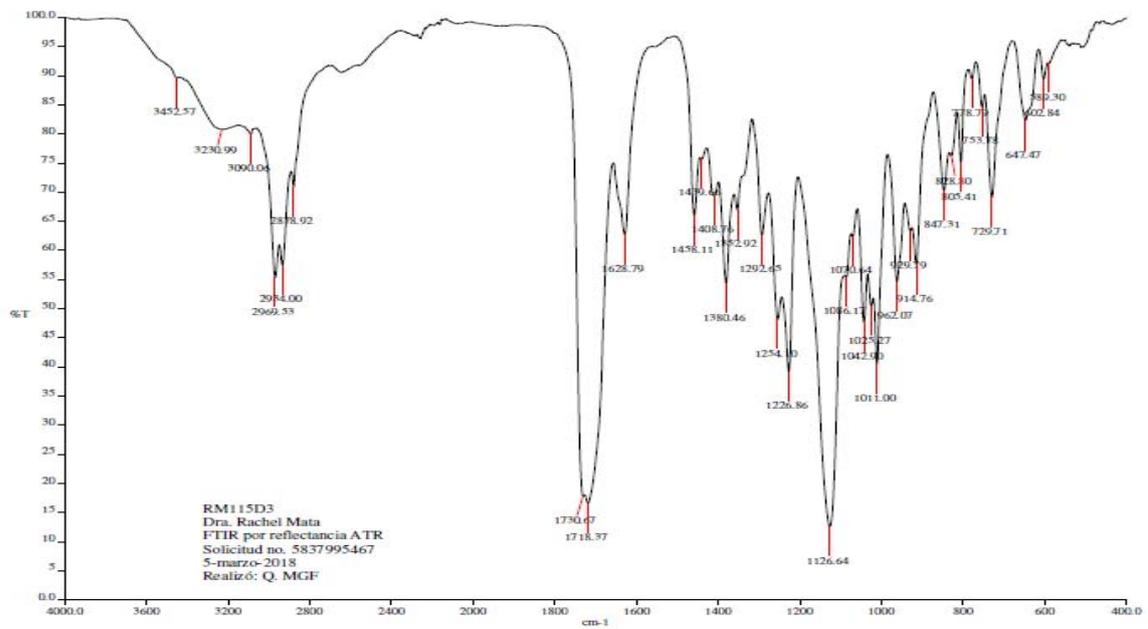


Figura 41. Espectro de FTIR por reflectancia ATR de Zinagrandinólida E.

Zinagrandinólida F (4) Este producto mostró gran similitud con la zinagrandinólida C aislada previamente en la especie en estudio (Bashyal, *et al.*, 2006). La principal diferencia encontrada en los espectros de RMN es que en lugar de las señales para un grupo acetoxilo en C-8 se observan las señales para un residuo de ácido angélico. La presencia del aldehído α , β -insaturado se identificó mediante los desplazamientos químicos a campo bajo característicos, que en el espectro de ^1H se observó como un singlete en δ_{H} 9.32, y en el de ^{13}C en δ_{C} 171.8; la correlación H-15 (δ_{H} 9.32) \rightarrow C-4 (δ_{C} 145.3) observada en el espectro de HMBC permitió corroborar la posición de este sustituyente en el núcleo base. Por otro lado, la estructura del 2-hidroxi-2-metilbutirato se identificó a través de la presencia de dos singletes que integran para tres protones cada uno, y que se encuentran a campo alto en δ_{H} 1.55 (H-3'') y 1.58 (H-4'') correspondientes a dos metilos unidos a un carbono cuaternario base de oxígeno por la correlación con C-2'' (δ_{C} 72.4) en el espectro de HMBC (**Figura 39-A y 45**), mismos que también correlacionan con el carbono cuaternario correspondiente al carbonilo del éster que se encuentra en δ_{C} 176.4 (C-1''). En la **Cuadro 7** se muestra la información comparativa con los espectros de RMN ^1H y ^{13}C de la zinagrandinólida C.

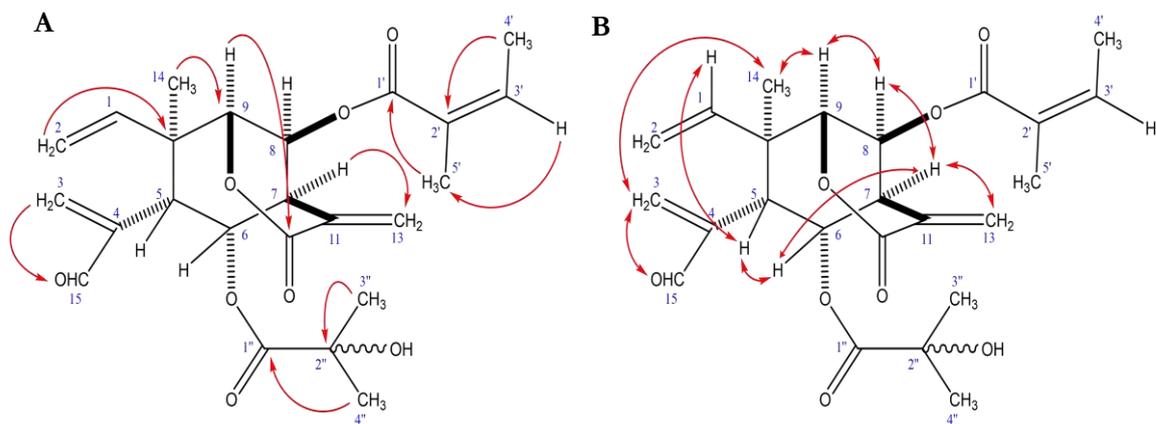


Figura 42. Principales correlaciones observadas en el experimento de A) HMBC y B) NOESY para la Zinagrandinólida F.

Cuadro 7. Datos de RMN de ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) en CDCl_3 de la zinagrandinólida F y zinagrandinólida C				
Posición	zinagrandinólida F		zinagrandinólida C *	
	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	5.88 dd (11.0, 17.4)	141.1	5.84 dd (10.5, 17.5)	141.0
2a	5.08 dd (0.8, 10.8)	115.6	5.05 d (10.5)	115.6
2b	4.97 dd (0.8, 17.6)		4.92 d (17.5)	
3a	6.23 s	139.2	6.18 s	139.3
3b	6.68 s		6.63 s	
4		145.3		145.3
5	3.48 d (3.2)	32.3	3.42 d (3.0)	32.3
6	4.99 dd (3.2)	64.1	4.93 dd (3.0)	64.6
7	3.35 ddd (0.8, 3.2, 6.8)	43.2	3.28 ddd (2.5)	43.1
8	5.58 dd (2.0, 3.6)	77.8	5.44 dd (2.3)	77.9
9	4.42 t (2.4)	84.9	4.33 dd (2.0)	84.8
10		45.1		45.2
11		131.6		131.2
12		162.6		162.6
13a	6.78 s	133.9	6.75 s	134.2
13b	5.86 s		5.83 s	
14	1.46 s	18.0	1.40 s	18.1
15	9.32 s	193.1	9.27 s	193.1
1'		166.7		
2'		126.9	2.04 s	21.1
3'	6.18 cc (1.6, 7.4)	141.1		
4'	1.93 dc (1.6, 7.2)	16.1		
5'	1.82 q (1.6)	20.5		
1''		176.4		
2''		72.4		
3''	1.55 s	27.2	1.50 s	27.2
4''	1.58 s	27.7	1.53 s	27.8

*Los datos presentados en esta tabla para la zinagrandinólida C fueron tomados de la publicación de Bashyal y colaboradores, (2006).

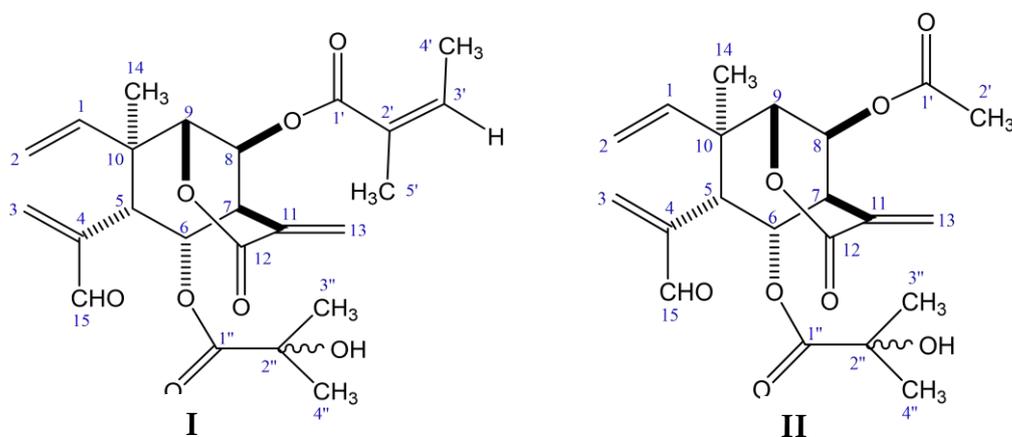


Figura 43. I) Zinagrandinólida F. II) Zinagrandinólida C

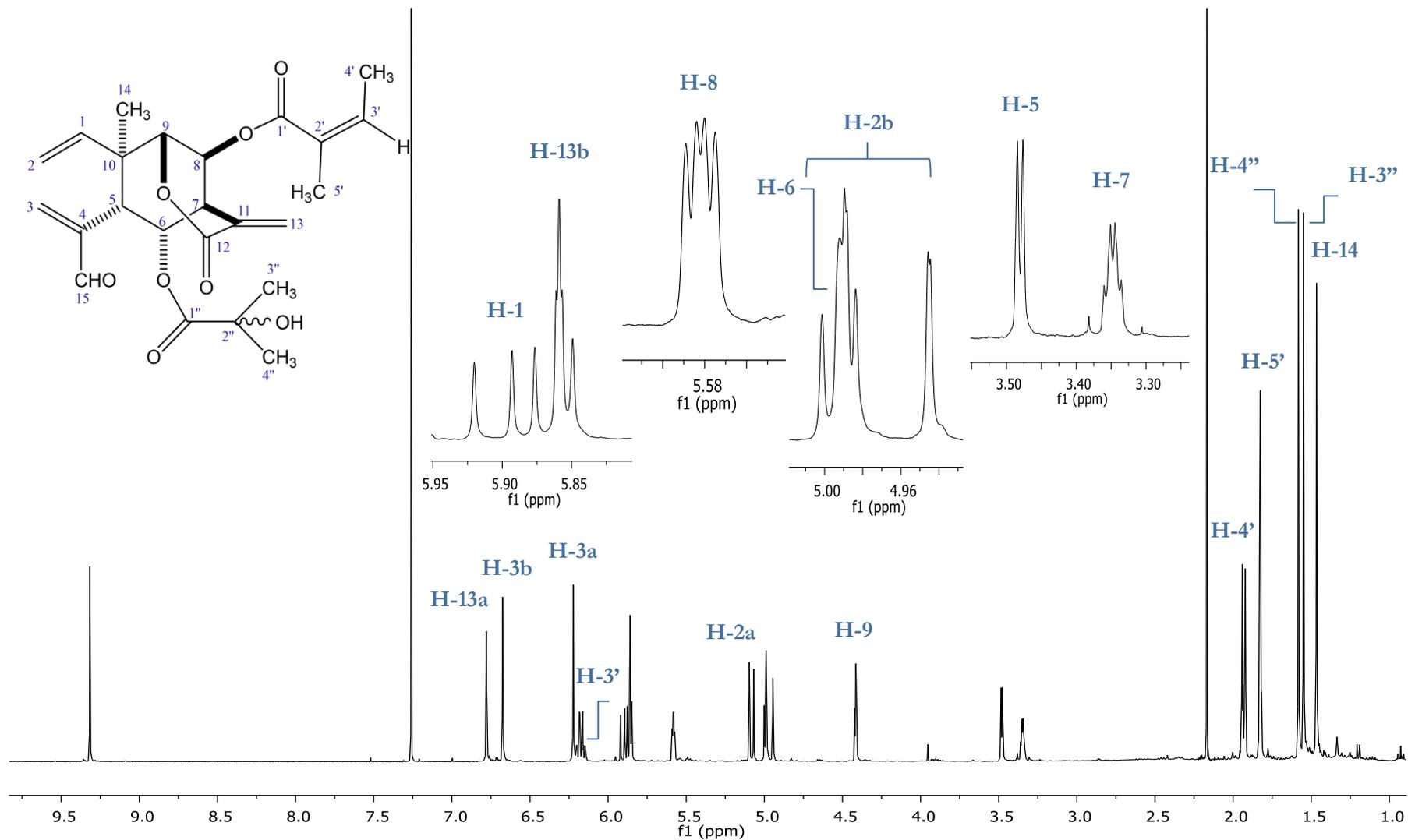


Figura 44. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CD_3Cl_3) de la Zinagrandinólida F.

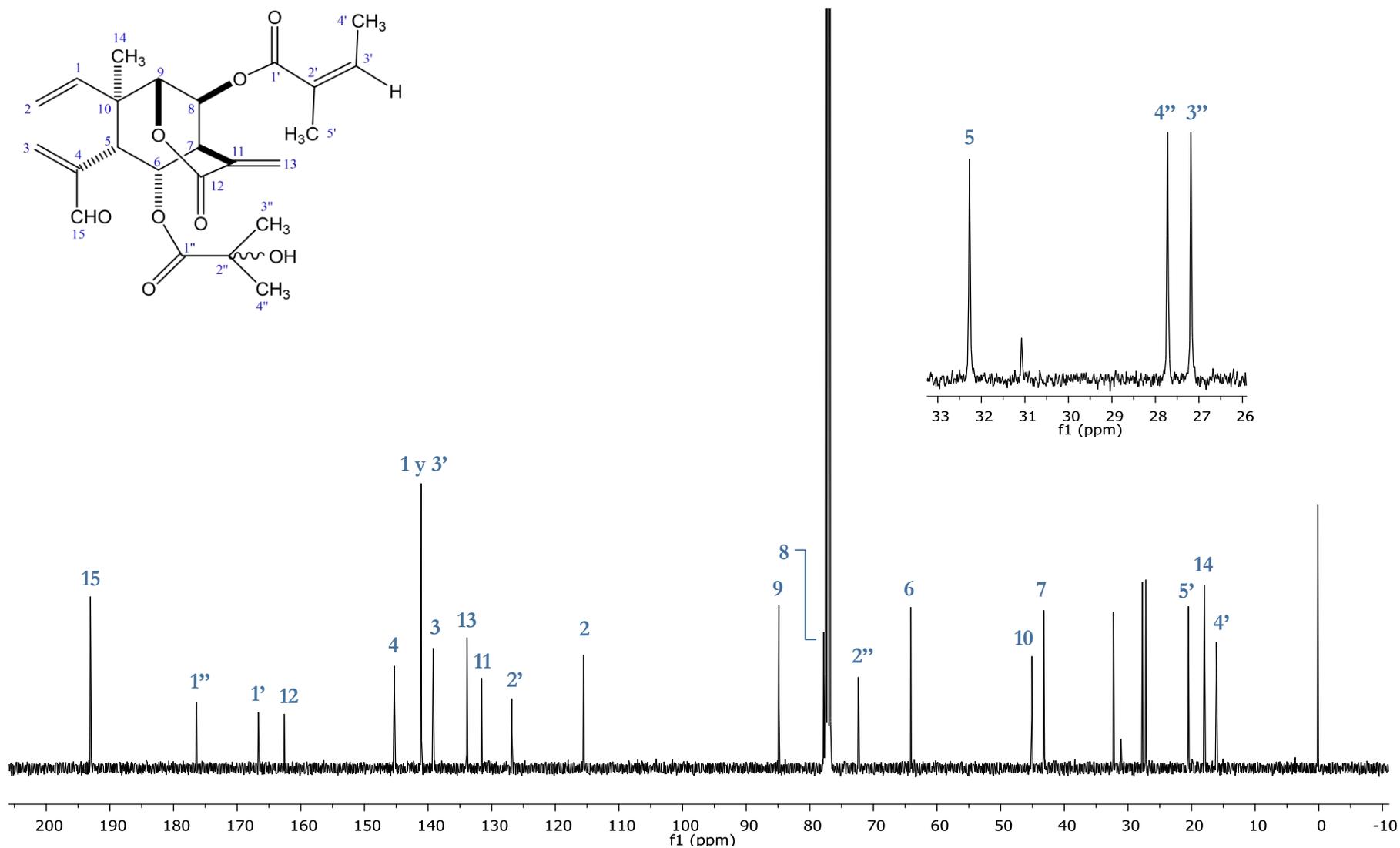


Figura 45. Espectro de ¹³C-RMN (100 MHz, CD₃Cl₃) de la Zinagrandinólida F

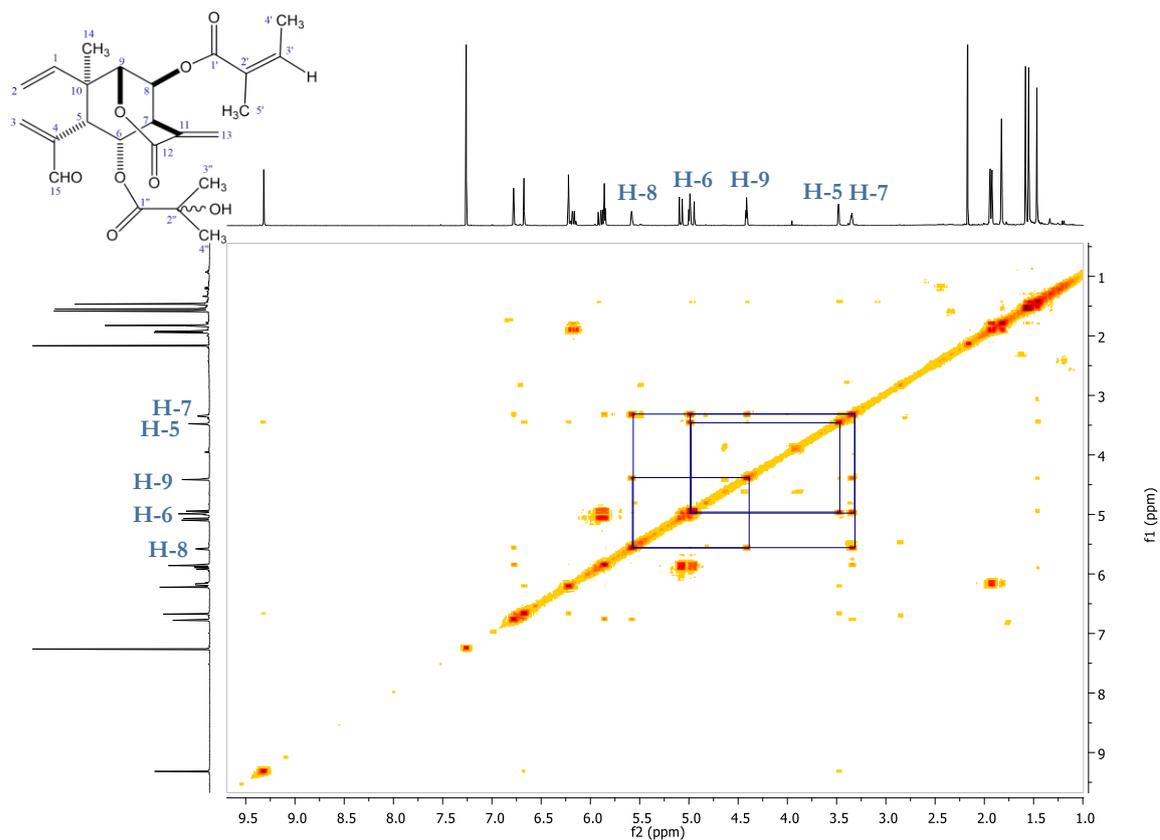


Figura 46. Correlaciones selectas en el espectro bidimensional COSY de Zinagrandinólida F

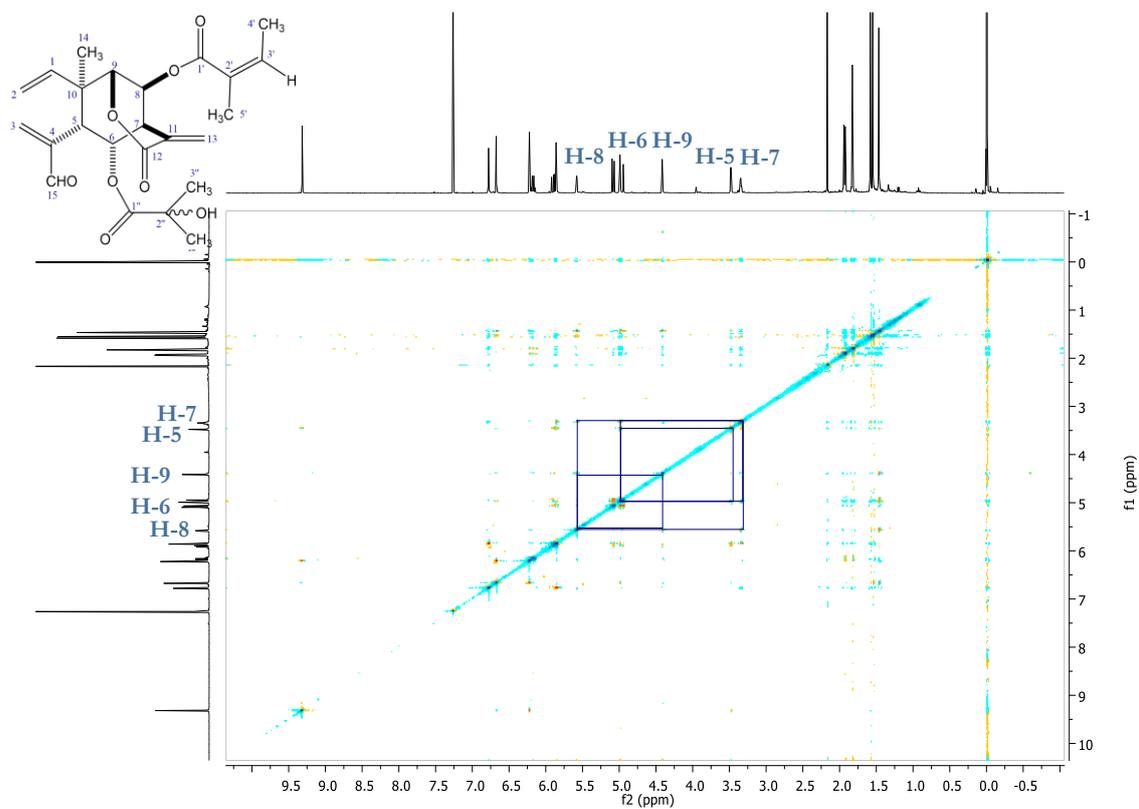


Figura 47. Correlaciones selectas en el espectro bidimensional NOESY de Zinagrandinólida F

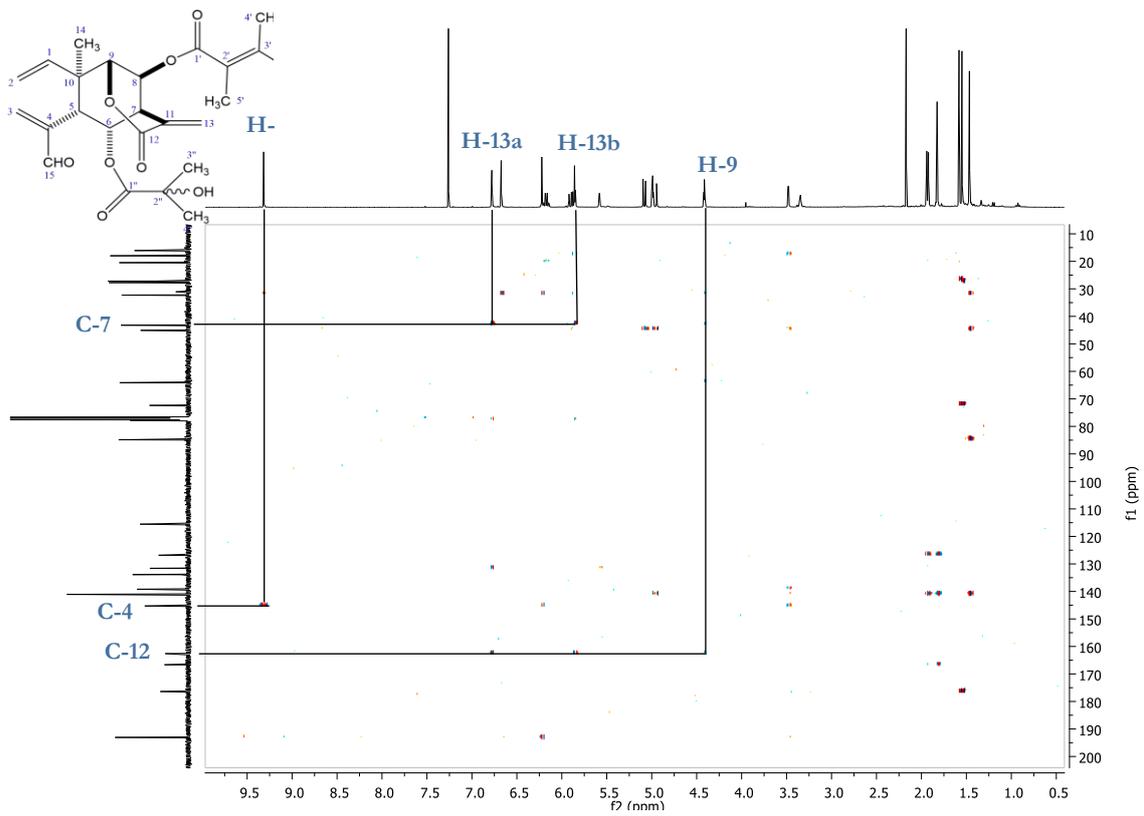


Figura 48. Correlaciones selectas en el espectro bidimensional HMBC de Zinagrandinólida F

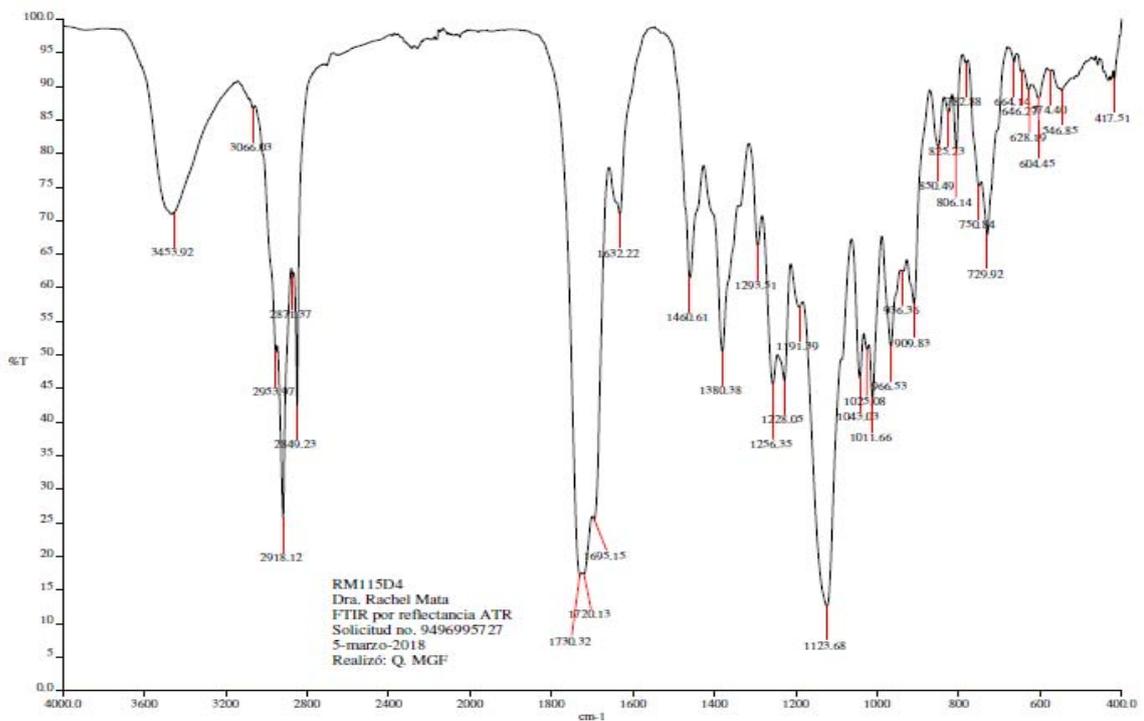


Figura 49. Espectro de FTIR por reflectancia ATR de Zinagrandinólida F.

El uso fitoterapéutico de las plantas que contienen lactonas sesquiterpénicas es muy común. La eficacia e inocuidad de estas plantas se han establecido tanto a nivel preclínico como clínico. Tres ejemplos clásicos de este tipo de plantas son la alcachofa, la manzanilla y la equinácea. Estas especies se usan a pesar de su alto contenido de diferentes tipos de lactonas sesquiterpénicas. Estos metabolitos provocan alquilación macromoléculas biológicas a través de la formación de enlaces covalentes. Este efecto es muy poco específico, con una baja selectividad y, por lo tanto, con riesgo de alta toxicidad inespecífica (Amorim, *et al.*, 2013).

Esta información podría ser contaría a los resultados sobre la toxicidad aguda del extracto acuoso de *Z. grandiflora*, que de acuerdo a los criterios de Lorke es no tóxico para roedores. Sin embargo, hay que considerar que el extracto de la planta contiene numerosos constituyentes y que todos contribuyen al efecto terapéutico de los fitofármacos bien sea por interacciones de tipo sinérgicas, como coadyuvantes mejorando los parámetros farmacocinéticos de los principios activos presentes en la mezcla o evitando su descomposición o degradación; y finalmente como neutralizadores de los efectos tóxicos potenciales de algunos de los principios activos o no presentes en la mezcla. Entonces el efecto de un preparado fitoterápico es el resultado de la acción conjunta de sus constituyentes; esta afirmación representa el paradigma de la fitoterapia como alternativa terapéutica (Wagner y Ulrich-Merzenich, 2009; Rather, *et al.*, 2013). Por otro lado, la posible toxicidad de las lactonas sesquiterpénicas reportadas en este trabajo, es presuntiva, con base en los antecedentes antes mencionados; es necesario realizar los estudios toxicológicos tanto agudos como crónicos con la finalidad de obtener información concluyente en este aspecto.

6.1.4. Obtención de los perfiles cromatográficos de los extractos de *Z. grandiflora*

La aplicación de la cromatografía combinada con una adecuada técnica de detección representa una herramienta útil para obtener perfiles característicos de extractos complejos derivados de las drogas crudas o productos herbolarios (Tistaert, *et al.*, 2011). La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) ha sido la técnica de elección para la obtención de huellas digitales de extractos de plantas medicinales durante largo tiempo (Lu, *et al.*, 2005; Li, *et al.*, 2010), sin embargo, en los últimos años se ha posicionado la cromatografía de líquidos de ultra eficiencia (CLUE) como una mejor herramienta analítica para establecer perfiles característicos y la identificación de los compuestos en este tipo de muestras (Tistaert, *et al.*, 2011; Cielecka-Piontek, *et al.*, 2013). Las columnas que se utilizan en esta técnica están modificadas con una reducción del tamaño de partícula ($< 2.5 \mu\text{m}$) lo que permite trabajar con presiones mucho mayores, lo que a su vez mejora notablemente la sensibilidad, la resolución, y el tiempo de análisis (Nováková, *et al.*, 2006; Mahamudur, 2014). Si la técnica de CLUE se utiliza combinada con espectrometría de masas, se logra además aumentar la selectividad ya que los metabolitos presentes se pueden identificar sin ambigüedad (Dan, *et al.*, 2008; Tistaert, *et al.*, 2011; Wen, *et al.*, 2012). Por lo anterior, se decidió utilizar en esta investigación un equipo de CLUE acoplado a un detector de fotodiodos (PDA) y un detector de masas por ionización en electrospray (ESI-EM), con la finalidad de establecer la complejidad y, en lo posible, la identidad de los compuestos en el preparado tradicional de *Z. grandiflora*. Los resultados obtenidos también pueden sentar las bases para establecer las pruebas de composición del mismo y su estandarización. Cabe mencionar, que para el aseguramiento de la calidad de los preparados de plantas medicinales es necesario realizar los ensayos de identidad y composición antes mencionados. En este sentido, la OMS ha aceptado el análisis y la producción de “huellas digitales” que permitan establecer patrones de los metabolitos presentes, ya que en algunos casos la utilización de los denominados compuestos marcadores no siempre resulta conveniente (OMS, 2013). Una huella digital se puede definir como un perfil característico que refleja la complejidad

de la composición química de la muestra analizada y que puede ser obtenida a través de técnicas espectroscópicas, cromatográficas o electroforéticas (Tistaert, *et al.*, 2011).

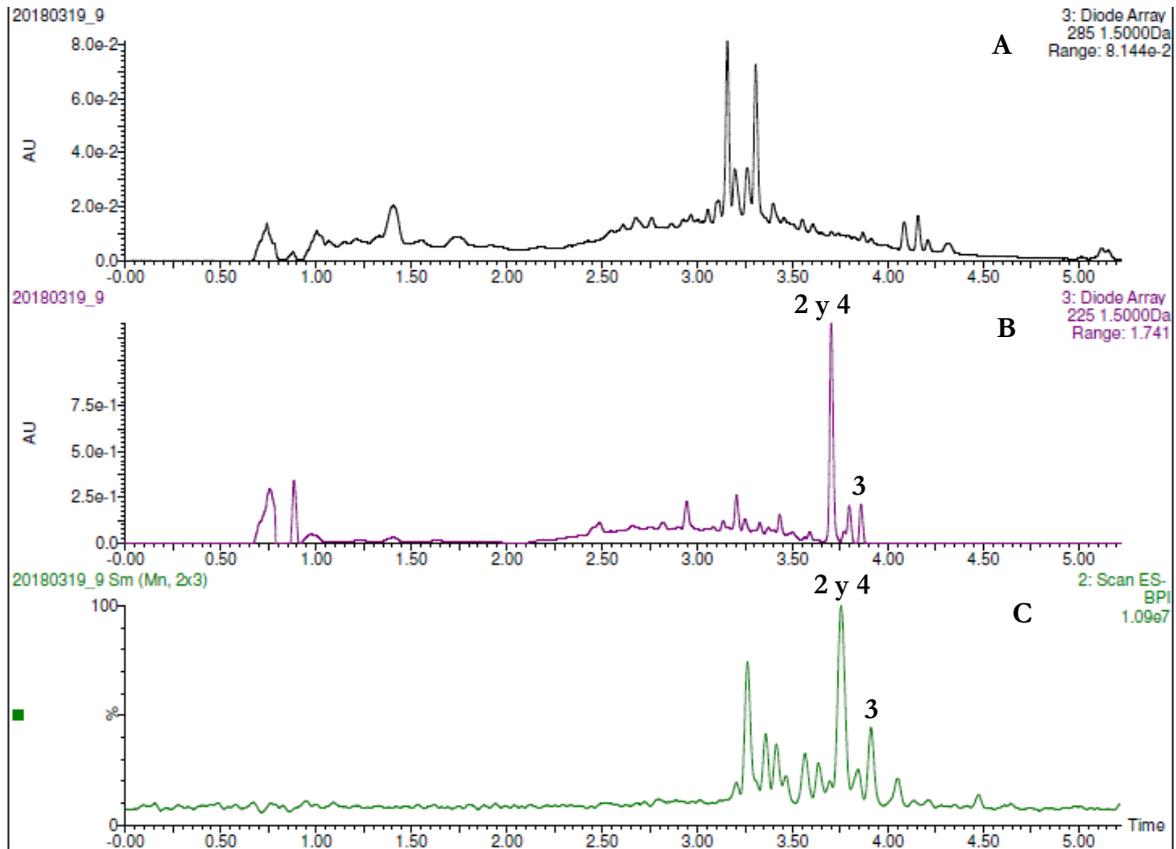


Figura 50. Cromatogramas característicos de la fracción de CH_2Cl_2 . A) Cromatograma obtenido por PDA, con $\lambda=285$ nm. B) Cromatograma obtenido por PDA, con $\lambda=225$ nm. C) Cromatograma de iones totales en ESI-MS (modo negativo).

En este trabajo se generaron los perfiles cromatográficos de las fracciones activas de la infusión de *Zinnia grandiflora* por las técnicas de CLUE-PDA-ESI-EM, debido a que no se logró una resolución adecuada del cromatograma del extracto acuoso ensayado debido a su complejidad. La resolución de los compuestos de ambas fracciones se obtuvo con una columna BEH C_{18} , con un gradiente de elución de MeCN y $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ (ácido fórmico 0.1%), y flujo de 0.3 mL/min. El cromatograma característico de las fracciones de CH_2Cl_2 y AcOEt del preparado es el resultado de diferentes ensayos utilizando varias fases móviles y estacionarias como se ilustra en las **Figuras 50 y 51**, respectivamente. Con la técnica de ESI-MS, los compuestos de la fracción de AcOEt

presentaron una mejor ionización en el modo positivo, mientras que los compuestos de la fracción de CH₂Cl₂ mostraron una mejor ionización en el modo negativo.

Los compuestos mayoritarios en ambas fracciones se identificaron en sus respectivos cromatogramas a partir de la relación m/z correspondiente al [M+1]⁺ y/o [M-1]⁻ de los compuestos puros y el perfil de UV característico de los mismos.

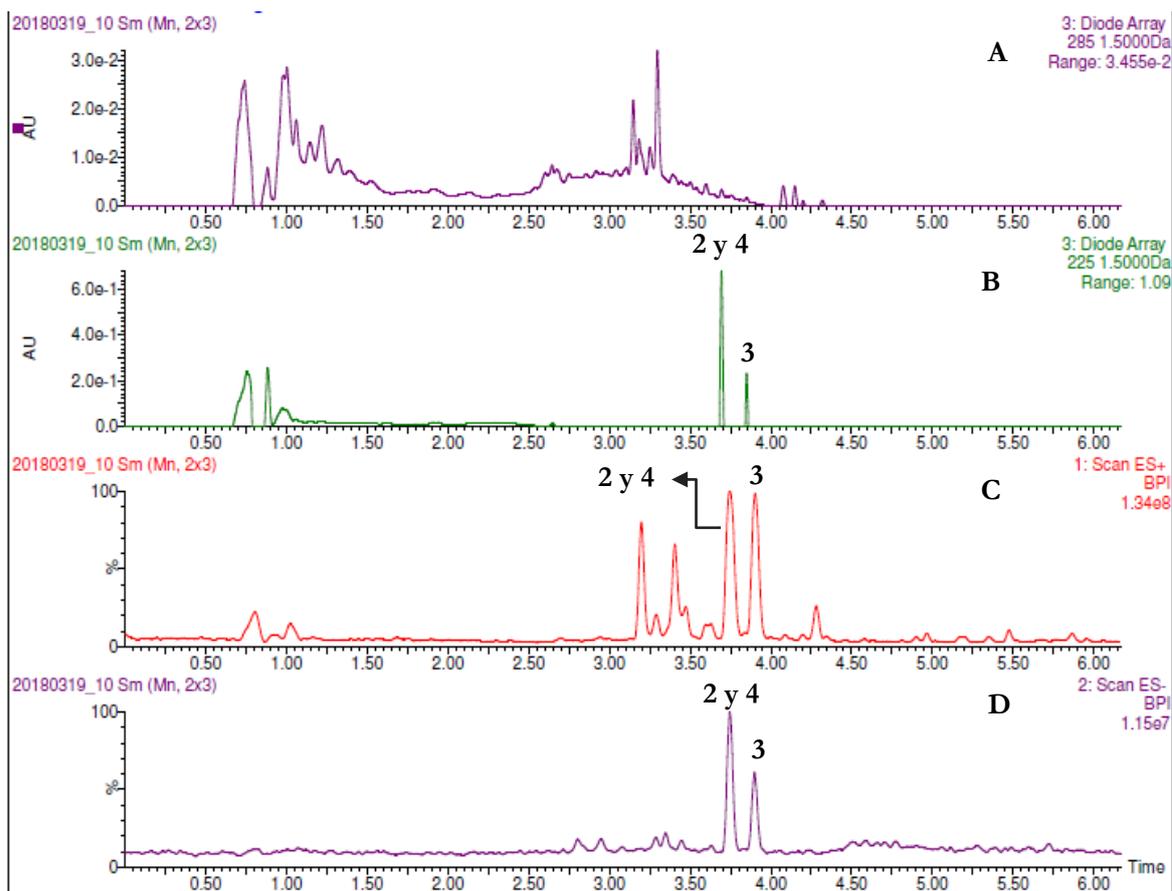


Figura 51. Cromatogramas característicos de la fracción de AcOEt. A) Cromatograma obtenido por PDA, con $\lambda=285$ nm. B) Cromatograma de iones totales en ESI-MS (modo positivo). D) Cromatograma de iones totales en ESI-MS (modo negativo).

Las zinagrandinólidas D y E (2-3) son compuestos mayoritarios en ambas fracciones. Mientras que en la fracción de CH₂Cl₂ también es mayoritaria la zinagrandinólida F (4), y presenta además máximos de absorción en el espectro de UV que sugieren la presencia de otras lactonas sesquiterpénicas.

En la **Figura 52** se pueden apreciar también el pico del cromatograma de iones totales de ESI-MS que pertenece al compuesto luteolina (**1**) aislado de la fracción de AcOEt.

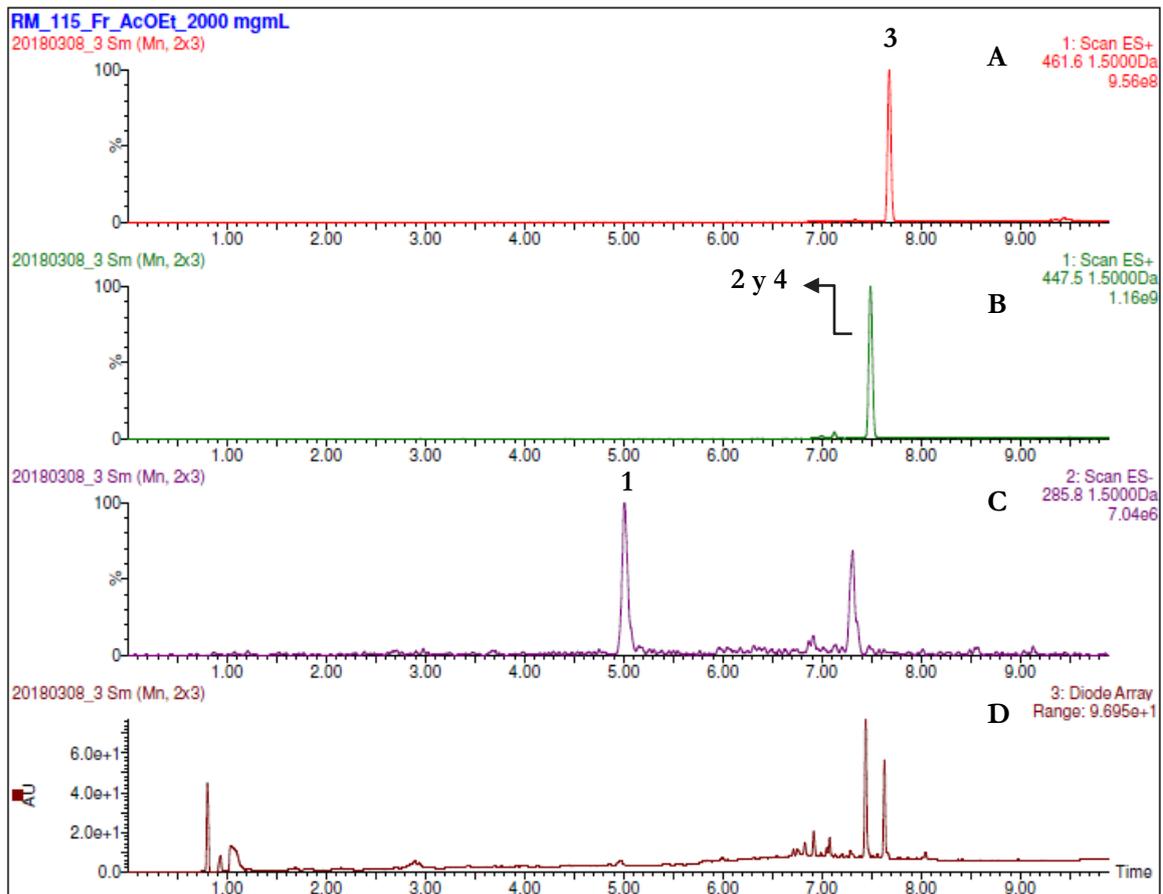


Figura 52. Cromatograma de iones totales de la fracción de AcOEt identificando a los compuestos con m/z A) 461.72 (ESI+), B) 447.68 y 447.70 (ESI+), C) 285.5 (ESI-). D) Cromatograma obtenido por PDA de la fracción de AcOEt

Adicionalmente, en ambas fracciones, a una longitud de onda de 285 nm [Figuras 50 y 51 (A)] se detectaron picos mayoritarios con perfiles de UV característicos de compuestos de tipo flavonoide.

El análisis por CLUE-PDA-ESI-EM de las fracciones activas revela que sus compuestos mayoritarios son lactonas sesquiterpénicas (entre estas las δ - elemanólidas aisladas) y flavonoides. Por lo anterior se sugiere que son estos compuestos los que contribuyen a la actividad farmacológica de la planta en cuestión.

Estos resultados se justifican a partir de los hallazgos científicos que demuestran que diversos compuestos naturales son capaces de aliviar el dolor y la inflamación al reducir la síntesis de mediadores inflamatorios, o bien, a través de la modulación de rutas nociceptivas e inflamatorias (Martínez-González, *et al.*, 2017). En especial, las lactonas sesquiterpénicas han demostrado presentar gran variedad de actividades biológicas, debido a su diversidad estructural, entre las que destacan sus propiedades anticancerígenas, antitumorales, antivirales, antibacteriales, antifúngicas, y para propósitos de justificar los resultados este trabajo, sus propiedades antinociceptivas y antiinflamatorias (Chaturvedi, 2011; Merfort, 2011; De Faveri Favero, *et al.*, 2014), lo que hace a estos compuestos los metabolitos secundarios de mayor prevalencia y significancia biológica, de acuerdo con Mefort (2011). Se han realizado diversos estudios que han demostrado la actividad de las fracciones orgánicas que contienen lactonas sesquiterpénicas de una variedad de plantas, pertenecientes en su mayoría a la familia Asteraceae, en una cantidad de modelos de dolor agudo e inflamatorio, entre los que destacan el modelo de la formalina y la carragenina presentados en esta investigación. El mecanismo de acción a través del cual llevan a cabo su efecto antinociceptivo estos compuestos aún no es bien conocido, sin embargo se atribuye a las lactonas sesquiterpénicas que contienen grupos α -metileno- γ -lactona y anillos ciclopentanona α , β -insaturados (Chaturvedi, 2011), los cuales poseen una fuerte actividad inhibitoria de iNOS (Bremmer & Heinrich, 2002). Sin embargo, el enfoque de la mayoría de los estudios antes mencionados se encuentra en la fuerte actividad de las lactonas sesquiterpénicas en el proceso de inflamación en general, haciendo énfasis en el efecto de estos compuestos en la inhibición de la producción de mediadores de la inflamación como lo son NF- κ B, HT, 5HT, NO, PGE2, TNF- α , e IL-1 β (Emami, *et al.*, 2010; Merfort, 2011; De Faveri Favero, *et al.*, 2014), lo que justifica los resultados obtenidos en la fase 2 del modelo de la formalina, y los obtenidos con el modelo de la carragenina.

Por otro lado, los flavonoides también han demostrado en diversos estudios su actividad antinociceptiva. La flavona luteolina, aislado en este trabajo, tiene efecto antinociceptivo en pruebas de dolor agudo e inflamatorio (Backhouse, *et al.*, 2008; Lin, *et al.*, 2008; Rabelo, *et al.*, 2013; Hara, *et al.*, 2014), ya que este compuesto, al ser lipofílico,

atraviesa la barrera hematoencefálica y actúa sobre la transmisión GABAérgica en la médula espinal, la cual tienen un papel importante en la nocicepción de una amplia variedad de condiciones dolorosas, que incluyen el dolor agudo, inflamatorio y neuropático (Enna & McCarson, 2006; Hara, *et al.*, 2014). Además, la luteolina actúa inhibiendo la actividad de las enzimas iNOS y COX-2 (inducible), responsables de la producción de óxido nítrico y la liberación de PGE₂, lo que también puede explicar su actividad analgésica (Hu & Kitts, 2004). Otros estudios han demostrado que los flavonoides se pueden absorber en la dermis y penetrar a capas más profundas de la piel, lo que justifica su fuerte actividad analgésica tópica (Backhouse, *et al.*, 2008), lo que también explica el uso etnobotánico que le dan los indios Zuni al cataplasma de esta planta para tratar hematomas (Stevenson, 1915).

7. CONCLUSIONES

- A.** Se estableció la inocuidad del extracto acuoso de *Zinnia grandiflora* de acuerdo a los criterios propuestos por Lorke. La DL₅₀ fue mayor a 5 g/kg, por lo que, basado en los estudios anteriores y los antecedentes de su uso histórico, se presume el consumo de esta planta es seguro para el ser humano.
- B.** Se evidenció la eficacia preclínica del preparado tradicional (infusión) de *Zinnia grandiflora* como agente antinociceptivo y antiinflamatorio en los ensayos de la formalina y carragenina en ratones, lo que podría sustentar su uso tradicional para el tratamiento de padecimientos dolorosos. La DE₅₀ calculada de la curva dosis-respuesta fue de 315.73 ± 85.50 mg/kg de peso en el modelo de la formalina. En todos los casos la mayor actividad se registró en la fase inflamatoria.
- C.** Se determinó la actividad de las fracciones de diclorometano y acetato de etilo obtenidas por reparto de la infusión de *Zinnia grandiflora* en el ensayo de la formalina en ratones, identificando que la mayor actividad de ambas fracciones se encuentra en la fase inflamatoria de este ensayo, y siendo la fracción de diclorometano la más activa de las dos.
- D.** De la fracción activa de diclorometano se aislaron y purificaron tres nuevos compuestos que se identificaron mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas como lactonas sesquiterpénicas del tipo δ -elemánolidas y que se denominaron con los nombres triviales de zinagrandinólidas D-F.
- E.** Con los resultados observados de ambas fracciones en los modelos *in vivo* y el análisis de los perfiles cromatográficos de las mismas generados por CLUE-PDA-ESI-MS, se puede sugerir que la actividad antinociceptiva y antiinflamatoria de la

infusión de *Zinnia grandiflora* puede deberse por lo menos a dos grupos de metabolitos secundarios, lactonas sesquiterpénicas de tipo δ -elemánolidas, y flavonoides.

- F.** Esta información, en conjunto con los parámetros de eficacia y seguridad generados durante el estudio, contribuirá al uso medicinal racional de esta especie para el tratamiento de padecimientos dolorosos en México.

8. PERSPECTIVAS

Con la finalidad de complementar la información generada a partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación sobre la actividad farmacológica y composición química del preparado tradicional de *Zinnia grandiflora* y sus derivados, se pretende realizar estudios adicionales que permitan establecer de manera integral los parámetros de calidad, eficacia y seguridad de la planta que garanticen su uso racional. Para lograr lo anterior, se establecieron las perspectivas que se mencionan a continuación.

- A. Establecer la actividad *in vivo* de los compuestos puros zinagrandinólidas D-F con la finalidad establecer si son éstos los principios activos del extracto acuoso y fracción de CH₂Cl₂. De ser así, determinar su mecanismo de acción en modelos animales adecuados.

- B. Continuar con el estudio químico y farmacológico de la planta con la finalidad de generar información sobre su eficacia, composición, e identificación de los principios activos, determinando el efecto de los extractos, fracciones y metabolitos secundarios en los modelos adecuados.

- C. Desarrollar y validar un método cromatográfico para la cuantificación de los metabolitos activos con el propósito de establecer una prueba de composición de tipo farmacopéica, indispensable para el control de calidad de las drogas crudas y sus preparados farmacéuticos.

- D. Realizar estudios de toxicidad crónica de los preparados y principios activos que se caractericen en la planta con la finalidad de contribuir a la utilización segura de la misma.

9. REFERENCIAS

- Amorim, M. H., Gil da Costa, R. M., Lopes, C., Bastos, M. M. (2013). Sesquiterpene lactones: Adverse health effects and toxicity mechanisms. *Critical Reviews in Toxicology*, 43(7), 559-579. DOI: 10.3109/10408444.2013.813905.
- Ang, S. T., Zacky Ariffin, M., Khanna, S. (2017). The forebrain medial septal region and nociception. *Neurobiology of Learning and Memory*, 138, 238-251.
- Backhouse, N., Delporte, C., Apablaza, C., Farías, M., Goity, L., Arrau, S., Miranda, H. (2008). Antinociceptive activity of *Buddleja globosa* (matico) in several models of pain. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(1), 160-165.
- Barreno, P. G. (2008). Inflamación. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* (Esp), 102(1), 91-159.
- Barrot, M. (2012). Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*, 211, 39-50.
- Bars, D. L., Gozariu, M., Cadden, S. W. (2001). Animal Models of Nociception. *Pharmacological Reviews*, 53(4), 597-652.
- Bashyal BP., McLaughlin S.P., Gunatilaka A.A. (2006). Zinagrandinolides A-C, Cytotoxic d-Elemanolide-Type Sesquiterpene Lactones from *Zinnia*. *Journal of Natural Products*, 69, 1820-1822.
- Bohlmann, F., Zdero, C., King, R. M., Robinson, H. (1979). Neue Elemanolide Und Guajanolide Aus *Zinnia*-Arten. *Phytochemistry*, 18, 1343-1348.
- Bohlmann, F., Ziesche, J., King, R. M., Robinson, H. (1981). Eudesmanolides, guaianolides, germacranolides and elemanolides from *Zinnia* species. *Phytochemistry*, 20(7), 1623-1630.
- Bye, R. (2017). Comunicación personal.

- Bremmer, P., Heinrich, M. (2002). Natural products as targeted modulators of the nuclear factor kB pathway. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 54(4), 453-472.
- Cabral, E. L., Casco, S. L. (2010). *Asterideas. Diversidad vegetal biotaxonomía de spermatofitos*. Corrientes, Argentina: Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura.
- Chaturvedi, D. (2011). Sesquiterpene lactones: Structural diversity and their biological activities. En: V. K. Tiwari, (Ed.) *Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry* (págs. 313-334). Kerala, India: Reseach Signpost.
- Cielecka-Piontek, J., Zalewski, P., Jelinska, A., Garbacki, P. (2013) UHPLC: The Greening Face of Liquid Chromatography. *Chromatographia*, 76(21-22), 1429-1437.
- Dan, M., Su, M., Gao, X., Zhao, T., Zhao, A., Xie, G., Qiu, Y., Zhou, M., Liu, Z., Jia, W. (2008). Metabolite profiling of *Panax notoginseng* using UPLC-ESI-MS. *Phytochemistry*, 69(11), 2237-2244.
- De Faveri Favero, F. D., Grando, R., Nonato, F. R., Sousa, I. M., Queiroz, N. C., Longato, G. B., Foglio, M. A. (2014). Artemisia annua L.: evidence of sesquiterpene lactones fraction antinociceptive activity. *Complementary and Alternative Medicine*, 14, 266.
- Déciga-Campos, M., Mata, R. & Rivero-Cruz, I. (2017). Antinociceptive pharmacological profile of *Dysphania graveolens* in mouse. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 89, 933-938.
- Dubuisson, D., Dennis, S. (1997). The formalin test: A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, 4(2), 161-174.
- Eblen-Zajjur, A. (2005). Neurofisiología de la nocicepción. *Gaceta Médica de Caracas*, 113(4), 446-443.
- Elmore, F. H. (1944). *Ethnobotany of the Navajo*. Santa Fe, Nuevo México: The University of New Mexico Press.

- El-Shafey, N. M., AbdElgawad, H. (2012). Luteolin, a bioactive flavone compound extracted from *Cichorium endivia* L. subsp. *divaricatum* alleviates the harmful effect of salinity on maize. *Acta Physiol Plant*. DOI: 10.1007/s11738-012-1017-8
- Emami, S. A., Taghizadeh Rabe, S. Z., Iranshahi, M., Ahi, A., Mahmoudi, M. (2010). Sesquiterpene lactone fraction from *Artemisia khorassanica* inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression through the inactivation of NF- κ B. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 32, 688-695.
- Enna, S., McCarson, K. M. (2006). The Role of GABA in the Mediation and Perception of Pain. *Advances in Pharmacology*, 54, 1-27.
- FHEUM. (2013) *Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos* (Segunda ed.). México D.F.: Secretaría de Salud.
- Freire-Fierro, A. (2004) *Botánica sistemática ecuatoriana*. Missouri Botanical Garden. St Louis, Missouri: Murray Print.
- Gan, T.J. (2010) Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. *Current Medical Research and Opinion*, 26(7), 1715-1731. DOI: 10.1185/03007995.2010.486301.
- Guevara, U. (2004). Mecanismos neurobiológicos de la nocicepción y antinocicepción. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 27(1), 134-135.
- Hara, K., Haranishi, Y., Tadanori, T., Takahashi, Y., Nakamura, M., Takeyoshi, S. (2014). Effects of inthathecal and intracerebroventricular administration of luteolin in a rat neuropathic pain model. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 125, 78-84.
- Harborne, J. B., Giriya, A. R., Devi, H. M., Lakshmi, K. M. (1983). Anthchlor pigments from the petals of *Mussaenda hirsutissima* and *Zinnia linearis*. *Phytochemistry*, 22(12), 2741-2742.
- Herz, W., Govidan, S. V. (1982). An elemanolide from *Zinnia grandiflora*. *Phytochemistry*, 21(3), 787-788.

- Herz, W., Govindan, S. V. (1981). Elemanolides from *Zinnia peruviana*. *Phytochemistry*, 20(9), 2229-2231.
- Hu, C., Kitts, D. D. (2004). Luteolin and luteolin-7-O-glucoside from dandelion flower suppress iNOS and COX-2 in RAW264.7 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 265, 107-113.
- IASP. (1994). Pain terms, a current list with definitions and notes on usage. En: *Classification of Chronic Pain*. (2a ed), págs. 209-214. Seattle,WA: IASP Press.
- Joseph-Nathan, P., Wesener, J., Günther, H. (1984). A two-dimensional NMR Study of Angelic and Tiglic Acid. *Organic Magnetic Resonance*, 22(3), 190-191.
- Kassim, M., Achoui, M., Mansor, M., Yussoff, K. M. (2010). The inhibitory effect of Gelam honey and its extracts on nitric oxide and prostaglandin E2 in inflammatory tissues. *Fitoterapia*, 81, 1196-1201.
- King, C., Keil, A., Sibille, K. (2016). Chronic Pain and Perceived Stress. En: *Stress: Concepts, Cognition, Emotion, and Behavior*, págs. 413-421. San Diego., CA: Academic Press.
- Lee, A. T.-H., Zacky Ariffin, M., Zhou, M., Zhou Ye, J. (2011). Forebrain medial septum region facilitates nociception in a rat formalin model of inflammatory pain. *Pain*, 152, 2528-2542.
- Li, Y., Wu, T., Zhu, J., Wan, L., Yu, Q., Li, X., Cheng, Z., Guo, C. (2010). Combinative method using HPLC fingerprint and quantitative analyses for quality consistency evaluation of an herbal medicinal preparation produced by different manufacturers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52(4), 597-602. DOI: 10.1016/j.jpba.2010.01.018.
- Lin, Y., Shi, R., Wang, X., Shen, H.-M. (2008). Luteolin, a flavonoid with potentials for cancer prevention and therapy. *Current Cancer Drug Targets*, 8(7), 634-646.
- Lorke, D. (1983). A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of Toxicology*, 54, 275-287.

- Lu, G. H., Chang, K., Liang, Y. Z., Leung, K. S., Chan, C. L., Jiang, Z. H. (2005). Development of high performance liquid chromatographic fingerprints for distinguishing of Chinese angelica from related Umbelliferae herbs. *Journal of Chromatography, A 1073*, 383-392.
- Mahamudur, I. (2014). Ultra-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and its application toward determination of lactose content in milk. En: M. Naushad., M. Rizwan Khan (Edits.), *Ultra-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (págs. 389-410). New York: CRC Press.
- Mansour, S., Djebli, N., Ozcan, E. E., Mat, A. (2014). *In vivo* antiinflammatory activity and chemical composition of *Hypericum scabriodes*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(Supl 1), S514-S520.
- Martínez-González, C. L., Martínez, L., Martínez-Ortíz, E. J., González-Trujano, M. E., Déciga-Campos, M., Ventura-Martínez, R., Díaz-Reval, I. (2017). Moringa oleifera, a species with potential analgesic and anti-inflammatory activities. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 87, 482-488.
- Merfort, I. (2011). Perspectives on Sesquiterpene Lactones in Inflammation. *Current Cancer Drug Targets*, 12, 1560-1573.
- Miller, G. O. (1991). *Landscaping with Native Plants of Texas* (2da ed.). Minneapolis, USA: Voyageur Press.
- Miller, N. E. (1985). The value of behavioral research on animals. *American Psychological*, 40, 423-440.
- Motawe, H. M., Wahba, H. E., Ibrahim, A. H. (2015). Biological Studies of Flavonoids from Flowers and Herb of *Zinnia pauciflora* plant L. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3(6), 1076-1082.
- NIH. National Institutes of Health. The National Academies. (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (8va ed.). Washington, D.C: The National Academies Press.

- Norma Oficial Mexicana. (1999). NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. México.
- Nováková, L., Matysová, L., Solich, P. (2006). Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta*, 68(3), 908-18. DOI: 10.1016/j.talanta.2005.06.035.
- OMS. (2013). *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023*. Ginebra: Organización Mundial de la Salud. Obtenido de <http://www.who.int/iris/handle/10665/95008>
- Ortega, A., Maldonado, E. (1982). A sesquiterpene d-lactone from *Zinnia juniperifolia*. *Phytochemistry*, 21(3), 785-786.
- Ortega, A., Maldonado, E. (1985). Elemanolides from *Zinnia flavicoma*. *Phytochemistry*, 24(11), 2635-2639.
- Ortega, A., Roca, A., Micó, J. (2002). Modelos animales de dolor. Una visión crítica. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 9, 447-453.
- Ortega, A., Romo de Vivar, A., Toscano, R. A., Maldonado, E. (1983). New Elemanolides from *Zinnia* Species: Structural revision of the zinnolides. *Chemistry Letters*, 1607-1610.
- Ortega, A., Vázquez, A., Gaviño, R., Maldonado, E. (1995). An elemanolide from *Zinnia citrea*. *Phytochemistry*, 39(6), 1479-1481.
- Panthong, A., Kanjanapothi, D., Tuntiwachwuttikul, P., Pancharoen, O., Reutrakul, V. (1994). Antiinflammatory activity of flavonoids. *Phytomedicine*, 1, 141-144.
- Prince, D. D. (1999). *Psychological Mechanisms of pain and Analgesia (Progress in pain and research management)* (Vol. 15). Seattle: International Association for the Study of Pain.
- Rabelo, A., Oliveira, I., Guimaraes, A., Quintans, J., Prata, A., Gelain, D., Araújo, A. (2013). Antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant activities of aqueous extract from *Remirea maritima* (Cyperaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 145, 11-17.

- Ramos, V. C., Sanz-Rosa, D., de las Heras Jiménez, N., Cediél Gil, E., Miana Ortega, M., & Lahera Juliá, V. (2004). Inflamación, disfunción endotelial e hipertensión arterial. *Hipertensión*, 21(7), 347-354.
- Rather, M. A., Bhat, B. A., Qurishi, M. A. (2013) Multicomponent phytotherapeutic approach gaining momentum: Is the “one drug to fit all” model braking down?. *Phytomedicine*, 21, 1-14.
- Redonda-Martínez, R., Villaseñor-Ríos, J. L. (2011). Fascículo 89. Asteraceae. En: *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán* (págs. 1-64). México, D.F.: Departamento de Botánica, Instituto de Biología, UNAM.
- Romera, E., Perena, M., Perena, M., Rodrigo, M. (2000). Neurofisiología del dolor. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 7(2), 11-17.
- Rose, J.N. (1899). Notes on useful plants of México. *Contributions from the United States National Herbarium*, 5(4): 209-259.
- OMS. (2013). *Organización mundial de la Salud*. [en línea] Recuperado el 8 de febrero de 2018, de <http://apps.who.int/iris/handle/10665/95008?locale=es>
- Stafleu, F. A., Cowan, R. (1988). *Taxonomic literature: a selective guide to botanical publications and collections with dates, commentaries and types*. (2ª ed.). Utrech: Bohn, Scheltema y Hokelma.
- Stevenson, M. C. (1915). *Ethnobotany of the Zuni Indians*. Washington, DC: 30th Anual Report of the Bureau of American Ethnology, 1908-1909, U.S. Government Printing Office.
- Surcheva, S., Todorova, L., Maslarov, D., Vlaskovska, M. (2017). Preclinic and clinic effectiveness of gabapentin and pregabalin for treatment of neuropathic pain in rats and diabetic patients, *Biotechnology and Biotechnological equipment*, 31(3): 568-573.
- Swank, G. R. (1932). The Ethnobotany of the Acoma and Laguna Indians. [en línea] Recuperado el 21 de enero de 2018, de Department of Biology at UNM: http://digitalrepository.unm.edu/biol_etds/212.

- Tallarida, R. J. (2000). *Drug Synergism and Dose-Effect Data Analysis*. USA: Chapman and Hall/CRC.
- Tistaert, C., Dejaegher, B., Vander Heyden, I. (2011). Chromatographic separation techniques and data handling methods form herbal fingerprints: A review. *Analytica Chimica Acta, Issue 690*, 148-161.
- Tjolsen, A., Berge, O.-G., Hunskaar, S., Rosland, J. H., Hole, K. (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, 51, 5-17.
- Torres, A. M. (1963). Taxonomy of *Zinnia*. *Brittonia*, 15, 1-25.
- Vestal, P. A. (1952). The Ethnobotany of the Ramah Navaho. *Papers of the Peabody Museum of American Archaeology and Ethnology*, 40(4), 54.
- Vierck, C. J. (2006). Modelos animales del dolor. En: S. B. McMahon & M. Koltzenburg (Edits.), *Wally Melzack: Tratado del dolor*. (5ta ed., págs. 177-187). España: Elsevier.
- Wagner, H., Ulrich-Merzenich, G. (2009). Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 16, 97-110.
- Winter, C. A., Risley, E. A., Nuss, G. W. (1962). Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 111, 544. DOI: 10.3181/00379727-111-27849
- Wen, XD., Liu, EH., Yang, J., Li, CY., Gao, W., Qi, LW., Wang, CZ., Yuan, CS., Li, P. (2012). Identification of metabolites of Buyang Huanwu Decoction in rat urine using liquid chromatography-quadupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 67-68, 114-122. DOI: 10.1016/j.jpba.2012.04.026.
- Yamaguchi, M., Terehara, N., Shizukuishi, K. (1990). Acetylated Anthocyanins in *Zinnia elegans* flowers. *Phytochemistry*, 29(4), 1269-1270.
- Yang, S., Yang, A., Su, S., Wang, H., Wang, N., Chen, Q. (2012). Neuronostatin induces hyperalgesia in formalin test in mice. *Neuroscience Letters*, 506, 126-130.

REFERENCIAS

- Zoghbi, M., Andrade, E. H., Carreira, L. M., Mala, J. G. (2000) Volatile Constituents of the Flowers of *Wulffia baccata* (L.f.) Kuntze and *Zinnia elegans* Jacq. (Asteraceae). *Journal of Essential Oil Research*, 12, 415-417. DOI: 10.1080/10412905.2000.9699552
- Zingg, Robert M. (1932). Mexican folk remedies of Chihuahua. *Journal of the Washington Academy of Sciences*, 22(7), 174-181.

ANEXOS

Anexo 1: Datos cristalográficos de la Zinagrndinólida D (2)

Tabla A1. Datos Cristalográficos y refinamiento para la Zinagrndinólida D

Fórmula empírica	$C_{24}H_{32}O_9$
Peso molecular	464.49
Temperatura	298(2) K
Longitud de onda	1.54178 Å
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	$P2_1$
Dimensiones de celda unitaria	$a = 7.1503(2)$ Å $\alpha = 90^\circ$ $b = 11.1722(3)$ Å $\beta = 90.5142(13)^\circ$ $c = 15.5816(4)$ Å $\gamma = 90^\circ$
Volumen	$1244.68(6)$ Å ³
Z	2
Densidad (calculada)	1.239 Mg/m ³
Coefficiente de absorción	0.790 mm ⁻¹
F(000)	496
Tamaño del cristal	0.285 x 0.132 x 0.100 mm ³
Rango theta para colección de datos	2.836 to 68.345°.
Rangos de índice	-8 ≤ h ≤ 8, -13 ≤ k ≤ 13, -18 ≤ l ≤ 17
Reflecciones colectadas	14134
Reflecciones independientes	4529 [R(int) = 0.0436]
Integridad para theta = 67.679°	99.6 %
Corrección de absorción	Semi-empirical from equivalents
Transmisión max. y min.	0.7531 and 0.6817
Método de refinamiento	Full-matrix least-squares on F ²
Datos / restricciones / parámetros	4529 / 302 / 399
Ajuste en F ²	1.128
Índices R finales [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0808, wR2 = 0.2185
Índices R (todos los datos)	R1 = 0.0962, wR2 = 0.2302
Parámetro de estructura absoluta	0.3(2)
Coefficiente de extinción	n/a
Mayor diferencia pico y agujero	0.268 and -0.274 e.Å ⁻³
Nota: El éster isobutirato está desordenado y fue refinado en dos contribuciones mayores, utilizando un factor de sitio ocupacional variable	

Tabla A2. Coordenadas atómicas ($\times 10^4$) y parámetros de desplazamientos isotrópicos equivalentes ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para la zinagrandinólida D (2). U(eq) es un tercio de la traza del tensor ortogonalizado U_{ij}

	x	y	z	U(eq)
O(1)	6291(7)	4446(6)	9005(3)	57(1)
O(2)	3505(8)	3798(7)	8673(4)	82(2)
O(5)	4085(8)	7486(7)	7183(5)	82(2)
O(6)	5621(9)	9132(6)	6833(5)	84(2)
C(24)	4620(15)	3067(13)	7044(8)	109(4)
O(7)	8785(7)	2705(5)	8524(3)	62(1)
O(8)	10487(8)	1847(6)	7498(4)	72(2)
O(10)	7508(10)	5264(8)	3621(4)	98(2)
C(1)	8208(10)	4720(7)	8804(4)	52(2)
C(2)	8430(10)	6047(7)	8533(5)	54(2)
C(3)	7362(9)	6216(7)	7664(4)	50(2)
C(4)	7818(9)	5273(8)	6990(4)	54(2)
C(5)	7714(9)	3989(7)	7338(4)	51(2)
C(6)	8945(9)	3859(7)	8135(4)	52(2)
C(7)	5749(10)	3642(8)	7577(5)	60(2)
C(8)	5067(10)	3964(8)	8454(5)	60(2)
C(9)	10536(12)	6343(8)	8515(5)	64(2)
C(10)	7544(12)	6799(8)	9242(5)	64(2)
C(11)	5943(18)	7291(11)	9282(7)	101(3)
C(12)	7414(10)	7476(7)	7294(4)	54(2)
C(13)	8945(11)	8060(9)	7073(6)	72(2)
C(14)	5528(11)	8003(8)	7101(5)	58(2)
O(3)	9683(7)	5459(6)	6662(3)	61(1)
O(4)	8550(20)	5760(20)	5356(7)	87(5)
C(15)	9891(19)	5590(30)	5825(6)	83(3)
C(16)	11840(20)	5950(20)	5581(10)	93(4)
C(17)	11950(40)	7150(20)	5162(18)	114(6)
C(18)	12610(40)	5030(30)	5000(20)	119(6)

O(4A)	8690(20)	5140(20)	5336(6)	99(5)
C(15A)	9902(19)	5490(30)	5823(6)	84(3)
C(16A)	11910(20)	5610(20)	5561(9)	96(4)
C(17A)	12200(40)	6450(30)	4826(17)	120(6)
C(18A)	12610(40)	4410(30)	5334(18)	114(6)
C(19)	9612(11)	1778(8)	8145(5)	64(2)
C(20)	8988(14)	640(10)	8668(8)	69(2)
C(21)	10270(17)	-156(10)	8825(8)	74(3)
C(22)	12240(20)	-197(17)	8590(14)	89(5)
C(23)	6917(16)	569(12)	9002(10)	82(3)
C(20A)	9990(30)	590(20)	8669(19)	65(4)
C(21A)	8570(40)	140(20)	9072(18)	71(4)
C(22A)	8470(70)	-700(40)	9790(30)	126(12)
C(23A)	12040(40)	80(30)	8710(30)	70(7)

Tabla 3A. Longitudes de enlace [Å] y ángulos [°] para la zinagrandinólida D
(2)

O(1)-C(8)	1.334(10)	C(10)-C(11)	1.272(14)
O(1)-C(1)	1.442(8)	C(10)-H(10)	0.9300
O(2)-C(8)	1.185(9)	C(11)-H(11A)	0.9300
O(5)-C(14)	1.190(9)	C(11)-H(11B)	0.9300
O(6)-C(14)	1.331(10)	C(12)-C(13)	1.322(10)
O(6)-H(6A)	0.851(15)	C(12)-C(14)	1.500(10)
C(24)-C(7)	1.320(13)	C(13)-H(13A)	0.9300
C(24)-H(24D)	0.9300	C(13)-H(13B)	0.9300
C(24)-H(24E)	0.9300	O(3)-C(15A)	1.319(10)
O(7)-C(19)	1.333(9)	O(3)-C(15)	1.322(10)
O(7)-C(6)	1.429(8)	O(4)-C(15)	1.218(14)
O(8)-C(19)	1.195(9)	C(15)-C(16)	1.503(14)
O(10)-H(10E)	0.850(15)	C(16)-C(18)	1.47(2)
O(10)-H(10F)	0.850(15)	C(16)-C(17)	1.50(2)
C(1)-C(6)	1.516(10)	C(16)-H(16)	0.9800
C(1)-C(2)	1.549(10)	C(17)-H(17A)	0.9600
C(1)-H(1)	0.9800	C(17)-H(17B)	0.9600
C(2)-C(10)	1.530(10)	C(17)-H(17C)	0.9600
C(2)-C(9)	1.542(11)	C(18)-H(18A)	0.9600
C(2)-C(3)	1.560(10)	C(18)-H(18B)	0.9600
C(3)-C(12)	1.522(10)	C(18)-H(18C)	0.9600
C(3)-C(4)	1.525(10)	O(4A)-C(15A)	1.215(14)
C(3)-H(3)	0.9800	C(15A)-C(16A)	1.503(14)
C(4)-O(3)	1.447(8)	C(16A)-C(18A)	1.47(2)
C(4)-C(5)	1.535(10)	C(16A)-C(17A)	1.50(2)
C(4)-H(4)	0.9800	C(16A)-H(16A)	0.9800
C(5)-C(7)	1.508(10)	C(17A)-H(17D)	0.9600
C(5)-C(6)	1.523(10)	C(17A)-H(17E)	0.9600
C(5)-H(5)	0.9800	C(17A)-H(17F)	0.9600
C(6)-H(6)	0.9800	C(18A)-H(18D)	0.9600
C(7)-C(8)	1.498(11)	C(18A)-H(18E)	0.9600
C(9)-H(9A)	0.9600	C(18A)-H(18F)	0.9600
C(9)-H(9B)	0.9600	C(19)-C(20A)	1.575(15)
C(9)-H(9C)	0.9600	C(19)-C(20)	1.576(14)

C(20)-C(21)	1.299(14)	C(20A)-C(21A)	1.300(15)
C(20)-C(23)	1.576(15)	C(20A)-C(23A)	1.575(16)
C(21)-C(22)	1.46(2)	C(21A)-C(22A)	1.46(2)
C(21)-H(21)	0.9300	C(21A)-H(21A)	0.9300
C(22)-H(22A)	0.9600	C(22A)-H(22D)	0.9600
C(22)-H(22B)	0.9600	C(22A)-H(22E)	0.9600
C(22)-H(22C)	0.9600	C(22A)-H(22F)	0.9600
C(23)-H(23A)	0.9600	C(23A)-H(23D)	0.9600
C(23)-H(23B)	0.9600	C(23A)-H(23E)	0.9600
C(23)-H(23C)	0.9600	C(23A)-H(23F)	0.9600
C(8)-O(1)-C(1)	124.5(5)	O(3)-C(4)-C(5)	107.9(6)
C(14)-O(6)-H(6A)	92(8)	C(3)-C(4)-C(5)	113.0(5)
C(7)-C(24)-H(24D)	120.0	O(3)-C(4)-H(4)	108.5
C(7)-C(24)-H(24E)	120.0	C(3)-C(4)-H(4)	108.5
H(24D)-C(24)-H(24E)	120.0	C(5)-C(4)-H(4)	108.5
C(19)-O(7)-C(6)	118.4(6)	C(7)-C(5)-C(6)	107.9(6)
H(10E)-O(10)-H(10F)	110(3)	C(7)-C(5)-C(4)	112.1(6)
O(1)-C(1)-C(6)	110.6(5)	C(6)-C(5)-C(4)	110.3(5)
O(1)-C(1)-C(2)	111.3(6)	C(7)-C(5)-H(5)	108.8
C(6)-C(1)-C(2)	112.5(5)	C(6)-C(5)-H(5)	108.8
O(1)-C(1)-H(1)	107.4	C(4)-C(5)-H(5)	108.8
C(6)-C(1)-H(1)	107.4	O(7)-C(6)-C(1)	104.6(5)
C(2)-C(1)-H(1)	107.4	O(7)-C(6)-C(5)	112.6(6)
C(10)-C(2)-C(9)	107.8(6)	C(1)-C(6)-C(5)	107.3(5)
C(10)-C(2)-C(1)	106.6(6)	O(7)-C(6)-H(6)	110.7
C(9)-C(2)-C(1)	108.2(6)	C(1)-C(6)-H(6)	110.7
C(10)-C(2)-C(3)	111.0(6)	C(5)-C(6)-H(6)	110.7
C(9)-C(2)-C(3)	115.4(6)	C(24)-C(7)-C(8)	119.2(8)
C(1)-C(2)-C(3)	107.5(6)	C(24)-C(7)-C(5)	122.4(7)
C(12)-C(3)-C(4)	111.8(5)	C(8)-C(7)-C(5)	118.4(6)
C(12)-C(3)-C(2)	115.3(6)	O(2)-C(8)-O(1)	119.5(7)
C(4)-C(3)-C(2)	114.1(6)	O(2)-C(8)-C(7)	122.7(8)
C(12)-C(3)-H(3)	104.8	O(1)-C(8)-C(7)	117.8(6)
C(4)-C(3)-H(3)	104.8	C(2)-C(9)-H(9A)	109.5

C(2)-C(9)-H(9C)	109.5	C(16)-C(18)-H(18B)	109.5
H(9A)-C(9)-H(9C)	109.5	H(18A)-C(18)-H(18B)	109.5
H(9B)-C(9)-H(9C)	109.5	C(16)-C(18)-H(18C)	109.5
C(11)-C(10)-C(2)	130.6(9)	H(18A)-C(18)-H(18C)	109.5
C(11)-C(10)-H(10)	114.7	H(18B)-C(18)-H(18C)	109.5
C(2)-C(10)-H(10)	114.7	O(4A)-C(15A)-O(3)	121.2(10)
C(10)-C(11)-H(11A)	120.0	O(4A)-C(15A)-C(16A)	122.5(11)
C(10)-C(11)-H(11B)	120.0	O(3)-C(15A)-C(16A)	113.2(9)
H(11A)-C(11)-H(11B)	120.0	C(18A)-C(16A)-C(17A)	109.6(15)
C(13)-C(12)-C(14)	120.0(7)	C(18A)-C(16A)-C(15A)	108.7(13)
C(13)-C(12)-C(3)	125.3(7)	C(17A)-C(16A)-C(15A)	113.5(13)
C(14)-C(12)-C(3)	114.4(6)	C(18A)-C(16A)-H(16A)	108.3
C(12)-C(13)-H(13A)	120.0	C(17A)-C(16A)-H(16A)	108.3
C(12)-C(13)-H(13B)	120.0	C(15A)-C(16A)-H(16A)	108.3
H(13A)-C(13)-H(13B)	120.0	C(16A)-C(17A)-H(17D)	109.5
O(5)-C(14)-O(6)	122.7(7)	C(16A)-C(17A)-H(17E)	109.5
O(5)-C(14)-C(12)	124.6(7)	H(17D)-C(17A)-H(17E)	109.5
O(6)-C(14)-C(12)	112.8(7)	C(16A)-C(17A)-H(17F)	109.5
C(15A)-O(3)-C(4)	118.2(7)	H(17D)-C(17A)-H(17F)	109.5
C(15)-O(3)-C(4)	118.5(7)	H(17E)-C(17A)-H(17F)	109.5
O(4)-C(15)-O(3)	120.9(10)	C(16A)-C(18A)-H(18D)	109.5
O(4)-C(15)-C(16)	122.3(11)	C(16A)-C(18A)-H(18E)	109.5
O(3)-C(15)-C(16)	113.0(9)	H(18D)-C(18A)-H(18E)	109.5
C(18)-C(16)-C(17)	109.6(15)	C(16A)-C(18A)-H(18F)	109.5
C(18)-C(16)-C(15)	108.8(13)	H(18D)-C(18A)-H(18F)	109.5
C(17)-C(16)-C(15)	113.7(13)	H(18E)-C(18A)-H(18F)	109.5
C(18)-C(16)-H(16)	108.2	O(8)-C(19)-O(7)	124.1(8)
C(17)-C(16)-H(16)	108.2	O(8)-C(19)-C(20A)	113.8(11)
C(15)-C(16)-H(16)	108.2	O(7)-C(19)-C(20A)	119.8(12)
C(16)-C(17)-H(17A)	109.5	O(8)-C(19)-C(20)	129.9(8)
C(16)-C(17)-H(17B)	109.5	O(7)-C(19)-C(20)	105.6(7)
H(17A)-C(17)-H(17B)	109.5	C(21)-C(20)-C(23)	124.6(10)

C(16)-C(17)-H(17C)	109.5	C(21)-C(20)-C(19)	116.5(8)
H(17A)-C(17)-H(17C)	109.5	C(23)-C(20)-C(19)	118.9(8)
H(17B)-C(17)-H(17C)	109.5	C(20)-C(21)-C(22)	131.0(12)
C(16)-C(18)-H(18A)	109.5	C(20)-C(21)-H(21)	114.5
C(22)-C(21)-H(21)	114.5	C(20A)-C(21A)-C(22A)	131.5(15)
C(21)-C(22)-H(22A)	109.5	C(20A)-C(21A)-H(21A)	114.2
C(21)-C(22)-H(22B)	109.5	C(22A)-C(21A)-H(21A)	114.2
H(22A)-C(22)-H(22B)	109.5	C(21A)-C(22A)-H(22D)	109.5
C(21)-C(22)-H(22C)	109.5	C(21A)-C(22A)-H(22E)	109.5
H(22A)-C(22)-H(22C)	109.5	H(22D)-C(22A)-H(22E)	109.5
H(22B)-C(22)-H(22C)	109.5	C(21A)-C(22A)-H(22F)	109.5
C(20)-C(23)-H(23A)	109.5	H(22D)-C(22A)-H(22F)	109.5
C(20)-C(23)-H(23B)	109.5	H(22E)-C(22A)-H(22F)	109.5
H(23A)-C(23)-H(23B)	109.5	C(20A)-C(23A)-H(23D)	109.5
C(20)-C(23)-H(23C)	109.5	C(20A)-C(23A)-H(23E)	109.5
H(23A)-C(23)-H(23C)	109.5	H(23D)-C(23A)-H(23E)	109.5
H(23B)-C(23)-H(23C)	109.5	C(20A)-C(23A)-H(23F)	109.5
C(21A)-C(20A)-C(19)	116.4(9)	H(23D)-C(23A)-H(23F)	109.5
C(21A)-C(20A)-C(23A)	124.6(11)	H(23E)-C(23A)-H(23F)	109.5
C(19)-C(20A)-C(23A)	118.9(10)		

Tabla 4A. Parámetros de desplazamiento anisotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para la xinagrandinólida D (2). El exponente del factor de desplazamiento anisotrópico tiene la forma : $-2p^2 [h^2 a^*2U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$

	U11	U22	U33	U23	U13	U12
O(1)	59(3)	62(3)	50(2)	4(2)	11(2)	-2(2)
O(2)	55(3)	109(5)	84(4)	2(3)	19(3)	-4(3)
O(5)	55(3)	82(4)	110(5)	17(4)	-2(3)	4(3)
O(6)	72(4)	71(4)	108(5)	33(3)	7(3)	13(3)
C(24)	82(7)	145(11)	100(7)	-36(7)	21(6)	-44(7)
O(7)	74(3)	45(3)	67(3)	4(2)	11(2)	4(2)
O(8)	68(3)	62(3)	86(4)	-4(3)	13(3)	8(3)
O(10)	117(5)	108(5)	68(4)	5(4)	-6(3)	-55(4)
C(1)	51(4)	54(4)	50(4)	1(3)	2(3)	0(3)
C(2)	56(4)	53(4)	53(4)	-3(3)	3(3)	-1(3)
C(3)	50(4)	53(4)	48(3)	7(3)	8(3)	2(3)
C(4)	51(4)	66(4)	45(3)	4(3)	7(3)	-2(3)
C(5)	50(4)	53(4)	51(4)	-8(3)	8(3)	0(3)
C(6)	51(4)	49(4)	58(4)	6(3)	8(3)	-1(3)
C(7)	56(4)	66(5)	58(4)	-3(4)	2(3)	-4(3)
C(8)	51(4)	63(4)	68(4)	8(4)	12(3)	6(3)
C(9)	68(5)	62(5)	63(5)	8(4)	-5(4)	-5(4)
C(10)	83(5)	49(4)	61(4)	1(3)	12(4)	7(4)
C(11)	136(10)	90(7)	77(6)	-8(5)	35(6)	9(7)
C(12)	60(4)	51(4)	52(4)	7(3)	3(3)	1(3)
C(13)	65(5)	62(5)	88(6)	27(4)	6(4)	1(4)
C(14)	64(5)	62(5)	48(4)	2(3)	6(3)	5(4)
O(3)	56(3)	77(3)	52(2)	0(2)	10(2)	-4(2)
O(4)	102(7)	113(13)	47(6)	-11(7)	-2(5)	-26(9)
C(15)	83(5)	112(8)	54(5)	-7(6)	16(4)	-23(6)
C(16)	91(6)	125(9)	64(6)	-10(6)	30(5)	-24(7)
C(17)	124(13)	128(11)	91(12)	-7(10)	51(11)	-34(11)
C(18)	109(11)	141(12)	107(13)	-19(11)	44(10)	-8(12)
O(4A)	105(7)	135(14)	57(6)	-30(7)	14(5)	-39(9)
C(15A)	85(5)	112(7)	55(5)	-9(6)	17(4)	-27(6)
C(16A)	94(5)	130(9)	65(6)	-13(6)	32(5)	-27(7)

C(17A)	127(12)	131(13)	103(11)	9(9)	53(10)	-18(11)
C(18A)	113(11)	142(11)	88(12)	14(10)	27(10)	10(11)
C(19)	71(4)	51(4)	69(4)	-8(3)	-2(3)	1(3)
C(20)	71(5)	56(5)	80(6)	-8(4)	0(5)	7(4)
C(21)	83(5)	55(5)	85(6)	-11(4)	4(5)	12(4)
C(22)	85(6)	86(11)	96(10)	-22(10)	9(7)	22(6)
C(23)	64(5)	70(7)	110(9)	20(6)	-2(5)	-11(5)
C(20A)	72(7)	47(7)	77(7)	-12(6)	3(7)	13(6)
C(21A)	75(7)	55(8)	82(8)	-3(6)	4(7)	7(7)
C(22A)	150(30)	110(20)	110(20)	32(15)	22(19)	10(20)
C(23A)	82(9)	59(14)	69(14)	-33(12)	15(11)	29(9)

Tabla A5. Coordenadas de hidrógeno ($\times 10^4$) y parámetros de desplazamiento isotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para la zinagrandinólida D

	x	y	z	U(eq)
H(6A)	4440(30)	9180(110)	6790(70)	101
H(24D)	3416	2866	7214	131
H(24E)	5027	2863	6498	131
H(10E)	8090(130)	5250(120)	4100(30)	117
H(10F)	8180(120)	4940(110)	3240(40)	117
H(1)	8951	4603	9329	62
H(3)	6044	6078	7802	61
H(4)	6922	5351	6514	65
H(5)	8161	3437	6896	61
H(6)	10253	4038	8002	63
H(9A)	11072	6024	8001	97
H(9B)	11144	5995	9006	97
H(9C)	10702	7196	8525	97
H(10)	8301	6916	9723	77
H(11A)	5101	7216	8827	121
H(11B)	5613	7725	9767	121
H(13A)	8851	8797	6798	86
H(13B)	10115	7733	7192	86
H(16)	12613	5964	6104	112
H(17A)	11270	7723	5497	171
H(17B)	11415	7107	4596	171
H(17C)	13235	7394	5126	171
H(18A)	11941	5054	4467	178
H(18B)	12474	4258	5260	178
H(18C)	13908	5195	4908	178
H(16A)	12636	5901	6055	115
H(17D)	13454	6759	4848	180
H(17E)	11327	7099	4863	180
H(17F)	12010	6030	4294	180
H(18D)	11768	4045	4932	171
H(18E)	12709	3931	5841	171
H(18F)	13826	4489	5078	171
H(21)	9864	-811	9140	89

H(22A)	12349	-408	7995	134
H(22B)	12879	-784	8936	134
H(22C)	12802	574	8685	134
H(23A)	6747	-164	9313	122
H(23B)	6065	591	8522	122
H(23C)	6677	1236	9373	122
H(21A)	7413	405	8871	85
H(22D)	9074	-1436	9628	188
H(22E)	7185	-856	9917	188
H(22F)	9090	-367	10279	188
H(23D)	12009	-764	8583	105
H(23E)	12555	201	9271	105
H(23F)	12797	480	8293	105

Tabla 6A. Enlaces de hidrógeno para la zinagrandinólida D (2) [Å and °]

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A) <(DHA)
O(10)-H(10F)...O(8)#1	0.850(15)	2.60(13)	2.876(9) 100(10)
O(6)-H(6A)...O(10)#2	0.851(15)	1.95(8)	2.661(9) 140(11)
O(10)-H(10E)...O(4)	0.850(15)	2.06(5)	2.852(13) 154(9)
O(10)-H(10E)...O(4A)	0.850(15)	1.97(3)	2.798(12) 163(10)

Transformaciones de simetría usadas para generar los átomos equivalentes: #1 - $x+2, y+1/2, -z+1$ #2 - $-x+1, y+1/2, -z+1$

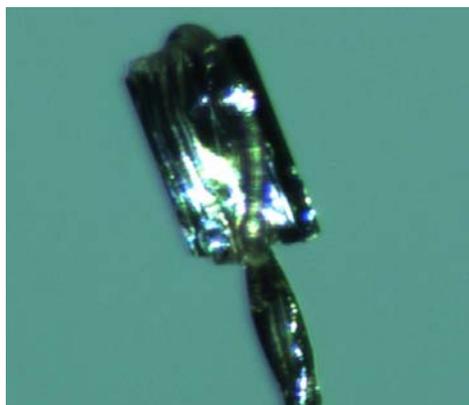


Figura 1A. Imagen al microscopio de un cristal de la zinagrandinólida D (2)

Anexo 2: Espectros de masas de alta resolución de las zinagrandinólidas D-F (2-4).

Modo de ionización: ESI +

INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM
LABORATORIO DE ESPECTROMETRIA DE MASAS

Data:59 STE-7579 RM115D2

Sample Name:Dra Rachel Mata/ Operador: Carmen Garcia-Javier Perez

Description:

Ionization Mode:ESI+

History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[1.0%];Correct Base[5.0%];Average(MS[1] 1.5...

Acquired:3/15/2018 4:13:30 PM

Operator:AccuTOF

Mass Calibration data:Cal Peg 600

Created:3/20/2018 5:03:47 PM

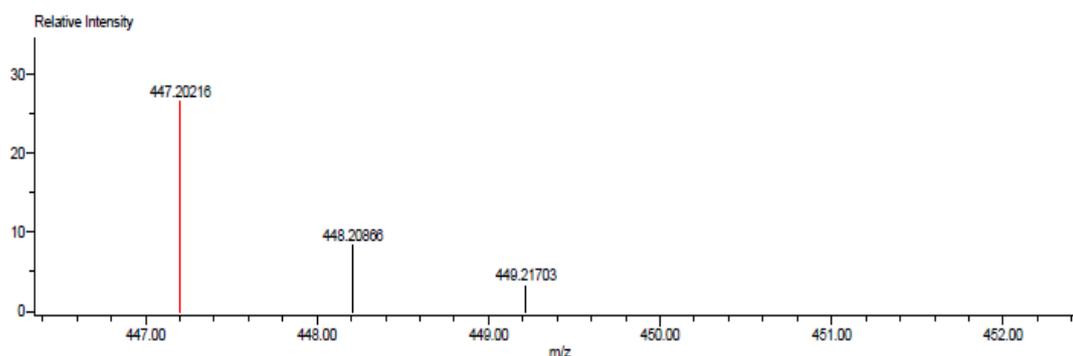
Created by:

Charge number:1

Tolerance:2.00(mmu)

Unsaturation Number:0.0 .. 50.0 (Fraction:Both)

Element:¹²C:0 .. 24, ¹H:0 .. 35, ¹⁶O:0 .. 8



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
447.20216	38190.81	447.20189	0.27	0.61	¹² C ₂₄ ¹ H ₃₁ ¹⁶ O ₈	9.5

Figura 2A. Espectro de masas de alta resolución de la zinagrandinólida D (2). Modo de ionización:

ESI +

INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM
LABORATORIO DE ESPECTROMETRIA DE MASAS

Data:60 STE-7580 RM115D3

Sample Name:Dra Rachel Mata/ Operador: Carmen Garcia-Javier Perez

Description:

Ionization Mode:ESI+

History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[1.0%];Correct Base[5.0%];Average(MS[1] 1.5...

Acquired:3/15/2018 4:09:26 PM

Operator:AccuTOF

Mass Calibration data:Cal Peg 600

Created:3/20/2018 5:14:47 PM

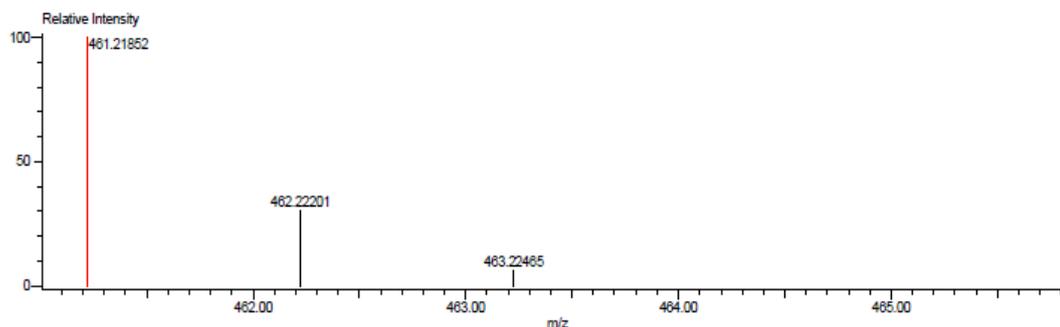
Created by:

Charge number:1

Tolerance:2.00(mmu)

Unsaturation Number:0.0 .. 50.0 (Fraction:Both)

Element:¹²C:0 .. 25, ¹H:0 .. 35, ¹⁶O:0 .. 8



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
461.21852	111874.60	461.21754	0.98	2.12	¹² C ₂₅ ¹ H ₃₃ ¹⁶ O ₈	9.5

Figura 2B. Espectro de masas de alta resolución de la zinagrandinólida E (3). Modo de ionización:

ESI +

INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM
LABORATORIO DE ESPECTROMETRIA DE MASAS

Data: 61 STE-7581 RM115D4

Sample Name: Dra Rachel Mata/ Operador: Carmen Garcia-Javier Perez

Description:

Ionization Mode: ESI+

History: Determine m/z/Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[1.0%];Correct Base[5.0%];Average(MS[1]) 0.2...

Acquired: 3/15/2018 4:16:33 PM

Operator: AccuTOF

Mass Calibration data: Cal Peg 800

Created: 3/20/2018 5:21:22 PM

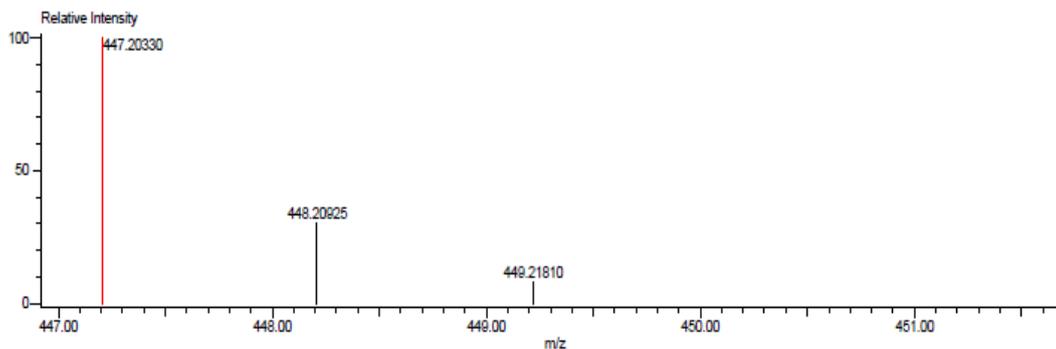
Created by:

Charge number: 1

Tolerance: 2.00(mmu)

Unsaturation Number: 0.0 .. 50.0 (Fraction: Both)

Element: ¹²C: 0 .. 25, ¹H: 0 .. 35, ¹⁶O: 0 .. 8



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
447.20330	144732.00	447.20189	1.41	3.16	¹² C ₂₄ ¹ H ₃₁ ¹⁶ O ₈	9.5

Figura 2C. Espectro de masas de alta resolución de la zinagrandinólida F (4). Modo de ionización: ESI +