



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

***Zinnia grandiflora* (Asteraceae): una fuente potencial de agentes  
antidiabéticos, analgésicos y antiinflamatorios. La goma de  
Sonora: una contribución al estudio de su composición química.**

**T E S I S  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**M. en C. Valeria Itzel Reyes Pérez**

**DRA. RACHEL MATA ESSAYAG  
FACULTAD DE QUÍMICA**

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Agosto 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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**

<b>PRESIDENTE</b>	Dr. José Pedraza Chaverri
<b>VOCAL</b>	Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas
<b>VOCAL</b>	Dr. Andrés Navarrete Castro
<b>VOCAL</b>	Dr. Sol Cristians Nizawa
<b>SECRETARIO</b>	Dr. José Alberto Rivera Chávez

### **Lugar donde se realizó el trabajo de tesis:**

Laboratorio 124, Conjunto E, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM

### **Presentaciones en congresos:**

- Asistencia y participación al 57th Annual Meeting of the Phytochemical Society of North America del 4 al 8 de agosto de 2018.
- Asistencia y participación en la 17<sup>a</sup> Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales del 18 al 20 de mayo de 2022.

### **Publicación:**

- Reyes-Pérez, Valeria; Granados-Soto, Vinicio; Rangel-Grimaldo, Manuel; Déciga-Campos, Myrna; Mata, Rachel. (2021). Pharmacological Analysis of the Anti-inflammatory and Antiallodynic Effects of Zinagrandinolide E from *Zinnia grandiflora* in Mice *Journal of Natural Products*, 84, 3, 713-723.

---

M. en C. Valeria Itzel Reyes Pérez

Sustentante

---

Dra. Rachel Mata Essayag

Tutora

## DEDICATORIAS

---

*“La posesión del conocimiento, si no va acompañada por una manifestación y expresión en la práctica y en la obra, es lo mismo que el enterrar metales preciosos: una cosa vana e inútil. El conocimiento, lo mismo que la fortuna, deben emplearse.”*

*Hermes Trimegisto*

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. A mis hermanas, Katia y Mariana. Y a mis sobrinos, Derek, Max y León. Los amo por siempre.

Y a todas las personas que me han apoyado y demostrado su cariño de una u otra forma, las que estuvieron y las que están. Muchas gracias.

## 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 desenvolverme como profesionista e investigadora.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de Doctorado (CVU 769727).

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 y cariño. Muchas gracias por todo.

Al Dr. Robert Arthur Bye Boettler y a la M. en C. Edelmira Linares por su colaboración y aportaciones a los estudios etnobotánicos del material vegetal y la laca utilizados para la realización de este trabajo.

A la Dra. Araceli Pérez Vásquez, por su importante asesoría técnica, paciencia y apoyo incondicional en el laboratorio. Y por su valiosa amistad.

A la Dra. Isabel Rivero Cruz por la asesoría técnica y por su importante labor para que el trabajo de laboratorio se cumpla cabalmente. También por su amistad y por tener siempre oídos y consejos para todos.

A la Dra. Myrna Déciga Campos por su valiosa asesoría en el trabajo farmacológico, y por sus aportaciones en general a este trabajo de investigación.

Al Dr. José Alberto Rivera por la retroalimentación siempre valiosa en el trabajo experimental.

Al personal de la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII) de la Facultad de Química: a la Maestra Jessica Amacosta Castillo por su apoyo en la realización de los análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, a la Q. Marisela Gutiérrez Franco por los análisis de infrarrojo, a las M. en C. Rosa Isela del Villar Morales y Nayeli López Balbiaux por el registro de los espectros de RMN.

A los miembros del jurado por sus valiosas aportaciones y comentarios, las cuales enriquecieron el presente trabajo.

Al CONACYT y a DGAPA-UNAM por el financiamiento requerido para realizar la presente investigación a través de los proyectos CONACYT A1-5-11226 y DGAPA-PAPIIT-IN217.

# RESUMEN

---

## CAPÍTULO I

*Zinnia grandiflora* Nuttall (Asteraceae) se valora en el norte de México y el suroeste de los Estados Unidos para el alivio del dolor y la diabetes. La infusión de la planta ha demostrado actividades antinociceptivas y antiinflamatorias en la prueba de formalina y en el modelo de carragenina, respectivamente. Asimismo, la zinagrandinólida E (ZGE), abundante en la infusión, demostró efecto antinociceptivo en el modelo de la formalina en ratones (Reyes-Pérez et al., 2019). En este trabajo, reportamos la acción antiinflamatoria y antialodínica de la ZGE, en el modelo de inflamación y alodinia táctil inducida por carragenina en ratones, en estados de inflamación aguda y crónica; así como la actividad antialodínica en un modelo de neuropatía diabética inducida por estreptozotocina. En conjunto, los resultados en ambos modelos sugieren que la ZGE es eficaz para tratar la inflamación en procesos agudos, además, presenta actividad para tratar y prevenir el dolor inflamatorio agudo y crónico; también, tiene potencial para el tratamiento del dolor neuropático. Las actividades antiinflamatorias y antialodínicas de este compuesto son polivalentes, involucrando las vías de señalización opioidérgicas, serotoninérgicas, GABAérgicas y la cascada de ON-GMPc canales de K<sup>+</sup> sensibles a ATP. Los estudios *in silico* revelaron que la ZGE se une a los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1B</sub>, a los receptores opioides  $\mu$ ,  $\kappa$  y  $\delta$ , y al receptor GABA<sub>A</sub>, todos ellos implicados en la modulación del dolor.

Se utilizaron las técnicas hidrodestilación y microextracción en fase sólida en espacio de cabeza (MEFS-EC) para obtener el aceite esencial de *Z. grandiflora* (AE) y los compuestos orgánicos volátiles de la infusión, respectivamente, para establecer la contribución del volatiloма al efecto farmacológico de la planta. Los análisis de CG-EM del AE y las fibras de MEFS

revelaron que el germacreno D (13.24%) y la desmetilisoencecalina (DME) (13.24%) son los compuestos más abundantes. Se estudiaron los efectos sobre la inflamación, la alodinia y el dolor neuropático en ratones del AE y la DME. El AE fue ligeramente eficaz en el modelo de carragenina, reduciendo la inflamación y la alodinia en ratones.

Adicionalmente, se estableció la eficacia preclínica de la infusión de *Z. grandiflora* para el tratamiento de la diabetes. Se realizó una prueba de hipoglucemia aguda utilizando ratones normoglucémicos e hiperglucémicos inducidos con estreptozotocina (STZ). Esta prueba reveló que el extracto acuoso (EA) (31,6–562,3 mg/kg, i.g.) tiene un efecto hipoglucemiante en ratones diabéticos, pero no en ratones normoglucémicos. Por otro lado, se comprobó la acción antihiperglucemiante realizando una prueba de tolerancia oral a la sacarosa (PTOS), en la que se evidenció la disminución del pico posprandial de glucosa en ratones normales e hiperglucémicos. Posteriormente se realizaron ensayos *in vitro* contra las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas de *Saccharomyces cerevisiae* para establecer una posible relación con el efecto antihiperglucémico observado en con la PTOS. Estos ensayos revelaron el efecto inhibitorio sobre  $\alpha$ -glucosidasas de la infusión, fracciones orgánicas de la infusión (AcOEt y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), las zinagrandinólidas E y F, y la DME. Los estudios de acoplamiento molecular revelaron que tanto las zinagrandinólidas D-F como la DME, se unen a la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de levadura (pdb 3A4A) en sitios alostéricos. Los parámetros fisicoquímicos, farmacocinéticos, toxicológicos y bioquímicos de las moléculas aisladas se analizaron mediante los programas Swiss ADME, Osiris Property Explorer y MolInspiration, para establecer su similitud a fármacos aprobados.

Finalmente, con fines de control de calidad, se desarrolló y validó un método exacto, preciso y lineal para cuantificar la zinagrandinólida E en la droga cruda de *Z. grandiflora* de acuerdo con los protocolos de la ICH (2005).

Este método será de utilidad para los procesos de control de calidad de la droga cruda.

## CAPÍTULO II

La goma de Sonora o arí es un exudado producido por el cóccido *Tachardiella fulgens*, huésped del árbol *Coursetia glandulosa* (Fabaceae). Este exudado, además de un condimento, es un agente medicinal, utilizado como gastroprotector y para el tratamiento de la diabetes, en los estados de Chihuahua y Sonora, principalmente (Cockerell, 1985; Bye y Linares, 2018).

Mediante técnicas cromatográficas se logró aislar y purificar dos compuestos mayoritarios del extracto acetónico de la droga cruda: el ácido 7-hidroxihexadecanoico (1) y la emodina (2). A partir de una revisión de la actividad farmacológica de estos compuestos, se encontró que la emodina cuenta con múltiples estudios sobre su efecto antidiabético actuando sobre diversos blancos moleculares. Las propiedades de este compuesto mayoritario pueden justificar en parte las propiedades medicinales atribuidas a este exudado.

Utilizando CG-EM se logró también la identificación 19 compuestos en diversas fracciones del extracto acetónico, en su mayoría ácidos grasos, aldehídos y alcanos de cadenas largas. En un análisis mediante la técnica de microextracción en fase sólida (MEFS) se obtuvieron los volátiles de la laca, y utilizando CG-EM 16 compuestos se identificaron; los mayoritarios fueron la  $\gamma$ -vinil- $\gamma$ -valerolactona, aldehído lila,  $\alpha$ -curcumeno, nerolidol y el tridecil acrilato. En total, se identificaron 36 compuestos sentando un precedente sobre la composición química de la goma de Sonora.

# ABSTRACT

---

## CHAPTER I

*Zinnia grandiflora* Nuttall (Asteraceae) is valued in northern Mexico and the southwestern United States for pain relief and diabetes. The infusion of the plant has shown antinociceptive and anti-inflammatory activities in the formalin test and in the carrageenan model, respectively. Also, zinagrandinolide E (ZGE), abundant in the infusion, demonstrated antinociceptive effect in the formalin model in mice (Reyes-Pérez *et al.*, 2019). Herein, we report the anti-inflammatory and anti-allodynic action of ZGE, in the carrageenan-induced inflammation and tactile allodynia model in mice, both in acute and chronic inflammation states. The results suggest that ZGE is effective for treating and preventing inflammatory pain and has the potential for healing neuropathic pain. It was also demonstrated that the anti-inflammatory and anti-allodynic activities of ZGE are multitarget, involving opioidergic, serotonergic, GABAergic, and the NO-cGMP-ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels signaling pathways. The *in-silico* studies revealed that ZGE binds to 5-HT<sub>1B</sub> serotonergic receptors, to the opioid receptors  $\mu$ ,  $\kappa$ , and  $\delta$ , and to the GABA<sub>A</sub> receptor, all involved in the modulation of pain.

Hydrodistillation and headspace-solid phase micro-extraction (HS-SPME) techniques were used to obtain the volatiloma of *Zinnia grandiflora*. Both the essential oil (EOZ) and the extractives of the infusion were analyzed by GC-EM analysis. The overall analysis revealed that germacrene D (13.24%) and desmethylisoencecalin (DME) (13.24%) were the most abundant volatile compounds. The effects of EOZ and DME on inflammation, allodynia, and neuropathic pain in mice were also studied. EOZ was slightly effective in the carrageenan model, reducing inflammation and allodynia in mice.

When tested in an acute experiment, the infusion (AE) (31.6–562.3 mg/kg, i.g.) of *Z. grandiflora* revealed its hypoglycemic properties. The effect was observed only in STZ-hyperglycemic mice. During an oral sucrose tolerance test (OSTT), AE significantly decreased the postprandial peak of glucose in normal and hyperglycemic mice. This result suggested that the inhibition of  $\alpha$ -glucosidase enzymes might be involved in the hypoglycemic action. An *in vitro* assay against  $\alpha$ -glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae* established the inhibitory effect of the infusion, organic fractions from the infusion (AcOEt and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), zinagrandidolides E and F, and DME. According to the *in silico* evaluations, zinagrandidólides D-F and DME bind to the  $\alpha$ -glucosidase enzyme in allosteric sites. Bioinformatic analyses with Swiss ADME, Osiris Property Explorer, and MolInspiration tools were carried out to estimate the physicochemical, pharmacokinetic, toxicological, and biochemical parameters of the active molecules.

Finally, an accurate, precise, and linear method to quantify zinagrandidolide E in the crude drug of *Z. grandiflora* was developed and validated according to the ICH (2005) protocols.

## CHAPTER II

The Sonora gum (goma de Sonora) or arí is an exudate produced by the cochineal insect *Tachardiella fulgens*, host of the tree *Coursetia glandulosa* (Fabaceae). This exudate, in addition to a flavoring, is a medicinal agent used as gastroprotective agent and for diabetes treatment, mainly in the Mexican states of Chihuahua and Sonora (Cockerell, 1985; Bye y Linares, 2018).

From a ketone extract of the crude drug, 7-hydroxyhexadecanoic acid (1) and emodin (2) were isolated and characterized by spectroscopic means. A review of the pharmacological activity of these compounds, shows that emodin

has antidiabetic properties because its action on several molecular targets involved in the disease. The presence of this compound in the exudate correlates with its popular medicinal uses.

Using GC-MS, 19 compounds were identified in various fractions of the acetone extract; they included fatty acids, aldehydes, and long-chain alkanes. In an analysis using the solid phase microextraction technique (SPME) 16 volatiles compounds of the gum were obtained and identified by GC-MS being  $\gamma$ -vinyl- $\gamma$ -valerolactone, lilac aldehyde,  $\alpha$ -curcumene, nerolidol and tridecyl acrylate the most abundants. In total, 36 compounds were identified, setting a precedent on the chemical composition of the Sonora gum.

# ÍNDICE

---

DEDICATORIAS .....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN .....	V
ABSTRACT .....	VIII
ÍNDICE .....	XI

## **CAPÍTULO I: *Zinnia grandiflora* (Asteraceae): Una fuente potencial de agentes antidiabéticos, antiinflamatorios y analgésicos.**

ÍNDICE DE TABLAS .....	2
ÍNDICE DE FIGURAS .....	3
ABREVIATURAS.....	6
1. ANTECEDENTES.....	8
1.1. El género <i>Zinnia</i> .....	8
1.2. <i>Zinnia grandiflora</i> .....	14
1.2.1. Usos medicinales.....	16
1.2.2. Estudios químicos y farmacológicos .....	17
1.3. Inflamación .....	25
1.4. El dolor y la nocicepción .....	27
1.4.1. Clasificación del dolor .....	28
1.4.2. Neurofisiología y mecanismos del dolor .....	31
1.4.3. El dolor neuropático.....	36
1.5. Modelos para el estudio del dolor en roedores.....	38
1.5.1. Modelo del edema de pata inducido por carragenina .....	45
1.5.2. Modelo de neuropatía diabética inducida con estreptozotocina.....	46
1.5.3. Modelo de ligadura de nervios espinales L4/L5 en ratones .	48
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	50

3.	HIPÓTESIS .....	51
4.	OBJETIVOS .....	52
4.1.	Objetivo General .....	52
4.2.	Objetivos Específicos .....	52
5.	DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	54
5.1.	Material vegetal.....	54
5.2.	Preparación del extracto acuoso de <i>Z. grandiflora</i> .....	54
5.3.	Estudios químicos de la especie <i>Z. grandiflora</i> .....	54
5.3.1.	Fraccionamiento y análisis preliminar de la infusión .....	54
5.3.2.	Obtención y análisis químico del extracto orgánico total (EOT) para la purificación de la zinagrandinólida E.....	55
5.3.3.	Obtención del aceite esencial.....	58
5.3.4.	Aislamiento de los compuestos mayoritarios del aceite esencial.....	58
5.3.5.	Obtención de los compuestos volátiles de la infusión utilizando microextracción en fase sólida (MEFS).....	60
5.3.6.	Análisis de los compuestos volátiles de la infusión y aceite esencial mediante CG-EM .....	61
5.4.	Estudios farmacológicos <i>in vivo</i> .....	61
5.4.1.	Animales de experimentación .....	61
5.4.2.	Preparación y administración de las muestras .....	62
5.4.3.	Medición de la alodinia táctil .....	63
5.4.4.	Modelo del edema de pata inducido por carragenina .....	64
5.4.5.	Modelo de neuropatía diabética inducida con STZ.....	66
5.4.6.	Modelo de ligadura de nervios espinales L4/L5.....	66
5.4.7.	Evaluación de la eficacia preclínica antidiabética en ensayos agudos.....	67
5.4.8.	Análisis estadísticos.....	69
5.5.	Estudios farmacológicos <i>in vitro</i> .....	69
5.5.1.	Consideraciones generales.....	69
5.5.2.	Evaluación de la actividad inhibitoria sobre enzimas $\alpha$ -glucosidasas .....	69
5.5.3.	Determinación de los parámetros cinéticos de la inhibición .....	71

5.6.	Estudios <i>in silico</i> .....	71
5.6.1.	Estudios de acoplamiento molecular.....	71
5.6.2.	Predicción de las propiedades químicas, farmacológicas y toxicológicas de los metabolitos secundario de <i>Z. grandiflora</i> .....	73
5.7.	Pruebas de identidad y composición .....	73
5.7.1.	Desarrollo del método analítico a partir de la fracción de diclorometano de la infusión de <i>Z. grandiflora</i> .....	73
5.7.2.	Preparación de la matriz de trabajo.....	75
5.7.3.	Validación del método analítico para la cuantificación de la zingrandinólida E.....	75
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	78
6.1.	Evaluación del efecto antiinflamatorio y antialodínico de la zingrandinólida E.....	78
6.1.1.	Efecto antiinflamatorio y antialodínico en el modelo del edema de pata inducido por carragenina .....	79
6.1.2.	Efecto antialodínico en el modelo de neuropatía diabética inducida por STZ .....	86
6.1.3.	Evaluación del mecanismo de acción de la ZGE.....	89
6.1.4.	Estudios de acoplamiento molecular de la ZGE con diversos receptores	95
6.2.	Análisis de los compuestos volátiles en la infusión y el aceite esencial de <i>Z. grandiflora</i> .....	100
6.3.	Evaluación del potencial antiinflamatorio y antialodínico del AE de <i>Z. grandiflora</i> .....	105
6.3.1.	Evaluación en el modelo del edema de pata inducido por carragenina.....	105
6.3.2.	Evaluación en el modelo LNE en ratones .....	106
6.4.	Evaluación del potencial antiinflamatorio y antialodínico de la DME.....	108
6.4.1.	Evaluación en el modelo de pata inducido por carragenina	108
6.4.2.	Evaluación en el modelo LNE .....	109
6.5.	Evaluación de la eficacia preclínica antidiabética del extracto acuoso de <i>Zinnia grandiflora</i> .....	112
6.5.1.	Efecto hipoglucemiante agudo en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos .....	113

6.5.2.	Efecto antihiper glucémico en ratones normoglu cémicos e hiper glucémicos .....	114
6.6.	Predicción de las propiedades químicas, farmacológicas y toxicológicas de los metabolitos secundarios de <i>Z. grandiflora</i> .....	121
6.7.	Pruebas de identidad y composición .....	128
6.7.1.	Validación de un método analítico para la cuantificación de la ZGE.....	129
7.	CONCLUSIONES .....	140
8.	REFERENCIAS.....	143
	ANEXO I .....	160

## **CAPÍTULO II: La Goma de Sonora: Una contribución a su estudio químico**

	ÍNDICE DE TABLAS .....	168
	ÍNDICE DE FIGURAS .....	169
1.	ANTECEDENTES.....	170
1.1.	Insectos que producen lacas .....	170
1.2.	El género <i>Tachardiella</i> .....	171
1.3.	<i>Tachardiella fulgens</i> .....	175
1.4.	<i>Coursetia glandulosa</i> .....	177
1.5.	La goma de Sonora .....	178
2.	HIPÓTESIS .....	180
3.	OBJETIVOS .....	181
3.1.	Objetivo General .....	181
3.2.	Objetivos Específicos .....	181
4.	DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	182
4.1.	Droga cruda.....	182
4.2.	Preparación del extracto acetónico .....	182
4.3.	Aislamiento y purificación de metabolitos secundarios .....	182
4.4.	Análisis de por CG-EM.....	183
4.5.	Análisis de los compuestos volátiles por MEFS .....	184
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	186

5.1.	Aislamiento, purificación y caracterización de metabolitos secundarios presentes en la goma de sonora.....	186
5.2.	Análisis de la composición de diversas fracciones del extracto acetónico de la goma de Sonora por CG-EM .....	192
5.3.	Análisis de los compuestos volátiles de la goma de Sonora ...	193
6.	CONCLUSIONES .....	196
7.	REFERENCIAS.....	197
	ANEXO II.....	200



# CAPÍTULO I

*Zinnia grandiflora*  
(Asteraceae): una fuente  
potencial de agentes  
antidiabéticos,  
analgésicos y  
antiinflamatorios



## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 1.</b> Nombres comunes de <i>Zinnia grandiflora</i> en Estados Unidos de América y México.....	16
<b>Tabla 2.</b> Usos médicos de <i>Zinnia grandiflora</i> . ....	18
<b>Tabla 3.</b> Modelos animales de dolor. ....	40
<b>Tabla 4.</b> Métodos para evaluar la hiperalgesia y la alodinia. ....	44
<b>Tabla 5.</b> Gradiente de elución utilizado para la purificación de la ZGE por CLAE preparativa.....	57
<b>Tabla 6.</b> Gradiente de elución utilizado para el desarrollo del perfil cromatográfico.....	74
<b>Tabla 7.</b> Energías de unión de los compuestos utilizados para los estudios de acoplamiento molecular con los receptores evaluados. ....	96
<b>Tabla 8.</b> Compuestos volátiles identificados por CG-EM en la infusión de <i>Zinnia grandiflora</i> y su aceite esencial (AE).....	103
<b>Tabla 9.</b> Efecto inhibitorio de los extractos, fracciones y metabolitos de <i>Z. grandiflora</i> sobre las $\alpha$ -glucosidasas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	117
<b>Tabla 10.</b> Energía de unión estimada de diversos compuestos de <i>Z. grandiflora</i> con $\alpha$ -glucosidasa de levadura.....	120
<b>Tabla 11.</b> Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del sistema de la ZGE.....	130
<b>Tabla 12.</b> Resultados para LD y LC de la zinagrandinólida E. ....	132
<b>Tabla 13.</b> Resultados experimentales de la evaluación de la linealidad del método para la ZGE. ....	134
<b>Tabla 14.</b> Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del método. ....	135
<b>Tabla 15.</b> Resultados de los experimentos de recobro para evaluar la exactitud del método. ....	136
<b>Tabla 16.</b> Repetibilidad del método para la cuantificación de la ZGE.....	137
<b>Tabla 17.</b> Repetibilidad intermedia del método para la cuantificación de ZGE. ....	138

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución del género <i>Zinnia</i> en México. ....	9
<b>Figura 2.</b> Guayanólidas, germacranólidas y eudesmanólidas identificadas en el género <i>Zinnia</i> . ....	11
<b>Figura 3.</b> $\gamma$ - elemanólidas aisladas del género <i>Zinnia</i> .....	12
<b>Figura 4.</b> $\delta$ - elemanólidas aisladas del género <i>Zinnia</i> . ....	13
<b>Figura 5.</b> <i>Zinnia grandiflora</i> . ....	14
<b>Figura 6.</b> Distribución geográfica potencial de <i>Zinnia grandiflora</i> en México basado en especímenes de herbario. ....	15
<b>Figura 7.</b> Consecuencias fisiológicas del proceso de inflamación de acuerdo con el desencadenante inflamatorio. ....	26
<b>Figura 8.</b> Los cuatro tipos de dolor primarios.....	30
<b>Figura 9.</b> Proceso fisiológico del dolor. ....	32
<b>Figura 10.</b> Mecanismo de sensibilización de los nociceptores.....	34
<b>Figura 11.</b> Componentes del dolor neuropático. ....	37
<b>Figura 12.</b> Aislamiento y purificación de la zinagrandinólida E del EOT de <i>Zinnia grandiflora</i> . ....	56
<b>Figura 13.</b> Identificación de compuestos mayoritarios del aceite esencial de <i>Zinnia grandiflora</i> en cromatografía en capa delgada. ....	59
<b>Figura 14.</b> Esquema del diseño experimental para la evaluación del potencial antiinflamatorio y analgésico de la ZGE.....	79
<b>Figura 15.</b> Efecto antiinflamatorio y antialodínico local de ZGE en el modelo del edema de pata inducido por carragenina.....	80
<b>Figura 16.</b> Efecto antiinflamatorio y antialodínico sistémico de ZGE en el modelo del edema de pata inducido por carragenina .....	81
<b>Figura 17.</b> Efecto antiinflamatorio y antialodínico local de ZGE monitoreado durante 15 días. ....	83
<b>Figura 18.</b> Efecto antiinflamatorio y antialodínico local de ZGE después de 6 días de la inyección de carragenina. ....	85
<b>Figura 19.</b> Efecto antialodínico de la ZGE en un modelo de neuropatía diabética en ratones.....	87
<b>Figura 20.</b> Evaluación del mecanismo antiinflamatorio y antinociceptivo de la ZGE en el modelo del edema de pata inducido por carragenina.....	91

<b>Figura 21.</b> Evaluación del mecanismo antiinflamatorio y antinociceptivo de la ZGE en el modelo del edema de pata inducido por carragenina.....	94
<b>Figura 22.</b> Representación en 2D de las interacciones observadas entre ZGE con el receptor 5-HT <sub>1B</sub> , receptor $\delta$ opioide, receptor $\kappa$ opioide, receptor $\mu$ opioide y con el receptor GABA <sub>A</sub> .....	98
<b>Figura 23.</b> Cromatogramas de iones totales obtenidos por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) de los compuestos volátiles presentes en <i>Z. grandiflora</i> obtenidos por la técnica de microextracción en fase sólida en espacio de cabeza (MEFS-EC). .....	101
<b>Figura 24.</b> Cromatogramas de iones totales obtenidos por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) de tres muestras (n = 3) de aceite esencial obtenido por hidrodestilación, a partir de un mismo lote de las partes aéreas de <i>Z. grandiflora</i> .. .....	102
<b>Figura 25.</b> Análisis de CG-EM de la fracción hexánica de la infusión de <i>Z. grandiflora</i> .....	104
<b>Figura 26.</b> Efecto antiinflamatorio y antialodínico del aceite esencial (AE) de <i>Zinnia grandiflora</i> en el modelo del edema de pata inducido por carragenina en ratones.....	106
<b>Figura 27.</b> Efecto antialodínico del aceite esencial (AE) de <i>Zinnia grandiflora</i> en el modelo de ligadura de nervio espinal en ratones.. .....	107
<b>Figura 28.</b> Efecto antiinflamatorio y antialodínico de la desmetilisoencecalina (DME) en el modelo del edema de pata inducido por carragenina en ratones.....	109
<b>Figura 29.</b> Efecto antialodínico de la desmetilisoencecalina (DME) en el modelo SNL en ratones .....	110
<b>Figura 30.</b> Efecto hipoglucemiante agudo del extracto acuoso (EA) de <i>Zinnia grandiflora</i> en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos.....	114
<b>Figura 31.</b> Prueba de tolerancia a la sacarosa (PTOS) del extracto acuoso (EA) de <i>Z. grandiflora</i> .....	115
<b>Figura 32.</b> Gráficos de Lineweaver-Burk de la ZGE y ZGF sobre la inhibición de las enzimas $\alpha$ -glucosidasas de levadura.....	119
<b>Figura 33.</b> Posibles sitios de unión para la desmetilisoencecalina con la enzima $\alpha$ -glucosidasa de levadura.....	121
<b>Figura 34.</b> Parámetros fisicoquímicos y farmacocinéticos de la zinagrandinólida D (ZGD) estimados a partir del programa Swiss ADME. ....	124
<b>Figura 35.</b> Parámetros fisicoquímicos y farmacocinéticos de la zinagrandinólida E (ZGE) estimados a partir del programa Swiss ADME.....	124
<b>Figura 36.</b> Parámetros fisicoquímicos y farmacocinéticos de la zinagrandinólida F (ZGF) estimados a partir del programa Swiss ADME. ....	125

## CAPÍTULO I

<b>Figura 37.</b> Parámetros fisicoquímicos y farmacocinéticos de la desmetilisoencecalina (DME) estimados a partir del programa Swiss ADME. ....	126
<b>Figura 38.</b> Parámetros de toxicidad y actividad biológica de las zinagrandinólidas D-F y la DME, estimados a partir de los programas Osiris Property Explorer y MolInspiration.....	128
<b>Figura 39.</b> Cromatogramas de la fracción de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> de la infusión de <i>Zinnia grandiflora</i> .....	129
<b>Figura 40.</b> Curva de calibración para la evaluación de la linealidad del sistema analítico.....	131
<b>Figura 41.</b> Curvas de calibración para la determinación del LD y LC de ZGE. ....	133
<b>Figura 42.</b> Linealidad del método para la cuantificación de ZGE. ....	135

## ABREVIATURAS

---

5-HT	Serotonina
ABC	Área bajo la curva
ACA	Acarbosa
AcOEt	Acetato de etilo
AE	Aceite esencial
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANADEVA	Análisis de varianza
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCD	Cromatografía en capa delgada
CG	Cromatografía de gases
CGRP	Péptido relacionado con el gen de calcitonina
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Cloruro de metileno o diclorometano
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
CLUE	Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia
COX	Ciclooxigenasa
DIC	Diclofenaco
DME	Desmetilisoencecalina
DMSO	Dimetilsulfóxido
EA	Extracto acuoso
EEM	Error estándar de la media
EM	Espectrometría de masas
ESI	Ionización por electrospray
EOT	Extracto orgánico total
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GLI	Glibenclamida
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico

## CAPÍTULO I

IASP	Asociación Internacional para el Estudio del Dolor
i.g.	Administración intragástrica
i.p.	Administración intraperitoneal
i.pl.	Administración intraplantar
i.t.	Administración intratecal
IR	Espectroscopia de infrarrojo
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
LNE	Ligadura de nervios espinales
MeCN	Acetonitrilo
MEFS	Microextracción en fase sólida
MeOH	Metanol
NMDA	N-metil-D-aspartato
ON	Óxido nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud
PDA	Detector de arreglo de fotodiodos
PDB	Protein data bank
PGB	Pregabalina
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandinas E <sub>2</sub>
PTOS	Prueba de tolerancia oral a la sacarosa
RMN	Resonancia magnética nuclear
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
SSI	Solución salina isotónica
STZ	Estreptozotocina
UV	Ultravioleta
VEH	Vehículo
	Zinagrandinólida E
ZGE	

## ANTECEDENTES

---

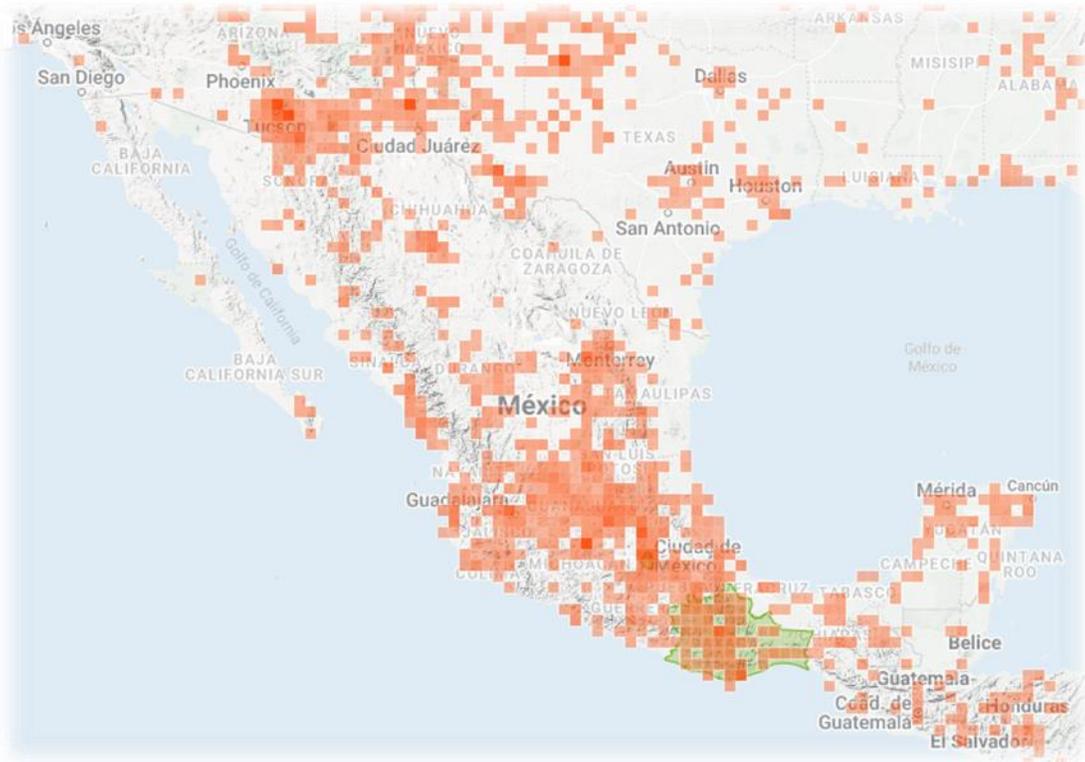
Las asteráceas constituyen la familia más diversa de las angiospermas y la más ampliamente distribuida; incluyendo aproximadamente 1450 géneros, y entre 24,000 a 30,000 especies en el mundo (Leyva-Castañeda, Sigala-Rodríguez y Ocampo, 2020). En México, esta familia se distribuye a lo largo de todo el país y cuenta con 417 géneros y 3, 113 especies, de las cuales 63.9% son endémicas del territorio nacional (Villaseñor, 2018).

Los miembros de la familia Asteraceae continúan siendo un importante objeto de estudios de bioprospección debido a su amplia distribución geográfica y riqueza de especies; lo que convierte a esta familia en la más exitosa dentro de las angiospermas desde el punto de vista evolutivo. Las plantas de esta familia cuentan con una eficiente capacidad de dispersión y plasticidad genética. Esta última característica es la responsable de la expresión de una amplia diversidad de metabolitos secundarios que les permite a las especies adaptarse a diversas condiciones ecológicas por su variabilidad fenotípica y genotípica, o que sintetizan como estrategias de protección contra depredadores o competidores (Villaseñor, 2018).

### 1.1. El género *Zinnia*

El género *Zinnia* (Asteraceae) se presume originario de México y se distribuye a lo largo de todo su territorio (**Figura 1**). Las primeras especies se llevaron a Europa en 1753, y seis años después Carlos Linneo nombró el género en honor a Johann Gottfried Zinn, su profesor de botánica en la Universidad de Göttingen, Alemania (Stafleu y 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*, *Sanvitalia* 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, McLaughlin and Gunatilaka, 2006; Motawe, Wahba e Ibrahim, 2015).



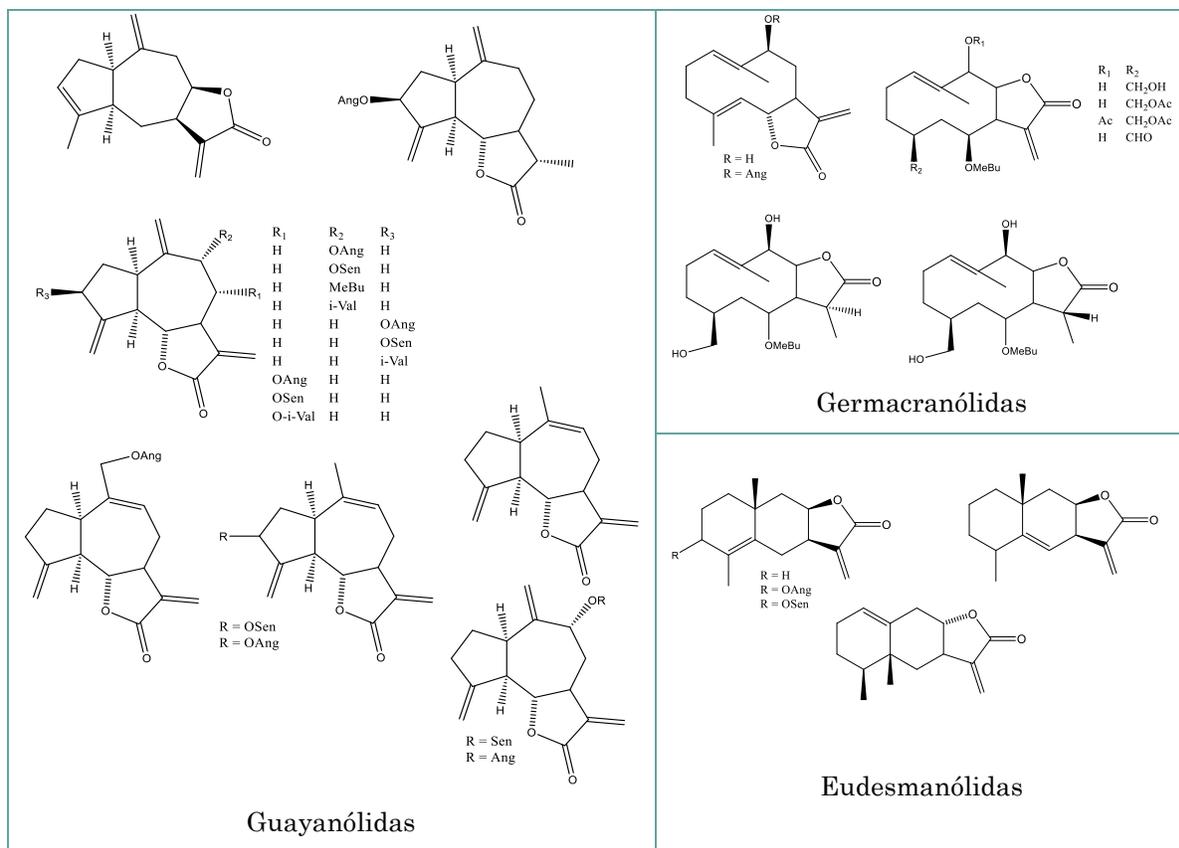
**Figura 1.** Distribución del género *Zinnia* en México. Imagen obtenida del Naturalista.com [en línea]. Consultado el 21 de abril de 2022. Disponible en: <https://www.naturalista.mx/taxa/132450-Zinnia>.

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. marítima*, 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).

A pesar de la diversidad del género *Zinnia* solo algunas especies han sido estudiadas desde el punto de vista químico, incluyendo: *Z. grandiflora*, *Z. peruviana*, *Z. pauciflora*, *Z. multiflora*, *Z. juniperifolia*, *Z. citrea*, *Z. flavicoma*, *Z. angustifolia*, *Z. elegans*, *Z. haageana*, *Z. linearis*, *Z. tenuiflora*, *Z. verticillata*, *Z. acerosa* (Bohlmann *et al.*, 1979, 1981; Herz and Govindan, 1981, 1982; Ortega and Maldonado, 1982; Ortega *et al.*, 1983, 1995). Los estudios de estas especies han revelado principalmente la presencia flavonoides y lactonas sesquiterpénicas.

Los flavonoides mayormente identificados en el género son antocianidinas, flavonas, flavonoles, auronas y chalconas. En *Z. elegans* se han encontrado ocho flavonoides derivados de campferol y luteolina, y antocianinas derivadas de la pelargonidina y la cianidina (Harborne *et al.*, 1983). En *Z. pauciflora*, el flavonoide más abundante en las flores es la apigenina-7-(4-aceto)-xilósido, y el campferol-7-glucoramnósido (Yamaguchi, Terahara and Shizukuishi, 1990). Mientras que en *Z. linearis*, se han encontrado chalconas como la marina, y auronas como la sulfureina y maritimeina (Motawe, Wahba and Ibrahim, 2015).

Por otro lado, las lactonas sesquiterpénicas se han aislado de todas las especies estudiadas hasta la fecha, lo que las convierte en los compuestos más comunes en el género. Dentro de este grupo de compuestos, las elemanólidas son las más abundantes, pero también se han encontrado guayanólidas, germacranólidas y eudesmanólidas (**Figura 2**) (Bohlmann *et al.*, 1981; Ortega *et al.*, 1983).



**Figura 2.** Guayanólidas, germacranólidas y eudesmanólidas identificadas en el género *Zinnia*.

Las elemanólidas son compuestos que derivan biogénicamente de las germacranólidas y se pueden clasificar como  $\gamma$ -elemanólidas o  $\delta$ -elemanólidas. Las primeras se caracterizan por contener un ciclo de carbonos de seis miembros que soporta una lactona de cinco miembros y se encuentran ampliamente distribuidas en varios géneros de la familia Asteraceae (**Figura 3**); mientras que en las  $\delta$ -elemanólidas la lactona es de seis miembros y están restringidas al género *Zinnia* (Bashyal, McLaughlin and Gunatilaka, 2006). De acuerdo con la literatura, se han identificado nueve  $\delta$ -elemanólidas en tres especies del género *Zinnia* (**Figura 4**), siete de las cuales se han aislado de *Z. grandiflora*: juniperina de *Z. juniperifolia* (Ortega and Maldonado, 1982), zinnacitrina de *Z. citrea* (Ortega *et al.*, 1995); y 6*R*-(2''-hidroxiisobutanoiloxi)-8*S*-acetoxi-15-oxo-1*S*,2-epoxi-3,11(13)-elemandien-12,9-ólida (**1**), además de la

serie de zinagrandinólidas de la A – F (2 – 7) de *Z. grandiflora* (Bashyal, McLaughlin and Gunatilaka, 2006; Reyes-Pérez *et al.*, 2019).

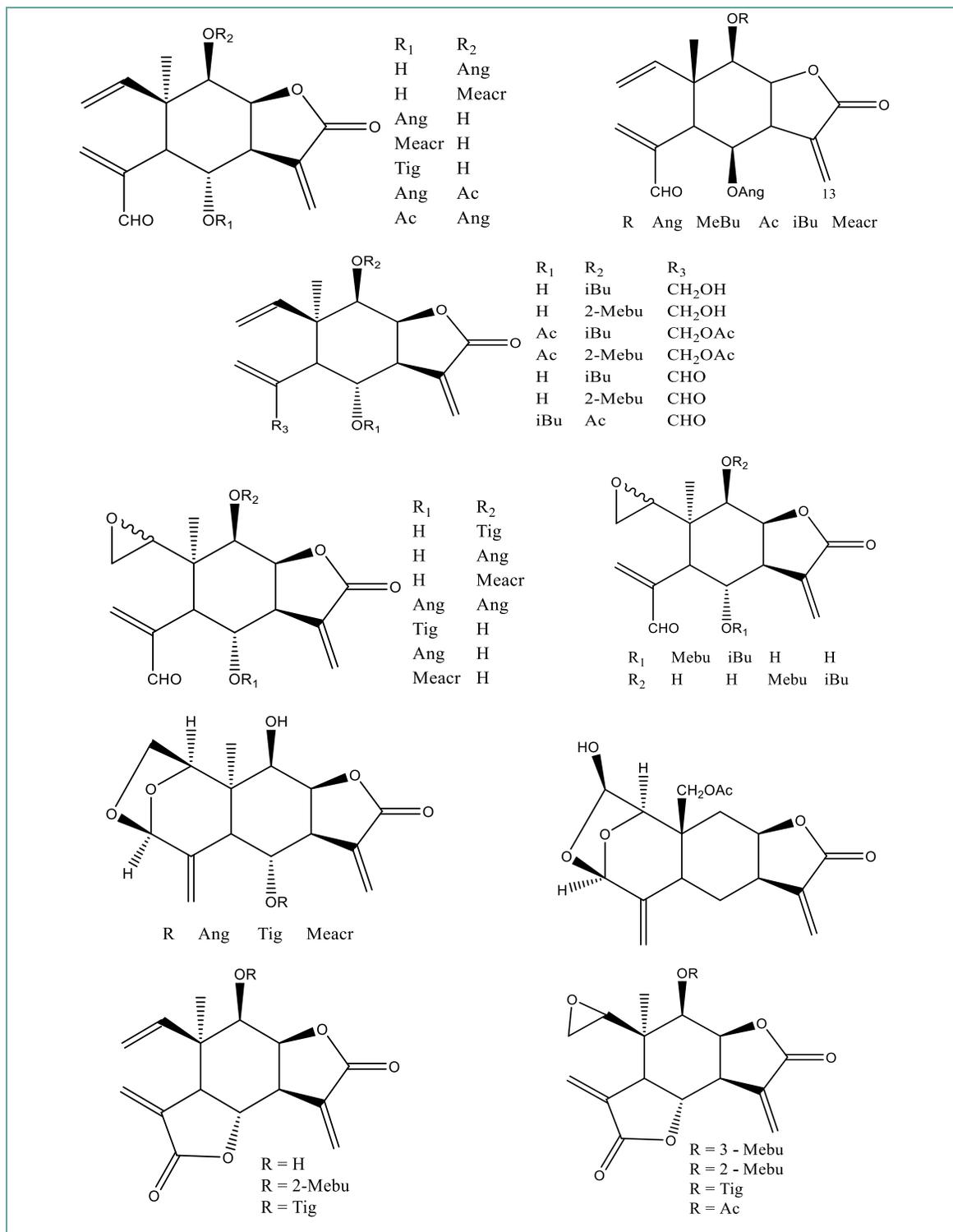
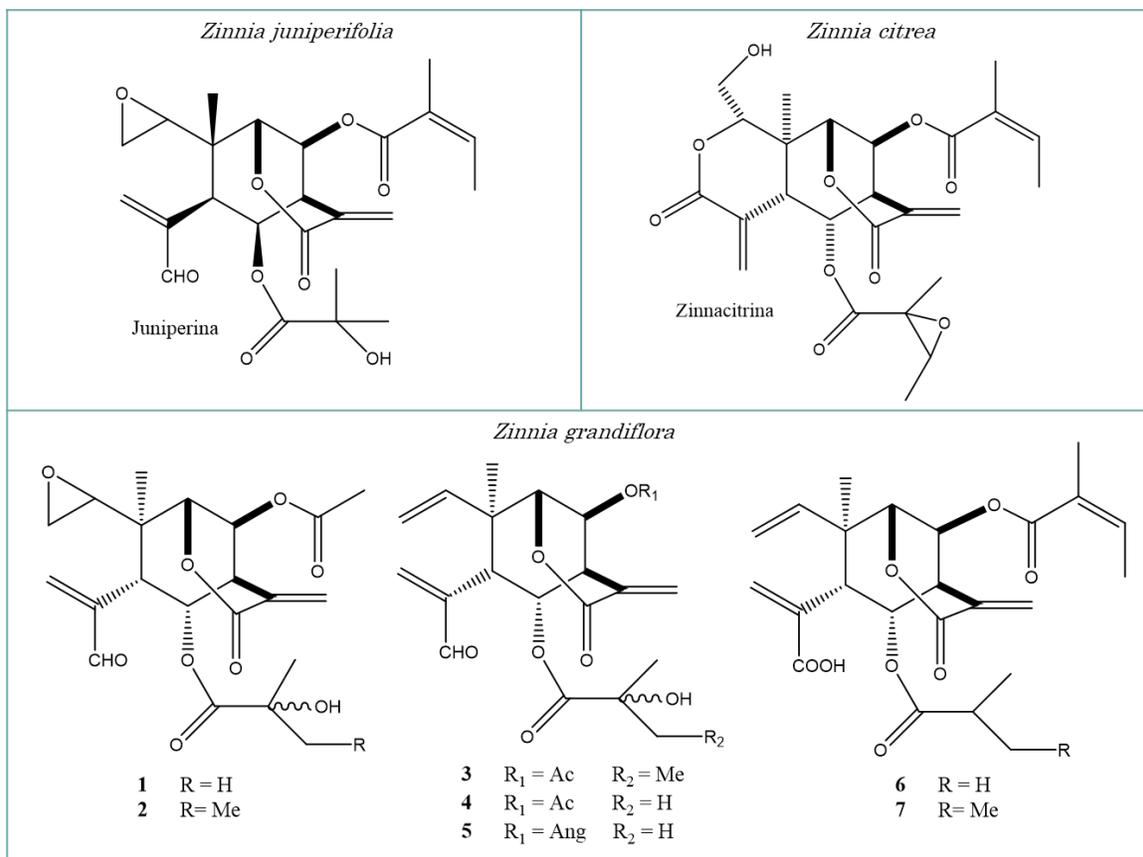


Figura 3.  $\gamma$  - elemanólidas aisladas del género *Zinnia*



**Figura 4. δ** - elemanólidas aisladas del género *Zinnia*.

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, únicamente algunos compuestos aislados de *Zinnia* han sido evaluados, incluyendo las zinaflavinas ( $\gamma$ -elemanólidas dilactonas) de *Z. flavicoma*, las cuales demostraron actividad citotóxica en las líneas celulares HEP-2c (carcinoma humano de laringe), y L929 (células fibroblásticas de tejido conectivo de murinos normales) (Ortega and Maldonado, 1985; Bashyal, McLaughlin y Gunatilaka, 2006). Los estudios farmacológicos de la especie *Z. grandiflora* y los compuestos aislados de la misma se abordarán más adelante en este trabajo.

## 1.2. *Zinnia grandiflora*

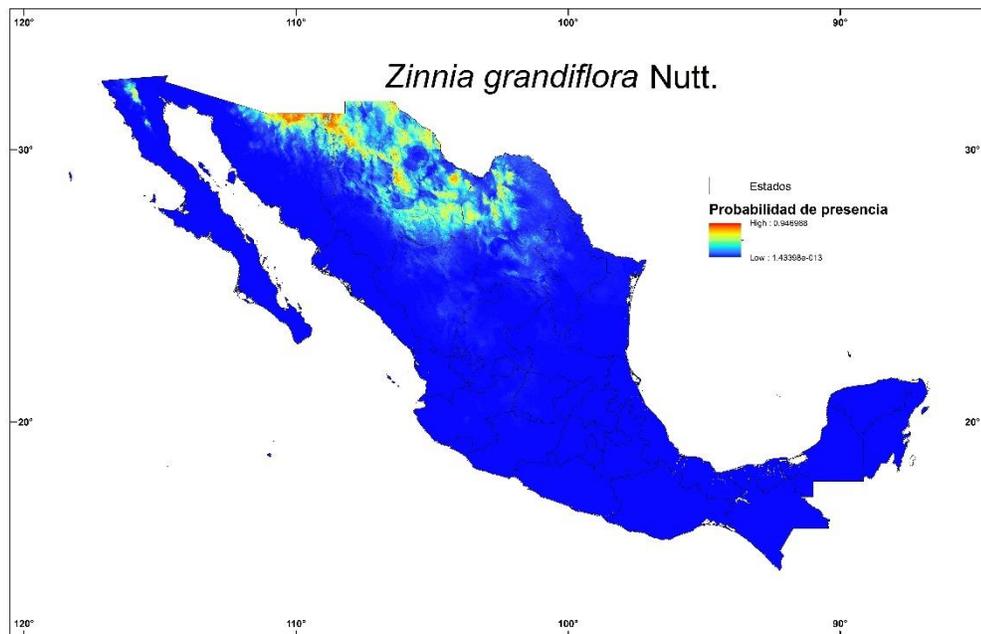
*Zinnia grandiflora* Nuttall es una hierba perenne de bajo crecimiento con flores amarillentas llamativas y conspicuas copas bajas, en forma de montículo que se originaron en los rizomas. Posee varios tallos cortos, frondosos, y muy ramificados de base leñosa con numerosas cabezas de flores pequeñas, 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 5**). Las lígulas secas de la inflorescencia son persistentes y sirven para dispersar aéreamente los frutos en los capítulos (Day, 1884; Miller, 2013).



**Figura 5.** *Zinnia grandiflora*. A) Flores frescas. B) Flor seca. C) Planta completa fresca. D) Planta completa seca. Fotografías proporcionadas por Robert Bye y Edelmira Linares.

La distribución geográfica de esta planta ha sido bien documentada en las estribaciones y las praderas adyacentes y los márgenes del desierto del sur de las Montañas Rocosas y el norte de la Sierra Madre Occidental desde las primeras exploraciones botánicas en los estados de Colorado, Kansas, Oklahoma, Texas, Nuevo México y Arizona en Estados Unidos de América (EE.

UU.), así como Sonora, Chihuahua, Coahuila, Durango, Tamaulipas y Zacatecas en México (**Figura 6**) (Torrey, 1859; Bashyal, McLaughlin and Gunatilaka, 2006; Smith, 2006). Por su tolerancia a la sequía y las bajas temperaturas (en comparación con las otras 17 especies del género), se ha incorporado a la paleta vegetal de la xerojardinería en la horticultura internacional (Bailey, Bailey and the Staff of the Liberty Hyde Bailey Hortorium, 1976; Huxley, Griffiths and Levy, 1999).



**Figura 6.** Distribución geográfica potencial de *Zinnia grandiflora* en México basado en especímenes de herbario.

*Zinnia grandiflora* se conoce comúnmente en México como tepozán del burro o tepozán del becerro y, en EE. UU. como Rocky Mountain Zinnia (Zinnia de las montañas Rocallosas). Sin embargo, en la **Tabla 1** se presentan otros nombres comunes con los que se le puede encontrar en la literatura.

**Tabla 1.** Nombres comunes de *Zinnia grandiflora* en Estados Unidos de América y México

País	Nombres comunes
Estados Unidos de América	Desert zinnia
	Little golden zinnia
	Paper flower
	Plains zinnia
	Prairie zinnia
	Rocky Mountain zinnia
	Wild zinnia
México	Tepozán o tepozana
	Tepozán o tepozana del burro
	Tepozán o tepozana del becerro
	Yerba del becerro
	Zacate pastor

### 1.2.1. Usos medicinales

A pesar de su distribución conspicua en el suroeste de los EE. UU. y el norte de México, el uso de *Z. grandiflora* con fines médicos es limitado. Se ha registrado que solo cuatro tribus indígenas norteamericanas emplearon esta hierba hasta mediados del siglo XX para tratar principalmente trastornos de los sistemas digestivo y genitourinario (**Tabla 2**). Las investigaciones que informaron sobre las aplicaciones medicinales de *Z. grandiflora* se realizaron entre 1906 y 1939. El único estudio diacrónico entre una comunidad indígena que empleó *Z. grandiflora* se realizó entre los Zuni en 1977-1978 (Camazine and Bye, 1980). Aunque la zinnia del desierto es común en el noroeste de Nuevo México y su uso no estaba restringido a ninguna fraternidad intra-tribal Zuni en particular, los 28 ancianos y curanderos Zuni no lo informaron como una planta medicinal. El empleo medicinal actual de la zinnia de la pradera en EE. UU. parece haberse reducido notablemente, posiblemente hasta el abandono.

### 1.2.2. Estudios químicos y farmacológicos

Los estudios químicos previos de *Z. grandiflora* han permitido principalmente, el aislamiento de lactonas sesquiterpénicas del tipo  $\delta$ -elemánolidas: la 6*R*-(2''-hidroxiisobutanoiloxi)-8*S*-acetoxi-15-oxo-1*S*, 2-epoxi-3,11(13)-elemándien-12,9-ólida, y las denominadas zinagrandinólidas A-F, cuyas estructuras se presentan en la **Figura 4** (Bashyal, McLaughlin y Gunatilaka, 2006; Reyes-Pérez *et al.*, 2019).

Por otro lado, los estudios farmacológicos de la especie también son escasos. Se ha reportado la actividad citotóxica del extracto hexánico de la planta y de las  $\delta$ -elemánolidas aisladas por Bashyal y colaboradores (2006): 6*R*-(2''-hidroxiisobutanoiloxi)-8*S*-acetoxi-15-oxo-1*S*, 2-epoxi-3,11(13)-elemándien-12,9-ólida y las zinagrandinólidas A - C, las cuales presentaron citotoxicidad con poca selectividad, contra las líneas celulares de cáncer NCI-H460 (carcinoma pulmonar), MCF-7 (cáncer de mama), SF-268 (glioma del Sistema Nervioso Central), y MIA PaCa-2 (carcinoma pancreático) y en la línea celular de fibroblastos humanos normales WI-38 (Bashyal, McLaughlin and Gunatilaka, 2006). Mientras que en un estudio previo a este trabajo, Reyes-Pérez y colaboradores (2019) demostraron el efecto antiinflamatorio y antinociceptivo de la infusión de *Z. grandiflora*, en el modelo del edema de pata inducido por carragenina y el modelo de la formalina en ratones, respectivamente. En este mismo estudio se identificó y aisló a las zinagrandinólidas D-F de la fracción de diclorometo obtenida por reparto de la infusión, comprobando la actividad de esta fracción orgánica en el modelo de la formalina, y posteriormente el efecto antinociceptivo de la zinagrandinólida E pura en el mismo modelo. Adicionalmente, se estableció la dosis letal media oral del extracto acuoso por el método de Lorke, la cual fue mayor a 5 g/kg de peso en ratones (Reyes-Pérez *et al.*, 2019). Los estudios antes mencionados sientan la base para continuar indagando sobre el efecto antiinflamatorio y antinociceptivo de *Z. grandiflora* y de sus componentes en este trabajo de tesis.

**Tabla 2.** Usos médicos de *Zinnia grandiflora* registrados en el suroeste de los Estados Unidos y al norte de México, ordenados según la categoría de uso medicinal de Cook, Frances E.M. (1995).

Uso medicinal	Síntomas, enfermedad o bioactividad	Preparación / Administración	Población	Nombre común	Fechas de recopilación de datos	Referencias
DSD	Catártico	Decocción de la planta/ Oral	Ramah Navajo	Zinnia	1939-1941	Vestal 1952:54
DSD	Diarrea	Infusión de la planta: “3 dedos” de material seco en 1 litro de agua / Bebida oral administrada como “agua de uso”	Mexicana	Tepozana del burro Tepozana del becerro Tepozán Yerba del becerro	2016-2017	Especímenes: Bye 38402 & Linares Bye 39042 & Linares Bye 39131 & Linares
DSD	Diarrea	Decocción de la planta	Mexicana	Cinco llagas	1930	Zingg 1932:180
DSD	Emético	Decocción de planta / Oral	Ramah Navajo	Zinnia	1939-1941	Vestal 1952:54
DSD	Acidez	Decocción de planta / Oral	Ramah Navajo	Zinnia	1939-1941	Vestal 1952:54

<b>DSD</b>	Malestar estomacal	Decocción o infusión de la planta / Oral	Navajo	Bilatah ha.lcoi – Flores amarillas C'il dije-higi – Planta gomosa	1906-1931; 1933-1938	Wyman & Harris 1941:40
<b>DSD</b>	Dolor de estómago	Decocción de la planta / Oral	Ramah Navajo	Zinnia	1939-1941	Vestal 1952:54
<b>DSE</b>	Diabetes	Infusión de la planta: “3 dedos” de material seco en 1 litro de agua / Bebida oral administrada como “agua de uso”	Mexicana	Tepozana del burro Tepozana del becerro Tepozán Yerba del becerro	2016-2017	Specimens: Bye 38402 & Linares Bye 39042 & Linares Bye 39131 & Linares
<b>DSGU</b>	Enfermedad de la vejiga	Decocción o infusión de la planta / Oral	Navajo	Bilatah ha.lcoi – Flores amarillas C'il dije-higi – Planta gomosa	1906-1931; 1933-1938	Wyman & Harris 1941:40
<b>DSGU</b>	Enfermedad de	Decocción o infusión de	Navajo	Bilatah ha.lcoi –	1906-1931;	Wyman &

	la vejiga (diurético)	la planta / Oral		Flores amarillas C'il dije-higi – Planta gomosa	1933-1938	Harris 1941:38
<b>DSGU</b>	Enfermedad de la vejiga (diurético)	Decocción o infusión de la planta / Oral	Navajo	Bilatah ha.lcoi – Flores amarillas C'il dije-higi – Planta gomosa	1906-1931; 1933-1938	Wyman & Harris 1941:38
<b>DSGU</b>	Foranuria (diurético)	Decocción o infusión de la planta / Oral	Navajo	Bilatah ha.lcoi – Flores amarillas C'il dije-higi – Planta gomosa	1906-1931; 1933-1938	Wyman & Harris 1941:38
<b>DSGU</b>	Hematuria (diurético)	Decocción o infusión de la planta / Oral	Navajo	Bilatah ha.lcoi – Flores amarillas C'il dije-higi – Planta gomosa	1906-1931; 1933-1938	Wyman & Harris 1941:38
<b>DSGU</b>	Enfermedad del riñón	Decocción o infusión de la planta / Oral	Navajo	Bilatah ha.lcoi – Flores amarillas C'il dije-higi – Planta gomosa	1906-1931; 1933-1938	Wyman & Harris 1941:40

<b>DSGU</b>	Enfermedad del riñón (diurético)	Infusión de la planta / Oral	Navajo	Bilatah ha.lcoi – Flores amarillas C'il dije-higi – Planta gomosa	1906-1931; 1933-1938	Wyman & Harris 1941:38
<b>DSGU</b>	Problemas del riñón	Infusión caliente de la planta / Oral	Pueblo (“Western Keres”)	Koomaku Kana Kochinishi wawa – medicina amarilla Zinnia del desierto	1931-1932	Swank 1932:38
<b>DSGU</b>	Infección sexual (yiste'z)	Decocción o infusión de la planta / Oral	Navajo	Bilatah ha.lcoi – Flores amarillas C'il dije-higi – Planta gomosa	1906-1931; 1933-1938	Wyman & Harris 1941:38
<b>II</b>	Fiebre	Polvo de la planta seca	Zuni	Tu'na ikiapokia (ojos, poner en) – poner en los ojos Zinnia	1879	Stevenson 1915:45
<b>II</b>	Enfermedad	Decocción o infusión de	Navajo	Bilatah ha.lcoi –	1906-1931;	Wyman &

	venérea (diurético)	la planta / Oral		Flores amarillas C'il dije-higi – Planta gomosa	1933-1938	Harris 1941:38
<b>LS</b>	Moretones	Polvo humedecido de la planta seca / Tópico	Zuni	Tu'na ikiapokia (ojos, poner en) – poner en los ojos Zinnia	1879	Stevenson 1915:45
<b>DSM</b>	Detener sudoración excesiva	Infusión de la planta / Baño	Pueblo ("Western Keres")	Koomaku kana Kochinishi wawa – medicina amarilla Zinnia del desierto	1931-1932	Swank 1932:38
<b>DSM</b>	Sudoresis	Decocción o infusión de la planta / Oral	Navajo	Bilatah ha.lcoi – Flores amarillas C'il dije-higi – Planta gomosa	1906-1931; 1933-1938	Wyman & Harris 1941:40
<b>DSME</b>	Dolor pélvico (diurético)	Decocción o infusión de la planta / Oral	Navajo	Bilatah ha.lcoi – Flores amarillas	1906-1931; 1933-1938	Wyman & Harris 1941:38

				C'il dije-higi – Planta gomosa		
<b>DSR</b>	Problemas de nariz	Hierbas secas y pulverizadas / Aspirar	Navajo	Nii'ii'nilntahahíkiih (aspirar, grande) - Zinnia de las flores grandes	1936-1942	Elmore 1944:97
<b>DSR</b>	Problemas de nariz	Hierbas secas y pulverizadas / Inhalar, aspirar	Navajo	Ni'i'níl ntsáigi	Antes de 1910	Franciscan Fathers. 1910:112, 536
<b>DSR</b>	Problemas de garganta	Hierbas secas y pulverizadas	Navajo	Nii'ii'nilntahahíkiih (aspirar, grande) Zinnia de las flores grandes	1936-1942	Elmore 1944:97
<b>DTCSP</b>	Picazón causada por picaduras de hormigas rojas	Decocción o infusión de la planta / Tópico (loción; cataplasma Masticar hojas	Navajo	Bilatah ha.lcoi – Flores amarillas C'il dije-higi – Planta gomosa	1906-1931; 1933-1938	Wyman & Harris 1941:40
<b>DTCSP</b>	Llagas causadas por picaduras de	Decocción o infusión de la planta / Tópico	Navajo	Bilatah ha.lcoi – Flores amarillas	1906-1931; 1933-1938	Wyman & Harris 1941:40

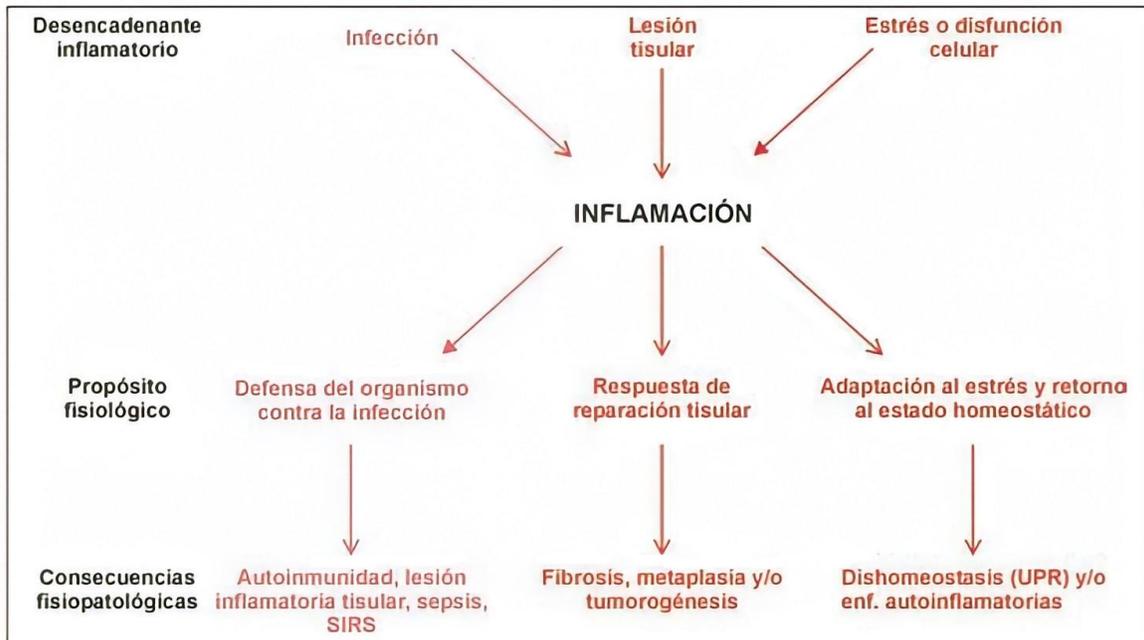
	hormigas rojas	Masticar hojas		C'il dije-higi – Planta gomosa		
<b>DSS</b>	Problemas de ojos	Infusión fría de flores trituradas / Lavado de ojos	Zuni	Tu'na ikiapokia (ojos, poner en) – poner en los ojos  Zinnia	1879	Stevenson 1915:45

DSD: Desórdenes del Sistema Digestivo; DSE: Desórdenes del Sistema Endocrino; DSGU: Desórdenes del Sistema Genitourinario; II: Infecciones e Infestaciones; LS: Lesiones; DSM: Desórdenes del Sistema Metabólico; DSME: Desórdenes del Sistema Músculo Esquelético; DSR: Desórdenes del Sistema Respiratorio; DTCSF: Desórdenes del Tejido Celular Subcutáneo de la Piel; DSS: Desórdenes del Sistema Sensorial.

Los estudios contemporáneos y las hierbas regionales en el suroeste de EE. UU. durante la última mitad del siglo XX no incluyen a *Z. grandiflora*. Los estudios etnobotánicos de la zinnia de las Montañas Rocallosas no lograron revelar su empleo en las comunidades rurales, ni encontrar su presencia en los mercados de hierbas o “boticas” de las comunidades hispanas (Bye y Linares, 1986). Ninguna de las cinco referencias estándar sobre la medicina herbolaria del suroeste incluye a *Z. grandiflora* (Ford, 1975; Moore, 1979; Kay, 1996; Curtin, 1997; Kane, 2011). En contraste, la documentación de la yerba del becerro en la fitoterapia popular del norte de México es relativamente reciente. Aunque botánicos con formación médica como F. A. Wislizenus, Josiah Gregg y Edward Palmer recolectaron especímenes de herbario de *Zinnia* en el norte de México entre 1847 y 1910, no fue sino hasta 1930 que se registró el primer reporte etnobotánico en Chihuahua (Zingg, 1932). El uso contemporáneo de la tepozana del burro incluye el tratamiento de la diarrea, aunque los consumidores la valoran más para el tratamiento de la diabetes (ejemplares: Bye 38402 y Linares; Bye 39042 y Linares; Bye 39131 y Linares).

### 1.3. Inflamación

La inflamación se puede definir como la respuesta no específica del huésped a una gran variedad de lesiones tisulares causadas por algún agresor de naturaleza biológica, química, física o mecánica (Cachofeiro Ramos *et al.*, 2004; García Barreno, 2008). Este proceso, aunque en principio presenta un proceso general e inespecífico encaminado a restaurar la homeostasis, puede derivar en diferentes escenarios según la causa desencadenante (**Figura 7**); por ejemplo, en ocasiones, se presenta de manera crónica, generalmente debido a la aparición de enfermedades degenerativas como artritis, arterioesclerosis, cáncer, entre otras (García Barreno, 2008).



**Figura 7.** Consecuencias fisiológicas del proceso de inflamación de acuerdo con el desencadenante inflamatorio. (García Barreno, 2008)

El proceso inflamatorio involucra la generación de interleucinas a partir de la IL-1 y el TNF $\alpha$ , 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 sustancia P y neuroquininas, que a su vez promueven la liberación de serotonina, 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 E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 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 (Eblen-Zajjur, 2005; García Barreno, 2008).

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). Más adelante en este trabajo se profundizará en la relación del proceso inflamatorio con la generación del dolor.

#### 1.4. El dolor y la nocicepción

La palabra dolor deriva etimológicamente de la raíz anglo-francesa *peine* que significa dolor o sufrimiento, del latín *poena* que significa pena o castigo, y a su vez del griego *poine* que significa pago, pena o recompensa. El dolor generalmente cumple una función adaptativa que responde a un mecanismo de defensa o señal de alarma para proteger al organismo; sin embargo, puede tener efectos adversos sobre la función y el bienestar tanto social como psicológico, pues el dolor es siempre una experiencia personal, influenciada en varios niveles por factores biológicos, psicológicos y sociales. La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés) lo define como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con, o parecida a la vinculada con, daño tisular real o potencial. Anteriormente, se

consideraba la expresión verbal como un comportamiento imprescindible para la expresión del dolor, sin embargo, hoy en día se sabe que la imposibilidad de comunicación no niega la posibilidad de que tanto humanos como animales no humanos experimenten dolor (Romera *et al.*, 2000; IASP, 2022).

Lo anterior lleva a considerar al dolor y la nocicepción como fenómenos distinguibles entre sí, ya que el dolor no puede ser inferido únicamente a partir de la actividad de las neuronas sensoriales. 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); sin embargo, al ser una experiencia sensorial multidimensional, el dolor tiene un fuerte componente cognitivo y emocional (Woolf, 2004). La nocicepción, en cambio, se refiere al proceso neuronal únicamente, mediante el cual se perciben los estímulos nocivos o potencialmente dañinos contra los tejidos, a través de la codificación y procesamiento de estos (Woolf, 2004; Ang, Ariffin y Khanna, 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, 2007; Barrot, 2012). Por lo tanto, podemos inferir que, aunque el dolor y la nocicepción son fenómenos distintos, también que se encuentran íntimamente relacionados, por lo que es posible estudiar los padecimientos dolorosos a partir de modelos animales o celulares que mimeticen los procesos nociceptivos.

#### 1.4.1. Clasificación del dolor

El dolor se clasifica generalmente en dos categorías (Woolf, 2004):

- Dolor adaptativo: Es aquel que contribuye a la supervivencia y protección del organismo de lesiones o promoviendo la curación cuando la lesión ha ocurrido.

- Dolor maladaptativo: Al contrario del dolor adaptativo, es una expresión de una operación patológica o anormal del sistema nervioso; en otras palabras, es el dolor como enfermedad. Usualmente este tipo de dolor es persistente o recurrente.

Desde el punto de vista de los mecanismos neurobiológicos del dolor, este se puede clasificar en cuatro tipos (**Figura 8**) (Woolf, 2004):

- Dolor nociceptivo: Es la primera línea de defensa que actúa como dispositivo de alerta o sistema de alarma que anuncia la presencia de un estímulo potencialmente dañino.
- Dolor inflamatorio: Ocurre a partir del daño real a los tejidos, y como una consecuencia de la respuesta inflamatoria subsecuente, presentándose un incremento de la sensibilización de las neuronas aferentes primarias a causa de los mediadores pro e inflamatorios liberados en el sitio de la lesión. Este tipo de dolor también es adaptativo y generalmente disminuye al desaparecer la lesión y la respuesta inflamatoria.
- Dolor neuropático: Es el resultado de lesiones al sistema nervioso periférico que pueden ser ocasionadas, entre otras, por pacientes con diabetes, polineuropatía por virus del SIDA, neuralgia posherpética, o radiculopatía lumbar; o lesiones en el sistema nervioso central (SNC), por ejemplo, en pacientes con lesión en la médula espinal, esclerosis múltiple o accidente cerebrovascular.
- Dolor funcional: En este tipo de dolor no se puede detectar anomalías periféricas o déficit neurológico; el dolor es ocasionado, por una respuesta o función anormales del sistema nervioso en donde la sensibilidad pronunciada del aparato sensorial amplifica los síntomas. Algunos de los padecimientos que caen en esta categoría son la fibromialgia, el síndrome de colon

irritable, algunas formas de dolor de pecho no cardíaco, y cefaleas tensionales.

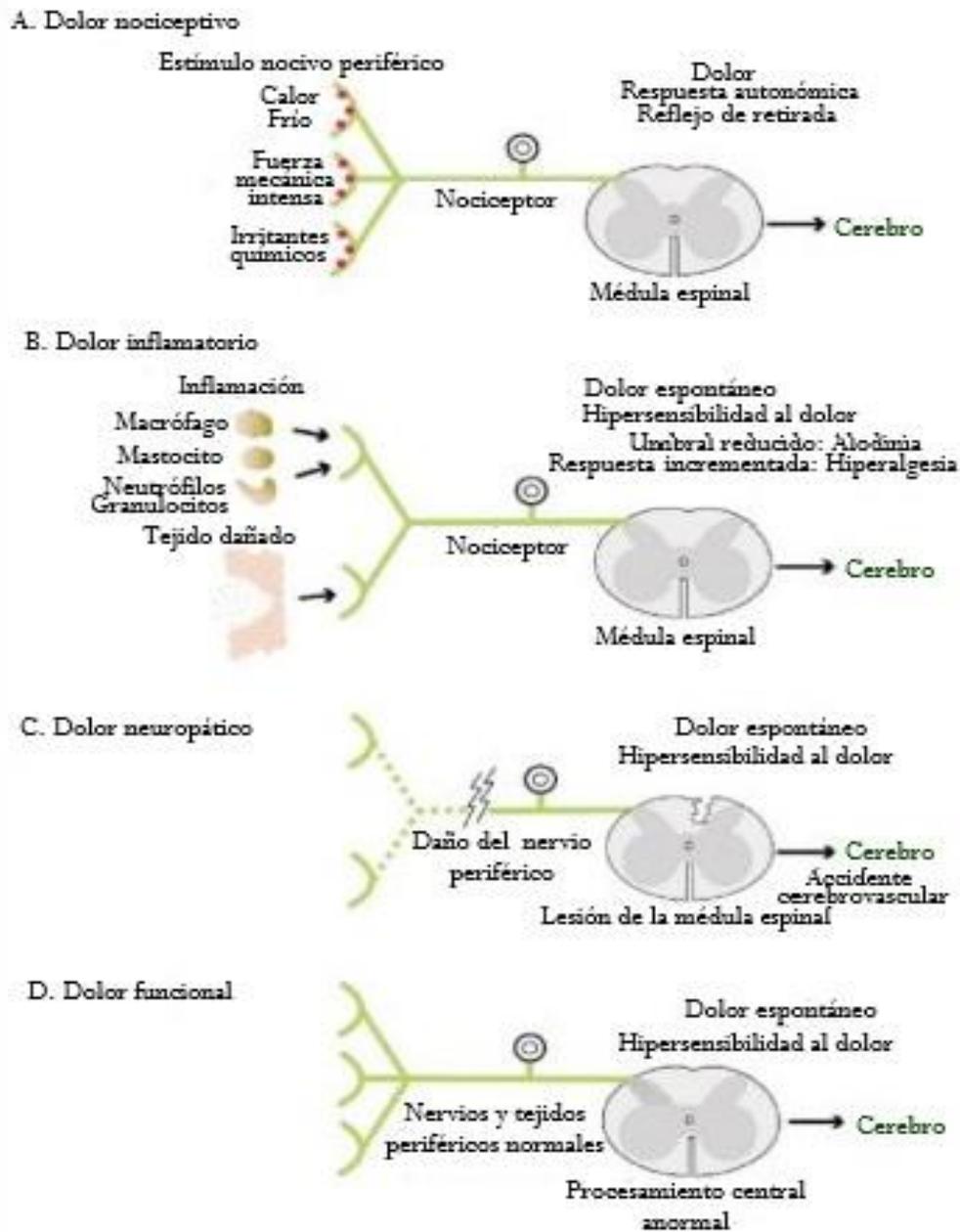


Figura 8. Los cuatro tipos de dolor primarios. Tomado de Woolf (2004) y traducido al español.

En los estudios previos realizados por este mismo grupo de investigación, sobre el potencial de *Z. grandiflora* en el tratamiento del dolor en el modelo de la formalina, revelaron que el extracto acuoso de la planta, las fracciones orgánicas de acetato de etilo y diclorometano obtenidas por reparto de la infusión, además de la zinagrandinólida E, presentan actividad antinociceptiva en ambas fases del modelo, sin embargo, el efecto es más notorio en la segunda fase, para todas las muestras ensayadas (Reyes-Pérez *et al.*, 2019). El modelo de la formalina involucra mecanismos propios del dolor nociceptivo en su primera fase (0 – 10 min) al estimular directamente los nociceptores; y del dolor inflamatorio en su segunda fase (15 – 60 min), al sensibilizar a los nociceptores tras comenzar un proceso inflamatorio (Dubuisson y Dennis, 1977; Barrot, 2012). Por lo anterior, este trabajo se centra en estudiar con mayor profundidad, el efecto de *Z. grandiflora* y sus compuestos sobre el dolor inflamatorio, y adicionalmente sobre el dolor de tipo neuropático con la finalidad de ampliar el panorama sobre el potencial de *Z. grandiflora* en el tratamiento de padecimientos dolorosos.

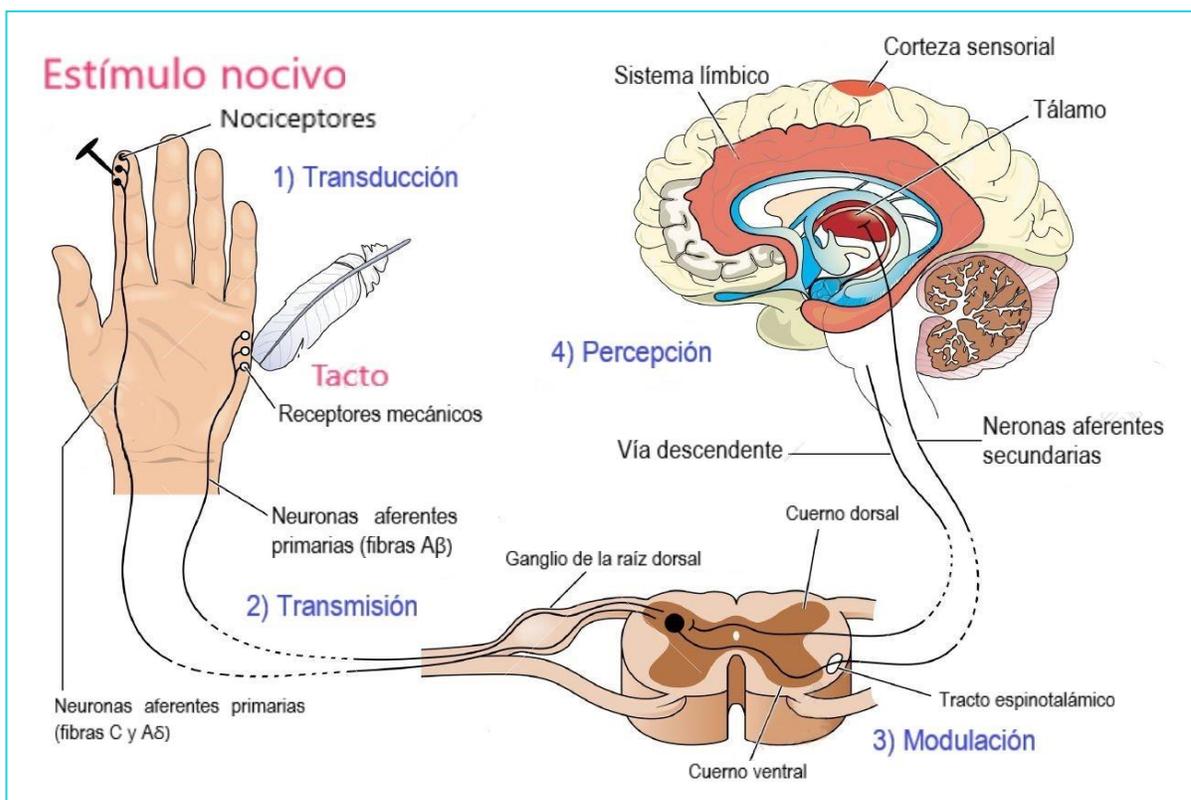
#### 1.4.2. Neurofisiología y mecanismos del dolor

Hasta la fecha, se han identificado múltiples mecanismos que pueden producir dolor, entre los cuales se incluyen la nocicepción, la sensibilización periférica, interruptores fenotípicos, sensibilización central, excitabilidad ectópica, organización estructural y disminución de los mecanismos de inhibición (Woolf, 2004).

Desde el punto de vista neurofisiológico, la percepción del dolor precisa de la participación de ambos sistemas nerviosos, central y periférico, desde la activación y sensibilización de los nociceptores periféricos hasta la integración de las señales nociceptivas en centros superiores como el tálamo o el córtex. Por lo tanto, los cambios bioquímicos en la transmisión o modulación del dolor se

pueden agrupar en tres niveles: periférico, medular y central. (Romera *et al.*, 2000).

La nocicepción es el proceso neuronal de codificar estímulos nocivos, y en el que la sensación dolorosa no está necesariamente implicada (IASP, 2022); este es el único mecanismo que causa dolor nociceptivo e involucra los procesos de transducción, conducción transmisión y percepción, tal como se ilustra en la **Figura 9**.



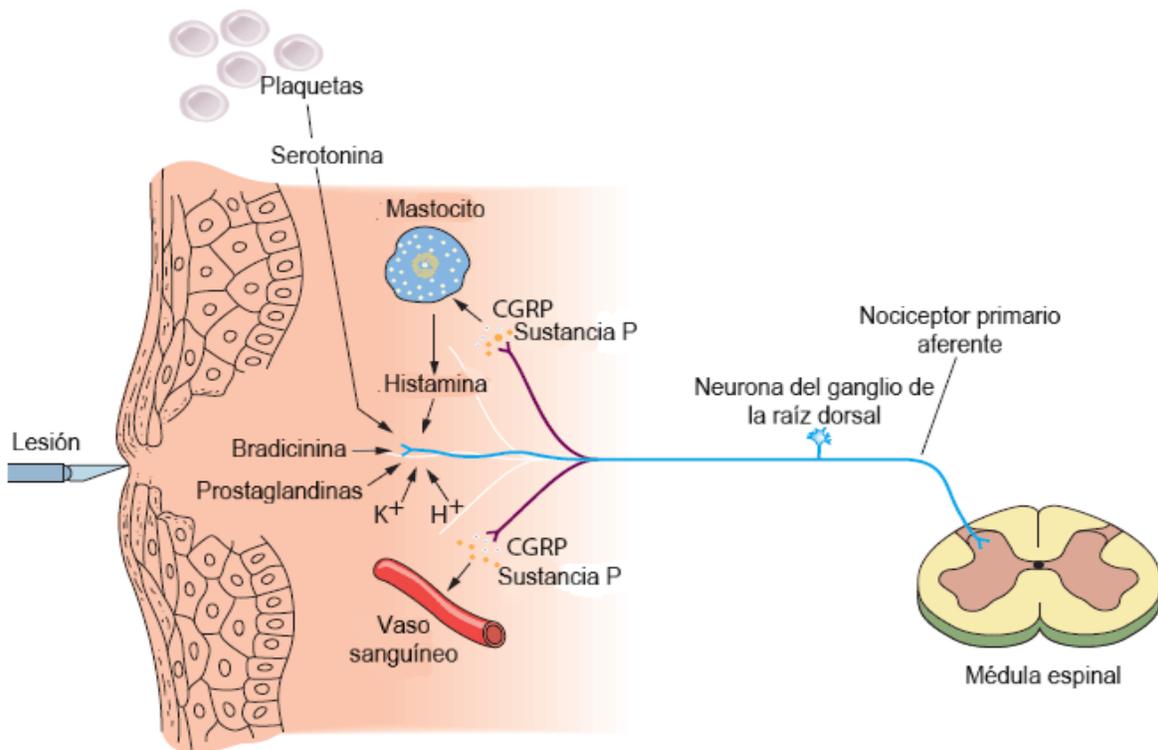
**Figura 9.** Proceso fisiológico del dolor. 1) Transducción: El estímulo nociceptivo (térmico, mecánico o químico) se transforma en potenciales de acción en las terminales de las fibras aferentes periféricas. 2) Transmisión: los potenciales de acción viajan a través de la vía aferente primaria hasta 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).

Este proceso inicia a nivel periférico con la activación de un conjunto de neuronas sensitivas primarias altamente especializadas, llamadas

nociceptores, 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); y cuya función principal es diferenciar los estímulos inocuos de los nocivos, y codificar estos últimos para llevar a cabo su transmisión hacia la vía central (Besson y Chaouch, 1987). Los nociceptores se distinguen por la velocidad de la transmisión de las señales nociceptivas, lo que a su vez depende del diámetro de los axones de las neuronas sensoriales. La mayoría de los nociceptores tienen un diámetro pequeño con axones amielínicos, llamados fibras C, las cuales poseen una velocidad de conducción de 0.4 – 1.4 m/s; sin embargo, el dolor inicial de aparición rápida está mediado por las fibras A – en su mayoría las fibras A $\delta$  –, cuyos axones mielinizados soportan velocidades de conducción de aproximadamente 5 – 30 m/s (Dubin y Patapoutian, 2010).

La estimulación de los nociceptores puede desencadenar una respuesta nociceptiva y otra de sensibilización. Esta última se activa cuando diversos mediadores ejercen una acción excitatoria prolongada o, dicho de otra forma, cuando un mayor número de potenciales de acción se producen en las terminales nerviosas, como sucede cuando un proceso de inflamación está instaurado en el sitio de la lesión (Woolf, 2004). Los nociceptores son neuronas excitatorias que liberan glutamato como neurotransmisor primario, así como otras sustancias, incluyendo péptidos (sustancia P, péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP), y somatostatina) (Basbaum *et al.*, 2009). Sin embargo, cuando ocurre una lesión, las células dañadas liberan su contenido intracelular, mientras que otras células median el proceso inflamatorio, promoviendo la liberación de mediadores como bradicinina, citocinas, eicosanoides, serotonina, noradrenalina, histamina, iones K<sup>+</sup> e hidrógeno H<sup>+</sup>, entre otras, que en primer lugar activan la terminal nociceptora y producen dolor, para después sensibilizarla, produciendo hiperalgesia (Woolf, 2004; Eblen-Zajjur, 2005). Este proceso de sensibilización de las fibras nociceptoras

es el que da lugar al dolor de tipo inflamatorio, el cual se ilustra en la **Figura 10**.



**Figura 10.** Mecanismo de sensibilización de los nociceptores. (Modificado de: Nestler, E.J., et al. *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience*, 3rd Edition: [www.neurology.mhmedical.com](http://www.neurology.mhmedical.com)).

A nivel de la médula espinal se modulan las respuestas nociceptivas que se producen tras la activación de los nociceptores periféricos. El asta dorsal de la médula espinal permite el primer nivel de integración en el SNC, aquí se dirige la información a través de las vías ascendentes mediante una transmisión sináptica lenta y rápida, mediada principalmente por glutamato y péptidos –como la sustancia P y con CGRP–, respectivamente; y también se ejerce el control eferente a través de las vías descendentes, activado por una fuerte despolarización GABAérgica / glicinérgica de las terminales presinápticas para producir respuestas vegetativas como motoras (Dubin y Patapoutian, 2010).

Las terminales centrales de las fibras nociceptoras periféricas ingresan en el SNC a través de la asta dorsal de la médula espinal. Las fibras A $\delta$  inervan principalmente la lámina I, mientras que los nociceptores de fibras C peptidérgicas y la mayoría de los nociceptores de fibras C no peptidérgicas terminan en las interneuronas de la lámina interna II. Las láminas III y V, más profundas, reciben los estímulos de las fibras mielínicas A $\beta$  de mayor diámetro, que normalmente transmiten impulsos sensitivos inocuos. Las neuronas de amplio rango dinámico de la lámina V, también reciben estímulos de aferentes primarios no nociceptivos y de los nociceptores A $\delta$ , así como impulsos indirectos de las fibras C que terminan en la lámina II. Las neuronas de la lámina I y V se proyectan a lo largo de los tractos espinotalámicos y espinoreticulotalámicos hasta sitios supraespinales como el tálamo, el núcleo parabrancial, y la amígdala, donde las señales nociceptivas son procesadas y enviadas a centros superiores corticales, como el córtex cerebral (Basbaum *et al.*, 2009; Ossipov, 2012).

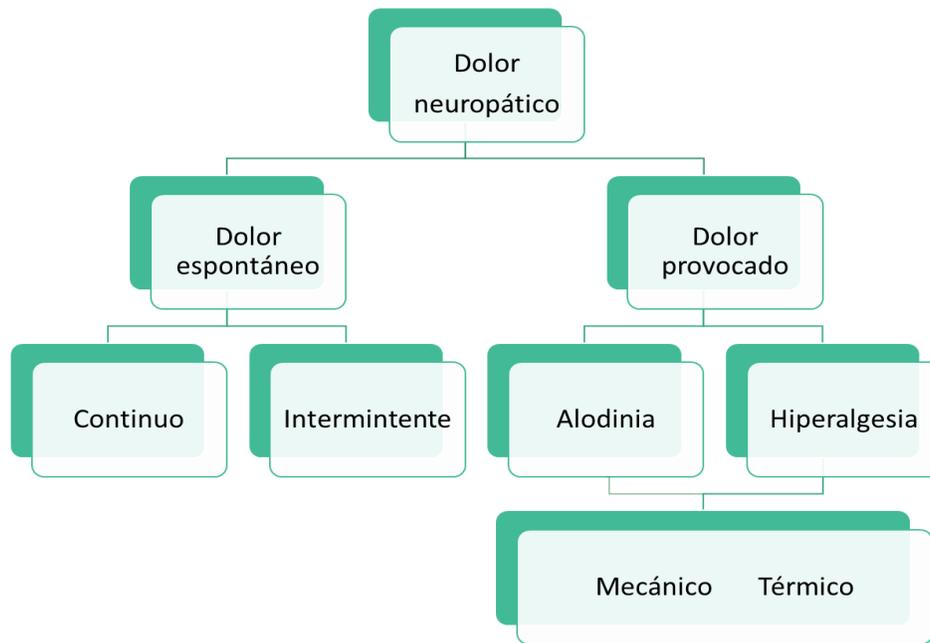
De la misma forma que las terminales periféricas de los nociceptores se pueden sensibilizar, también es posible la sensibilización de las neuronas encargadas de la transmisión nociceptiva a nivel central en el asta dorsal de la médula espinal o en el núcleo espinal del trigémino (Woolf, 2004). La sensibilización central se refiere al proceso a través del cual se establece un estado de hiperexcitabilidad en el SNC, que resulta en nocicepción aumentada (hiperalgesia) y dolor provocado por estímulos que normalmente no son nocivos (alodinia) (Ossipov, 2012). En general, las alteraciones involucradas en la sensibilización central son similares a las que producen la sensibilización periférica. Estos dos tipos de sensibilización son la expresión de la plasticidad del sistema nervioso, que en cuestión de segundos después de un influjo masivo de información sensorial debido a daños en tejidos o nervios, comienza una respuesta hiperreactiva de las neuronas de la médula espinal (Woolf and Salter, 2000). Aunque se han descrito numerosos mecanismos implicados en la

sensibilización central, se pueden destacar tres: la hipersensibilidad mediada por la alteración en la neurotransmisión glutamatérgica / receptores N-metil-D-aspartato (NMDA); la pérdida de los controles inhibitorios tónicos (desinhibición); y las interacciones entre las neuronas y las células gliales (Basbaum *et al.*, 2009).

### 1.4.3. El dolor neuropático

El dolor neuropático es un grupo heterogéneo de condiciones dolorosas crónicas causadas por lesión o afecciones del sistema somatosensorial. Las causas más comunes del dolor neuropático incluyen la polineuropatía dolorosa –por ejemplo, la causada por diabetes–, neuralgia posherpética, lesión de nervio periférico, radiculopatía, dolor relacionado con cáncer y dolor central posterior a accidente cerebrovascular (Finnerup, Sindrup y Jensen, 2010; Jensen *et al.*, 2011). Este tipo de dolor crónico comúnmente tiene un impacto negativo en la salud mental del paciente, al estar asociado con sufrimiento, incapacidad y disminución de la calidad de vida (Board, 2010). Aunado a todo lo anterior, las terapias actuales para tratar el dolor neuropático no son del todo satisfactorias, ya que más de dos tercios de los pacientes con este tipo de dolor, no obtienen suficiente alivio de este (Finnerup, Sindrup y Jeynsen, 2010).

El dolor neuropático se puede clasificar como periférico (cuando se origina por un daño en los nervios periféricos, el plexo, la raíz del ganglio dorsal) o central (cuando se origina por daño en el cerebro o en la médula espinal). Este tipo de dolor se caracteriza por dolor espontáneo o provocado (**Figura 11**), y otros síntomas como parestesias, disestesias, paresia motora, calambres musculares, entre otros (Board, 2010).



**Figura 11.** Componentes del dolor neuropático (Board, 2010).

El principal tratamiento del dolor neuropático consiste en la administración de fármacos antidepresivos y antiepilépticos, en vista de que los analgésicos comunes no presentan eficacia para el alivio de este tipo de dolor (Board, 2010). Los gabapentinoides, pregabalina y gabapentina, han sido la piedra angular del tratamiento del dolor neuropático, y se asume que su mecanismo de acción se debe a la depresión del potencial excitatorio presináptico en las neuronas de la raíz dorsal, por interacción directa con las subunidades  $\alpha\delta$ -1 de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes del voltaje, las cuales son reguladas positivamente después de una lesión (Chincholkar, 2018). Los fármacos opioides, por su parte, también han sido utilizados para el tratamiento del dolor neuropático, y aunque su eficacia es comparable a los gabapentinoides, gabapentina y pregabalina, no son considerados como fármacos de primera elección a causa de sus efectos secundarios, tolerancia, eficacia, seguridad, entre otros. Otros fármacos útiles para el tratamiento del dolor neuropático incluyen ciertos antidepresivos tricíclicos, inhibidores de la recaptura de serotonina-noradrenalina y lidocaína tópica; sin embargo, en

todos los casos mencionados, los pacientes pueden experimentar alivio parcial o ningún alivio a dosis tolerables (Finnerup, Sindrup y Jensen, 2010), por lo que resulta importante continuar con la búsqueda de nuevas moléculas capaces de producir alivio de este tipo de dolor con mayor eficacia y menos efectos secundarios.

### 1.5. Modelos para el estudio del dolor en roedores

Los estudios del dolor en humanos tienen sus limitaciones, debido a que son difíciles de llevar a cabo, son subjetivos, y están limitados por consideraciones éticas, lo que ha llevado a un extenso uso de modelos animales para el estudio del dolor, siendo los ratones y ratas, las especies animales más comunes para este propósito (Deuis, Dvorakova y Vetter, 2017). A pesar de que existe cierto grado de incertidumbre respecto a la validación de la antropomorfización del dolor en animales, sin duda, la nocicepción y la habilidad para detectar un estímulo potencialmente dañino, es una función fisiológica fundamental en los mamíferos y, ciertamente en otras especies. Por lo tanto, resulta un factor clave la distinción entre la nocicepción y el dolor, ya que no es posible medir directamente el dolor en animales, solo respuestas nociceptivas o antinociceptivas (Sandkühler, 2009).

Los modelos de comportamiento en roedores representan importantes herramientas para el entendimiento de la fisiología subyacente a la nocicepción y el dolor, así como para el análisis de los mecanismos farmacológicos detrás de los fármacos analgésicos (Minett, Eijkelkamp y Wood, 2014). 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 (Barrot, 2012; Ang, Ariffin

y Khanna, 2017). En la **Tabla 3** se sintetizan los modelos contemporáneos más comunes para el estudio del dolor en animales (Sandkühler, 2009).

El dolor provocado por un estímulo puede describirse tanto por el término de hiperalgesia como por alodinia, y posteriormente puede subdividirse con base en la modalidad del estímulo: mecánico, térmico (frío o calor) o químico. La hiperalgesia se define como el incremento o respuesta dolorosa exagerada ante un estímulo normalmente nocivo; mientras que la alodinia se define como la respuesta dolorosa ante un estímulo inocuo (Deuis, Dvorakova y Vetter, 2017). En la actualidad existen diversos métodos para la evaluación de la hiperalgesia y la alodinia que se aplican ampliamente en diversos modelos para el estudio del dolor en animales, los más comunes se resumen en la **Tabla 4** (Sandkühler, 2009).

En este trabajo se utilizará el método manual “arriba-abajo” de Von Frey para la evaluación de la alodinia mecánica, el cual consiste en determinar la fuerza mecánica requerida para generar la retirada de la pata del 50% de los animales basado en la fórmula estadística para calcular la dosis letal media ( $DL_{50}$ ). (Deuis, Dvorakova y Vetter, 2017)

**Tabla 3.** Modelos animales de dolor. (Sandkühler, 2009)

Relevancia humana / Enfermedad	Mecanismo principal del modelo	Método de inducción	Nombre del modelo (más común)	Comportamientos
Inflamación periférica e inflamación neurogénica periférica	Estimulación química de los aferentes primarios	Inyección de un agente inflamatorio en la pata trasera	Adyuvante completo de Freund (CFA) Carragenina Aceite de mostaza Veneno de abeja Formalina Capsaicina	Retirada de pata trasera, lamida, levantamiento Retirada de pata trasera, lamida en dos fases Retirada de pata trasera
Artritis	Inflamación	Inyección de mediador inflamatorio en articulación o cola	Monoartritis inducida por adyuvante Poliartritis inducida por adyuvante	Postura, andar alterado, dolor espontáneo Otros cambios sistémicos
Dolor postoperatorio	Trauma quirúrgico mecánico	Cirugía	Modelo por incisión Ovariohisterectomía	Posturas abdominales
Quemadura de sol, quemadura	Daño celular por irradiación o lesión térmica	UV-B (290–320 nm) irradiación dermal o aplicación de calor nocivo prolongado en la piel	Modelo UV Modelo de quemadura o lesión térmica	

Lesión por isquemia/reperfu sión, síndrome doloroso regional complejo, síndrome compartimental, enfermedad isquémica periférica	Isquemia	Isquemia temporal de la pata trasera y reperusión u oclusión vascular	Dolor crónico postisquemia	
Dolor neuropático, síndrome doloroso regional complejo, ligadura de nervio	Lesión traumática del nervio	Varios métodos (constricción, ligadura, transección) para lesionar nervios periféricos (espinal, ciático, safeno) o nervios faciales (trigeminal, mental)	Lesión por constricción crónica (LCC) Ligadura de nervio espinal Ligadura parcial de nervio ciático Lesión de nervio compartido (SNI) Aplastamiento del nervio ciático Crioneurolysis Fototoxicidad Lesión del nervio distal Transección completa del nervio	Protección de la pata trasera, soporte de peso alterado Lamida de pata trasera, levantamiento Protección de la pata trasera y lamida Protección de la pata trasera y soporte de peso alterado Autonomía, hiperestesia Autonomía
Neuralgia	Lesión	Varios métodos de lesión	Lesión del nervio	

trigeminal	traumática del nervio	infraorbital (LCC, lesión isquémica) o ganglios trigeminales	infraorbital Compresión de los ganglios trigeminales	
Inflamación de la articulación temporomandibular o dolor orofacial	Inflamación orofacial	Inyección aguda de agentes inflamatorios (adyuvante completo de Freund, carragenina) en la articulación temporomandibular o en la cara.	Dolor en la articulación temporomandibular o dolor orofacial	Acicalamiento facial o rascarse
Neuropatía diabética, neuralgia postherpética, polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria aguda	Neuropatía secundaria	Administración de estreptozotocina para inducir diabetes, inoculación con virus del herpes simple tipo I, inmunización con péptido P2 de mielina periférica	Diabetes inducida con estreptozotocina Inoculación con virus del herpes simple Neuritis autoinmune experimental	
Dolor por cáncer	Compresión e inflamación del tejido por células cancerígenas	Intramedular, intraplantar, o inyección intragingival de células cancerígenas	Sarcoma osteolítico experimental Carcinoma experimental de células escamosas Melanoma experimental	Hiperalgnesia muscular
Síndrome de intestino irritable	Dolor visceral	Inyección de irritantes en órganos cavernosos o distensión mecánica visceral	Inyección de ácido acético, capsicina, aceite mostaza, turpentina, zimosano en órganos cavernosos	Contracciones abdominales u otros comportamientos nociceptivos viscerales,

				hiperalgesia referida
Dolor muscular	Acidosis periférica	Inyección de ácido en los músculos gastrocnemios	Dolor muscular	
Fiebre, enfermedades inflamatorias del sistema nervioso central	Activación generalizada del sistema inmunológico	Administración sistémica, intratecal o central de lipopolisacáridos/ mediadores inflamatorios	Síndrome de enfermedad 'Sickness syndrome'	Manifestaciones no específicas de inflamación e infección (fiebre, somnolencia)
Dolor neuropático producido por lesión de la médula espinal	Lesiones de la médula espinal	Contusión isquémica o traumática, compresión, transección de la médula espinal	Lesión de la médula espinal	
Dolor neuropático, neuritis	Neuritis	Inyección aguda o perineuronal de agentes inflamatorios directamente en los nervios	Neuritis ciática inflamatoria	
Migraña	Varios	Varias manipulaciones: neurovascular, eléctrica, genética	Varias	Varias mediciones de dolor espontáneo
Dolor neuropático inducido por fármacos		Administración sistémica de agentes terapéuticos utilizados clínicamente	Agentes quimioterapéuticos (vincristine, paclitaxel) Agentes antiretrovirales	

**Tabla 4.** Métodos para evaluar la hiperalgesia y la alodinia. (Sandkühler, 2009)

Modalidad	Nombre del ensayo	Método ensayado	Lugar de aplicación	Parámetro de resultado
Mecánica	von Frey	Aplicación de filamentos calibrados estáticos no nocivos en la piel	Pata trasera, cara	Umbral de fuerza para generar el retiro de la pata (alodinia estática mecánica)
	Randal Sellito	Aplicación de fuerza mecánica en incremento linearen un rango nocivo para la piel	Pata trasera	Umbral de fuerza para generar el retiro de la pata con un estímulo nocivo (hiperalgesia mecánica)
	Sin nombre	Cepillado inocuo, acariciando la piel	Pata trasera	Tiempo de latencia para generar el retiro de pata o comportamientos nociceptivos (alodinia mecánica dinámica)
	Sin nombre	Estimulación mecánica nociva a las visceras	Órganos viscerales (colon, vejiga)	Umbral o número o fuerza de la contracción de músculos, respuestas autonómicas (hiperalgesia)
Calor	Retirada de cola	Aplicación de calor radiante en la cola o inmersión de la cola en agua caliente	Cola	Tiempo de latencia para generar el retiro de cola (hiperalgesia por calor)
	Aparato de Hargreaves	Aplicación de calor radiante en la piel	Pata trasera	Tiempo de latencia para generar comportamiento nociceptivo o escape (hiperalgesia por calor)
	Placa caliente	Animal colocado en placa metálica caliente	Pata trasera (pata delantera)	Tiempo de latencia para generar retiro de la pata (hiperalgesia por calor)
Frío	Acetona	Aplicación de acetona en la piel	Pata trasera	Duración/intensidad del comportamiento nociceptivo (hiperalgesia por frío)

	Placa fría	Animal colocado en placa metálica fría	Pata trasera	Tiempo de latencia para generar comportamiento nociceptivo o escape (hiperalgesia por frío)
	Agua fría	Animal colocado en la superficie de un baño de agua fría	Pata trasera	Tiempo de latencia, duración e intensidad para generar comportamiento nociceptivo o escape (hiperalgesia por frío)
Eléctrica	Sin nombre	Aplicación de corriente eléctrica	Varios: cola, pata, vísceras, pulpa dental	Umbral de retirada, vocalizaciones, latencia de escape (alodinia)

### 1.5.1. Modelo del edema de pata inducido por carragenina

El modelo del edema de pata inducido por carragenina introducido por Winter y colaboradores (1962), ha sido utilizado ampliamente para la evaluación de fármacos antiinflamatorios, así como para el estudio de los mecanismos subyacentes a la inflamación.

La carragenina es un mucopolisacárido derivado de algas rojas del género *Chondrus*, que consiste en una mezcla de monómeros de tres tipos principales: lambda, kappa, e iota. La inyección de carragenina produce una respuesta inflamatoria aguda que no es inmune, no causa efectos sistémicos y es altamente reproducible. Los signos de inflamación como edema, eritema e hiperalgesia se producen inmediatamente después de la inyección de la carragenina, resultado de la producción de agentes proinflamatorios como bradicinina, histamina, taquicinas, prostaglandinas, complemento y especies reactivas de nitrógeno y oxígeno (Winter, Risley and Nuss, 1962a; Morris, 2003a). Otras características de la respuesta inflamatoria aguda son el incremento de la permeabilidad vascular y la infiltración de células que llevan

a la formación del edema, cuya respuesta es bifásica en ratones. La primer fase se caracteriza por una respuesta inflamatoria temprana que dura 6 horas, generando un tamaño de edema que se relaciona con la dosis de carragenina utilizada; mientras que la segunda fase se desarrolla después de las 24 horas, con un edema que tiene un máximo de inflamación entre las 48 y 72 horas, y que disminuye después de 96 horas (Posadas *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2006).

Por otro lado, se ha demostrado que la carragenina produce un periodo de hiperexcitabilidad (hiperalgesia o alodinia) a estímulos térmicos o mecánicos con un pico entre las 2 a 3 horas después de su inyección. Esta respuesta hipernociceptiva involucra mecanismos centrales relacionados con la sensibilización de las neuronas de la médula espinal, ocasionada por la lesión al tejido y/o la intensa activación de las fibras C nociceptoras (Field *et al.*, 1997).

En este estudio se utilizó este modelo para el estudio de las propiedades tanto antiinflamatorias como antinociceptivas de *Z. grandiflora*. Para ello se utilizó un pletismómetro para medir el volumen de la pata de los ratones (inflamación), y los filamentos de von Frey para la medición de la alodinia mecánica producida por la carragenina.

### 1.5.2. Modelo de neuropatía diabética inducida con estreptozotocina

La diabetes mellitus (DM), tanto tipo I y como tipo II, es una de las principales causas de neuropatía en el mundo; y ésta a su vez, es la complicación crónica más común de la DM (Wattiez y Barrière, 2012; Hutapea *et al.*, 2022). Por esta razón, el desarrollo de modelos experimentales sobre neuropatía diabética ha sido fundamental para el entendimiento de su fisiopatología. Estos modelos intentan acercarse, tanto como sea posible, a la

sintomatología y/o etiopatogenia clínica de la neuropatía diabética, y usualmente se aplican para evaluar el potencial de nuevos fármacos (Wattiez y Barrière, 2012). Algunos de los modelos experimentales más utilizados para estudiar la neuropatía diabética son aquellos que utilizan químicos para la inducción pancreatectomía en animales, principalmente ratas y ratones. En este sentido, las sustancias químicas más utilizadas son los análogos de la glucosa: aloxano (un derivado de la pirimidina), y la estreptozotocina (un agente alquilante y antimicrobiano) (Wattiez y Barrière, 2012).

En esta investigación se utilizó el modelo de inducción de DMT1 para la generación de neuropatía diabética con estreptozotocina (STZ), ya que este ha probado ser más efectivo y reproducible que el modelo que utiliza aloxano. La STZ es un compuesto producido naturalmente por la bacteria *Streptomyces achromogenes*, que presenta un amplio espectro de propiedades antibacteriales, por su alta toxicidad a través de la alquilación del ADN (Eleazu *et al.*, 2013). En mamíferos, en efecto tóxico de la STZ involucra su transporte al interior de la célula, debido al residuo de glucosa en su estructura química que permite su ingreso, principalmente a las células beta pancreáticas, a través del transportador GLUT2. Una vez dentro de la célula, la STZ induce la sobreestimulación de la producción de ADP-polimerasa (en un intento por reparar el daño al ADN), causando el decremento en la concentración de NAD<sup>+</sup> y de ATP lo que, a su vez, conlleva a la activación de una apoptosis programada que destruye las células pancreáticas, y todas las células que expresan el transportador GLUT2 en hígado y riñones (Wattiez y Barrière, 2012; Eleazu *et al.*, 2013).

El modelo de STZ es apropiado para la ensayar los mecanismos de la diabetes, ya que mimetiza muchas de las complicaciones agudas y crónicas de esta enfermedad, incluyendo la neuropatía diabética. Este modelo, caracterizado por una hiperglicemia crónica en los animales administrados, puede causar neuropatía por diversos mecanismos propuestos que involucran

glucotoxicidad en fibras nerviosas periféricas, entre los cuales se encuentran: la ruta de los polioles, glicación de proteínas y la expresión de receptores de productos finales de glicación avanzada, así como, estrés oxidativo (Wattiez y Barrière, 2012). La hiperalgesia inducida por STZ puede ser ensayada en estudios de comportamiento, principalmente en ratones y ratas, en donde se mide el tiempo de latencia o el umbral de retirada de la pata o cola del animal que ha sido expuesta a un estímulo, ya sea térmico, mecánico o táctil. En este trabajo, se utilizaron los filamentos de Von Frey, para producir un ligero toque estático que produce la retirada en la pata de los ratones de estudio, provocado por la activación inapropiada de las fibras C o A $\delta$ , que corresponde a un signo de alodinia táctil.

### 1.5.3. Modelo de ligadura de nervios espinales L4/L5 en ratones

Los modelos de ligadura de nervios en roedores han jugado un papel crucial desde la década de los 90's para el entendimiento de los mecanismos neurobiológicos del dolor neuropático. De estos, los tres más utilizados son: el modelo de ligadura de los nervios espinales L5 y L6 (LNE), el modelo de lesión por constricción crónica (LCC), y la ligadura parcial del nervio ciático (LPN) (Kiso *et al.*, 2008). El modelo LNE en ratas es ampliamente aceptado y confiable para la generación del dolor neuropático; sin embargo, existen pocos reportes de este modelo en ratones debido a las dificultades de la cirugía en estos animales mucho más pequeños. Recientemente se ha reportado una modificación del modelo original en ratas LNE, adaptado para ligar los nervios L4 y L5 en ratones, por la mayor facilidad para localizar y ligar estos nervios durante el proceso quirúrgico. Este modelo ha demostrado producir comportamientos del dolor neuropático consistentes y robustos, por lo que se considera adecuado para la investigación de mecanismos de dolor neuropático, así como para ensayar nuevos analgésicos (Ye *et al.*, 2015).

Una de las mayores fortalezas de este modelo es que la anatomía de los ratones con cinco vértebras lumbares es homóloga a la anatomía humana; así como el patrón de distribución de los nervios espinales L4 y L5 de en los miembros inferiores de los murinos, mimetizan el patrón de distribución conocido en la anatomía humana; además de la ya conocida similitud genética entre ratones y humanos (Ye *et al.*, 2015). El modelo LNE produce alodinia mecánica a largo plazo, la cual es sostenida

## 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 por varias razones, entre las que se encuentran, 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).

La presente investigación pretende determinar el potencial antinociceptivo, antiinflamatorio y antidiabético a nivel preclínico *Z. grandiflora*, con el objetivo de aportar evidencias farmacológicas que respalden las propiedades que se le atribuyen en diversas comunidades indígenas del sur de los Estados Unidos de América del Norte, y en los estados mexicanos de Chihuahua, Coahuila, Sonora y Tamaulipas. También se pretende determinar la actividad de algunos de sus principios activos; así como, sentar las bases que permitan definir algunas de las pruebas de identidad y composición de esta especie medicinal.

### 3. HIPÓTESIS

---

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

## 4. OBJETIVOS

---

### 4.1. Objetivo general

Establecer la eficacia, seguridad y pruebas de calidad de la especie medicinal *Zinnia grandiflora* con el propósito de garantizar su uso racional como agente analgésico, antiinflamatorio y antidiabético.

### 4.2. Objetivos específicos

- Caracterizar los principios activos aplicando las técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales.
- Estudiar el potencial antinociceptivo y antiinflamatorio de los compuestos volátiles de la especie en estudio.
- Establecer el efecto potencial antinociceptivo y antiinflamatorio, incluyendo el mecanismo de acción de la zinagrandinólida E.
- Identificar los principios activos de la especie en estudio, determinando el efecto de los metabolitos secundarios en los niveles de glucosa en modelos *in vivo* y determinando su actividad inhibitoria *in vitro* sobre las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas.
- Determinar el potencial hipoglucemiante agudo en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos de una infusión obtenida a partir de las partes aéreas de las especies seleccionadas de mediante la aplicación de un ensayo farmacológico *in vivo*.

## CAPÍTULO I

- Determinar el potencial antihiper glucémico mediante ensayos *in vivo* utilizando la prueba de tolerancia a la sacarosa.
- Establecer el perfil cromatográfico de *Z. grandiflora* mediante cromatografía de líquidos con el objetivo de contribuir al desarrollo de los parámetros de identidad de la especie.
- 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.
- Estudiar *in silico* las propiedades químicas, farmacocinéticas y toxicológicas de los compuestos aislados.

## 5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

---

### 5.1. Material vegetal

Las partes aéreas de *Zinnia grandiflora* fueron recolectadas en Chihuahua por el Dr. Robert Bye y la Dra. Edelmira Linares 39042., 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 seco se pulverizó 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 con los datos proporcionados por el Dr. Bye 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 1.82 % (18 mg/g de droga cruda). Este proceso se repitió tantas veces como fue necesario a partir de la droga cruda.

### 5.3. Estudios químicos de la especie *Z. grandiflora*

#### 5.3.1. Fraccionamiento y análisis preliminar de la infusión

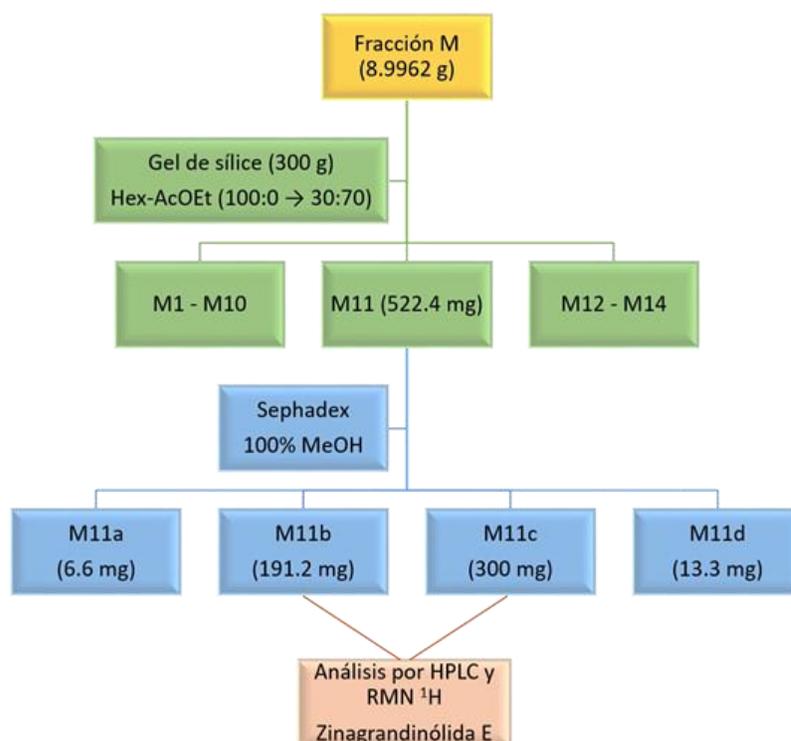
La infusión de la planta se fraccionó de manera preliminar mediante la técnica de reparto con los disolventes orgánicos hexano (Hex), diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) y acetato de etilo (AcOEt). La extracción con cada uno de los

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  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  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,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y AcOEt, respectivamente. En las fracciones de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y AcOEt se detectaron las zinagrandinólidas D-F mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE). La fracción de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  se utilizó posteriormente para las pruebas de calidad de la planta. Por otro lado, en la fracción de hexano se identificó a la desmetilisoencecalina mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM).

### 5.3.2. Obtención y análisis químico del extracto orgánico total (EOT) para la purificación de la zinagrandinólida E

Con la finalidad de obtener una mayor cantidad de las zinagrandinólidas D-F para utilizarlas en posteriores estudios preclínicos, se utilizó el extracto orgánico total (EOT) como fuente de estas. Este extracto se preparó a partir de la maceración de 3 Kg de droga cruda, seca y molida, en 20 L de una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 1:1 durante 21 días. Pasado ese tiempo, se concentró el disolvente con ayuda de un rotaevaporador (Helidolph Laborota 4000), para obtener 350 g del EOT seco; de los cuales 250 g se sometieron a fraccionamiento mediante cromatografía en columna abierta (CCA) con gel de sílice y utilizando un gradiente de elución de Hex-AcOEt (100:0  $\rightarrow$  0:100) e incrementado la polaridad hasta un sistema de AcOEt-MeOH (0:100  $\rightarrow$  80:20), con lo que se obtuvieron 19 fracciones primarias (A-T) para su posterior estudio. En este estudio solo se trabajó con la fracción M, el resto se resguardó para trabajos posteriores sobre la especie de trabajo.

Se seleccionó a la fracción M al detectarse la presencia de la zinagrandinólida E mediante cromatografía en capa delgada (CCD). Esta fracción (8.9962 g) se sometió a posteriores fraccionamientos CCA con de gel de sílice utilizando gradientes de polaridad creciente (Hex-AcOEt), y Sephadex utilizando un sistema de elución isocrática con MeOH, como se describe en la **Figura 12**. Las fracciones M11b y M11c fueron analizadas mediante CLAE. Como resultado entre la comparación de los parámetros cromatográficos generados (tiempo de retención y perfil de UV) y los obtenidos de las zinagrandinólidas D-F, se concluyó que ambas fracciones contenían mayoritariamente a la zinagrandinólida E (ZGE).



**Figura 12.** Aislamiento y purificación de la zinagrandinólida E del EOT de *Zinnia grandiflora*.

La purificación de la zinagrandinólida E se llevó a cabo por CLAE preparativa, utilizando 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  $\mu\text{m}$ , 4.6  $\times$  250 mm) con un gradiente de elución empleando MeCN y H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> 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  $\mu\text{m}$ , 19  $\times$  250 mm), con un sistema de elución escalado, con flujo de 17.1 mL/min, e inyecciones de 150  $\mu\text{L}$  (14.28 mg). El gradiente de elución utilizado se presenta en la **Tabla 5**. 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.). Mediante este procedimiento se obtuvieron 27 mg de la zinagrandinólida E, con una pureza  $\geq 98\%$ .

**Tabla 5.** Gradiente de elución utilizado para la purificación de la ZGE por CLAE preparativa

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

**Zinagrandinólida E:** Sólido blanco cristalino; p.f. 76-78 °C; <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  (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");  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta_{\text{C}}$  (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").

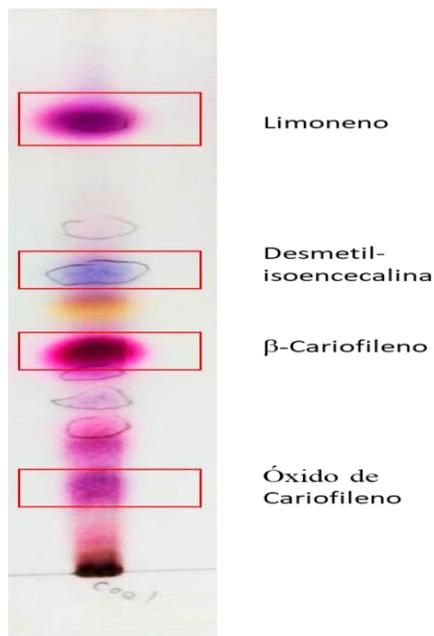
### 5.3.3. Obtención del aceite esencial

El aceite esencial de *Z. grandiflora* (AE) se preparó por hidrodestilación utilizando un aparato tipo Clevenger modificado. Para ello, se colocaron 150 g de las partes aéreas, secas y molidas del vegetal en 2 L de agua destilada. El sistema funciona a presión atmosférica y a la temperatura máxima del punto de ebullición del agua (Álvarez-Ospina *et al.*, 2013). Para separar la esencia se realizó un reparto con diclorometano (3 x 300 mL). La fase orgánica resultante se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío, para obtener un aceite color amarillo con un rendimiento de 120 mg aproximadamente. Este procedimiento se realizó tantas veces fue necesario hasta obtener cantidad suficiente para posteriores estudios químicos y farmacológicos del mismo.

### 5.3.4. Aislamiento de los compuestos mayoritarios del aceite esencial

Se depositaron 300 mg del aceite esencial de *Z. grandiflora* en una placa de 20 x 20 cm recubierta con gel de sílice (espesor = 0.5 mm); la cual se eluyó con una mezcla de tolueno/hexano/acetato de etilo 85:10:5. Esta fase móvil se estableció como ideal para las pruebas de identidad del AE mediante CCD, tal como se observa en la **Figura 13**. Después de la elución, se observaron las bandas bajo una lámpara de UV-Vis. Las bandas correspondientes a los compuestos mayoritarios se marcaron y rasparon para macerarlas durante 2 horas en

diclorometano para favorecer la desorción de los compuestos aislados. Después de maceradas las bandas, se filtró la sílice utilizando papel Whatman grado 1, y el disolvente se evaporó *in vacuo*. Los compuestos puros se almacenaron en refrigeración en viales ámbar. Este procedimiento permitió el aislamiento de 2.7 mg de D-limoneno (**4**), 1.2 mg de  $\beta$ -cariofileno (**20**), 5.8 mg de germacreno D (**24**), 4.1 mg de desmetilisoencecalina (**25**), y 2.6 mg de óxido de cariofileno (**32**), por placa. Los compuestos puros se identificaron posteriormente mediante RMN de  $^1\text{H}$  y espectrometría de Infrarrojo (IR). La identidad de la desmetilisoencecalina se estableció a partir de la RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , además de los experimentos en dos dimensiones COSY, HMBC y HSQC (Figs. 1 - 4, Anexo I).



**Figura 13.** Identificación de compuestos mayoritarios del aceite esencial de *Zinnia grandiflora* en cromatografía en capa delgada. Fase móvil: tolueno-hexano-acetato de etilo (85:10:5). Revelador: anisaldehído.

**Desmetilisocencecalina (6-Acetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2*H*-cromeno) (25):**

Sólido amarillento;  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz):  $\delta$  12.97 (OH-5), 7.52 (1H, *d*,  $J = 8.8$  Hz, H-7), 6.71 (1H, *dd*,  $J = 10.0$  Hz,  $J = 0.4$  Hz, H-4), 6.33 (1H, *dd*,  $J = 8.8$  Hz,  $J = 0.6$  Hz, H-8), 5.58 (1H, *d*,  $J = 10.0$  Hz, H-3), 2.54 (3H, *s*, H-14), 1.45 (6H, *s*, H-11 y H-12);  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz):  $\delta$  202.9 (C-13), 159.8 (C-9), 159.7 (C-5), 131.7 (C-7), 128.4 (C-3), 115.9 (C-4), 113.9 (C-6), 109.4 (C-10), 108.4 (C-8), 77.9 (C-2), 28.4 (C-11 y 12), 26.3 (C-14).

### 5.3.5. Obtención de los compuestos volátiles de la infusión utilizando microextracción en fase sólida (MEFS)

La identificación de los compuestos volátiles presentes en la infusión de *Z. grandiflora* se efectuó mediante la técnica de microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (MEFS-EC). Para ello, en un vial sellado herméticamente con un tapón de polipropileno PTFE/recubierto con un septo de silicona de 30 mL se colocaron 200 mg de la droga cruda, 100 mg de cloruro de sodio y 15 mL de agua HPLC, simulando la preparación de una infusión. Las condiciones experimentales para la extracción fueron: temperatura de extracción: 60°C; tiempo de equilibrio: 5 min; tiempo de extracción: 30 min. En el procedimiento se utilizaron cuatro fibras de MEFS (Supelco Technology, St. Louis, Mo., EE. UU.): una fibra de polidimetilsiloxano (PDMS; 100  $\mu\text{m}$ ), una fibra de polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB; 65  $\mu\text{m}$ ), una fibra de divinilbenceno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/Carboxen/PDMS; 50/30  $\mu\text{m}$ ) y una fibra de carboxeno/polidimetilsiloxano (Carboxen/PDMS; 75  $\mu\text{m}$ ). Todas las fibras se expusieron en el espacio de cabeza (EC) para lograr la extracción de los compuestos volátiles. El acondicionamiento de las fibras antes del análisis de CG-EM se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las proporciones relativas de los componentes individuales presentes se calcularon con base en las áreas de cada uno de los picos en el cromatograma de iones totales (CIT) y se reportan como porcentaje de la suma de todas las áreas de los picos presentes en el cromatograma. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

### 5.3.6. Análisis de los compuestos volátiles de la infusión y aceite esencial mediante CG-EM

Los análisis CG-EM se realizaron en un cromatógrafo de gases Agilent serie 6890 N equipado con un detector de espectrómetro de masas de tiempo de vuelo LECO PEGASUS 4D (MS-TOF; Agilent Technology, Palo Alto, California, EE. UU.), utilizando una Columna capilar de 5% difenil-95% dimetilpolisiloxano (DB-5) (20 m × 0.18 mm × 0.18 μm de espesor de película) (Agilent J&W Scientific, Palo Alto, California, EE. UU.). Las condiciones de CG-EM fueron: caudal del gas portador (He): 1,0 mL/min; “splitless”; volumen de inyección: 1,0 μL; inyector y temperatura de la línea de transferencia de EM: 300 y 250 °C, respectivamente; rampa de temperatura del horno: 40 °C mantenida durante 3 min, luego elevada a 300 °C a 20 °C/min (mantenida durante 15 min, isotérmicamente); modo de ionización: impacto electrónico a 70 eV; escaneo de rango de masa: 33-500 m/z. La identificación de los componentes se llevó a cabo mediante la inyección conjunta de la muestra con una solución que contiene la serie homóloga de n-alcenos (C8–C20) para establecer los índices de retención (índices de Kovats), y mediante la comparación de los patrones de fragmentación observados en los espectros de masa de los analitos detectados con aquellos de patrones almacenados en la base de datos del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST). En todos los casos, las determinaciones se realizaron por triplicado.

## 5.4. Estudios farmacológicos *in vivo*

### 5.4.1. Animales de experimentación

En este estudio se utilizaron ratones hembra de la cepa Swiss Webster de 25-30 g, del Cinvestav, Sede Sur (Ciudad de México) para los modelos de dolor. Para la evaluación del potencial antidiabético 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). Los animales tuvieron libre acceso a agua y alimento, en un ambiente controlado a 22 °C con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con los lineamientos éticos para investigaciones de dolor experimental en animales conscientes. (Zimmermann, 1983) Los protocolos para los estudios del dolor e inflamación fueron aprobados por el comité de ética local (Cinvestav, protocolo 042-13); mientras que los protocolos experimentales para las evaluaciones del potencial antidiabético fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química, UNAM: FQ/CICUAL/132/16 (Ensayos hipoglucemiantes y antihiper glucémicos). Además, se siguieron los procedimientos científicos establecidos por la Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Manejo de Animales (NOM-062-ZOO-1999) y la directiva 2010/63/EU para experimentos con animales. Se hicieron todos los esfuerzos posibles para minimizar el sufrimiento de los animales y reducir el número de animales utilizados. Todos los animales se aleatorizaron en cada grupo de tratamiento. Los animales fueron sacrificados en una cámara de CO<sub>2</sub> después de cada experimento.

#### 5.4.2. Preparación y administración de las muestras

Todos los reactivos utilizados en los experimentos farmacológicos fueron adquiridos comercialmente en la compañía Sigma Aldrich (EE. UU.): Dimetilsulfóxido (DMSO; 679), carragenina (9064-57-7), diclofenaco (DIC, 5018304), 1-H-[1,2,4]oxodiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ; 1456), flumazenil (3373), pregabalina (PGB, 5486971), glibenclamida (3488), naloxona (5284596), mesilato de metiotepina (metiotepina; 4106), NG-L-nitro-arginina metil éster (L-NAME; 39836), estreptozotocina (STZ, 29327), nicotinamida (NA, 72340), metformina (1396309), y sacarosa (S9378). La STZ y NA se administraron vía intraperitoneal (i.p.) a razón de 0.1 mL/10g de peso. La primera se disolvió en

buffer de citratos (0.1 M, pH = 4.5), mientras que la segunda se disolvió en SSI. La carragenina se preparó al 1% (*m/v*) en SSI, y se administró en volumen de 30  $\mu$ L por pata y se administró con jeringas hipodérmicas de 0.5 ml (31G  $\times$  8 mm). Para los experimentos por vía intraplantar (i.pl.): la ZGE se disolvió en DMSO al 50% en SSI, la DME se disolvió en DMSO al 20% en SSI, y el aceite esencial de *Z. grandiflora* se administró en aceite mineral. Para todos los experimentos por vía intraplantar (i.pl.), el volumen de administración fue de 20  $\mu$ L por pata. Para la administración intratecal (i.t.), ZGE disolvió en DMSO al 60% en SSI, y se administró en volumen de 5  $\mu$ L por ratón. Las administraciones del extracto acuoso de *Z. grandiflora* se realizaron por vía intragástrica (i.g.) mediante sondas de acerto inoxidable a razón de 0.2 mL/10 g de peso; utilizando SSI más 0.5% de Tween 80 para su disolución.

#### 5.4.3. Medición de la alodinia táctil

Todos los animales se colocaron dentro de cajas de plástico transparente Plexiglas sobre una malla metálica a una altura de 1 metro aproximadamente, lo que permitía el acceso completo a las patas. Dos días antes de los experimentos se entrenó a los ratones, colocándolos en el dispositivo mencionado para permitir su acondicionamiento conductual. El día de los experimentos el aclimatamiento se llevó a cabo 20 min aproximadamente antes de realizar las mediciones, hasta que las actividades de acicalamiento y exploración cesaran en su mayoría. El área de aplicación de los filamentos se realizó en las patas posteriores en la zona plantar media, evitando la zona de las almohadillas por ser menos sensible. La colocación de los filamentos se realizó en serie con incrementos logarítmicos de rigidez. Cada filamento se colocó de manera perpendicular a la superficie plantar con suficiente fuerza para ocasionar un ligero pandeo de este, y se mantuvo en el sitio durante 6-8 segundos aproximadamente. Se consideró una respuesta positiva si la retirada

de la pata del ratón se manifestaba inmediatamente a la colocación del filamento, o si la extremidad se estremecía inmediatamente después de la retirada del filamento. Se determinó la alodinia táctil mediante el método “up-down” utilizando los filamentos de Von Frey (Chaplan *et al.*, 1994). Con este método se determina el 50% del umbral de retirada de la pata del ratón de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$50\% \text{ Threshold (g)} = (10^{[Xf + k\delta]})/10,000$$

En donde Xf es el valor del último filamento de Von Frey utilizado (en unidades logarítmicas), k es el factor de corrección basado en el patrón de respuesta de una tabla de calibración y el valor tabulado basado en el patrón de respuestas positivas y negativas, y  $\delta$  indica la diferencia promedio entre estímulos en unidades logarítmicas. (Dixon, 1980; Chaplan *et al.*, 1994).

En condiciones normales, un valor en el rango de 1 a 1.6 g del 50 % del umbral de retirada de la extremidad se considera normal para ratones; mientras que la presencia de alodinia se considera cuando el valor es inferior a 0.2 g.

#### 5.4.4. Modelo del edema de pata inducido por carragenina

Antes de comenzar el experimento, los animales se sometieron al acondicionamiento mencionado en el inciso 5.4.3., a temperatura controlada de 25 °C antes de la administración de cualquier tratamiento. Una vez finalizado el tiempo de acondicionamiento, y después de medir los valores basales de volumen de la pata y 50% del umbral de retirada con los filamentos de von Frey, se administró a los animales, y se colocaron en las cajas de Plexiglas durante 15 min antes de la administración de la carragenina. Esta se administró al 1% en solución salina (m/v) de manera intraplantar (i.pl.) en la extremidad posterior derecha en un volumen de 30  $\mu$ L. 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. Los animales fueron sacrificados utilizando una cámara de CO<sub>2</sub>, una vez terminado el experimento y se calculó el área bajo la curva del curso temporal. (Winter, Risley y Nuss, 1962b; Panthong *et al.*, 1994)

Antes de llevar a cabo los ensayos en este modelo, se realizaron estudios con dos productos de carragenina obtenidos de Sigma-Aldrich: 1) Carragenina C1013 (predominantemente κ, con una menor cantidad de λ carragenanos), 2) Carragenina C1867 (mezcla de κ y λ carragenanos). Las cuales se administraron al 1% en solución salina en la pata posterior derecha del ratón en volumen de 30 μL. Se calcularon los porcentajes de inflamación y el 50% del umbral de retirada de la pata del ratón para determinar el mejor producto de carragenina para realizar los ensayos posteriores. Los resultados de este estudio (**Fig. 5, Anexo 1**) llevaron a la selección de la carragenina (C1867) debido a que causa un mayor porcentaje de inflamación (formación del edema), el cual se mantiene durante las 6 horas de estudio; y de acuerdo con un seguimiento de la inflamación y nocicepción durante 14 días, se determinó que esta carragenina puede ser utilizada también para realizar la evaluación de manera crónica de los compuestos en estudio, debido a que se mantiene la formación del edema así como la hiperalgesia durante todo este periodo de tiempo (**Fig. 6, Anexo 1**).

Por otro lado, se realizaron las pruebas para la elección del vehículo para la administración de la ZGE, debido a su baja solubilidad en SSI. Para ello se evaluó el efecto de la administración 20 μL de: 1) SSI + Tween 80 al 5% y 2) SSI + DMSO al 50%. Los porcentajes de Tween 80 y DMSO se eligieron con base en la completa solubilidad de una dosis alta de ZGE (100 μg/pata). De acuerdo con los resultados (**Fig. 7, Anexo 1**), se eligió vehículo la mezcla de SSI + DMSO al 50%, ya que la administración de Tween 80 (al 5%) promueve la formación del edema y disminución del 50% de la latencia de retirada de la pata del ratón, lo que podría evitar que se observe adecuadamente el efecto de los tratamientos.

#### 5.4.5. Modelo de neuropatía diabética inducida con STZ

A los ratones se les administró por vía intraperitoneal una dosis única de estreptozotocina (STZ, 150 mg/kg) disuelta en buffer de citratos (pH 4.5, 0.1 M) para inducir diabetes tipo 1 experimental (Sharma *et al.*, 2006). La hiperglucemia se confirmó después de 48 h de la inyección de STZ mediante la medición de los niveles de glucosa en sangre con un glucómetro comercial (One Touch Ultra® 2, Johnson & Johnson, Milpitas, CA). Para este estudio se consideraron ratones con niveles de glucosa en sangre  $\geq 200$  mg/dl.

Todos los ensayos se llevaron a cabo cuatro semanas después de la inyección de STZ. En este momento, todos los ratones hiperglucémicos ya habían desarrollado alodinia táctil con valores del 50 % del umbral de retirada de la pata  $\leq 0,2$  g (**Fig. 8, Anexo I**). La alodinia táctil se determinó como se describió anteriormente (Chaplan *et al.*, 1994). Para ser considerados para los ensayos posteriores, los animales debían cumplir con ambos criterios de aceptación: hiperglucemia y alodinia táctil.

#### 5.4.6. Modelo de ligadura de nervios espinales L4/L5

Para la inducción del dolor neuropático, se llevó a cabo un procedimiento quirúrgico para la ligadura de los nervios espinales (LNE). (Ye *et al.*, 2015) Los ratones se anestesiaron con una mezcla de ketamina (50 mg/kg, i.p.) y xilacina (10 mg/kg, i.p.). Después de la preparación quirúrgica, se realizó una incisión en la piel a la izquierda de la línea media dorsal guiada por las crestas ilíacas como punto medio de la incisión. Los nervios espinales izquierdos L4 y L5 se expusieron, aislaron y ligaron fuertemente con sutura de seda 6-0 distal al ganglio de la raíz dorsal. Los ratones fueron monitoreados hasta la recuperación completa de la anestesia. Después de la recuperación quirúrgica, los animales con deficiencias motoras, como arrastrar las patas, se excluyeron

de los experimentos. La alodinia táctil se determinó como se describió anteriormente (Chaplan *et al.*, 1994). Todos los experimentos se llevaron a cabo a los 14 días de realizada la cirugía, cuando los animales se recuperaron por completo y se produjeron valores de alodinia  $\leq 0,2$  g.

#### 5.4.7. Evaluación de la eficacia preclínica antidiabética en ensayos agudos

##### **Modelo de inducción de hiperglucemia en ratones: DM2**

Este modelo se llevó a cabo con ratones macho de la cepa ICR de 25-35 g de peso. Los animales se separaron en dos grupos: normoglucémicos e hiperglucémicos. En el caso del grupo de ratones hiperglucémicos, esta condición se indujo químicamente, a través de la inyección, por vía intraperitoneal (*i.p.*), de una dosis única de STZ solubilizada en buffer de citratos (130 mg/kg, pH 4.5) en coadministración con nicotinamida (NA, 50 mg/kg) disuelta en SSI. (Szkudelski, 2012; Flores-Bocanegra *et al.*, 2017) La administración de ambas sustancias se realizó a razón de 0.1 mL/10 g de peso. Al cabo de 7 días, se midieron los niveles de glucosa en sangre, y los ratones que presentaron valores de glucemia superiores a 200 mg/dL se consideraron para la segunda etapa experimental.

##### **Evaluación el efecto hipoglucemiante agudo**

Los ratones normoglucémicos e hiperglucémicos se dividieron aleatoriamente en cinco grupos ( $n = 6$ ) y se les privó de alimentos antes de los ensayos, con acceso a agua simple *ad libitum*. El extracto acuoso de *Z. grandiflora* se administró a las dosis de 31.6, 100 y 316.2 mg/kg, por vía intragástrica (*i.g.*). Se utilizó como control positivo a la glibenclamida (15 mg/kg). Se realizó una incisión en la cola de los ratones para la toma de

muestra de la vena caudal, a las 1.5, 3, 5, 7 y 9 horas después de la administración de los tratamientos. Con los valores obtenidos de glucosa en sangre, se calculó el porcentaje de variación de la glucemia de cada animal con respecto a su nivel basal de la siguiente manera:

$$\% \text{ de variación de glucemia} = (G_t - G_i) \times 100$$

donde  $G_i$  es la glucemia basal y  $G_t$  son los diferentes valores de glucemia después de la administración del tratamiento.

Por último, se calcularon las áreas bajo la curva (ABC) de los cursos temporales de la variación de glucosa.

#### **Evaluación del potencial antihiper glucémico en una curva de tolerancia a la sacarosa (CTS)**

La evaluación del potencial antihiper glucémico del extracto acuoso de *Z. grandiflora* en la PTS, se realizó mediante la administración (vía i.g.) de las dosis de 31.6, 100 y 316.2 mg/kg. Antes de realizar el ensayo, se mantuvo a los animales en ayuno durante 4 horas previas, con acceso libre al agua. Al cabo de ese tiempo, se midió la concentración de la glucosa basal, y posteriormente se administraron los tratamientos, VEH y control positivo. Este último consistió en la administración de 5 mg/kg de acarbosa (ACA). Después de 30 min de administrados los diferentes grupos ( $n = 6$ ), los animales recibieron una carga oral de 2 g/kg de sacarosa. Los niveles de glucosa en sangre se midieron a los 30, 60, 90 y 120 min después de administrado el carbohidrato. Con los valores obtenidos se construyeron las curvas del curso temporal del % de variación de la glucemia, y se calcularon las ABC.

#### 5.4.8. Análisis estadísticos

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 determinó 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. Para el cálculo de las diferencias estadísticas se utilizó el programa GraphPad Prism (version 5.0, GraphPad Inc., La Jolla, CA, EE. UU.).

### 5.5. Estudios farmacológicos *in vitro*

#### 5.5.1. Consideraciones generales

Todos los ensayos enzimáticos se llevaron a cabo en placas de 96 pozos y todas las muestras se evaluaron por triplicado. Las lecturas se llevaron a cabo a 415 nm en un espectrofotómetro BioRad® modelo iMark, utilizando un software Microplate Manager® 6. El volumen máximo colocado en cada pozo fue de 100  $\mu$ L, con agitación de la placa de 5s entre cada lectura.

#### 5.5.2. Evaluación de la actividad inhibitoria sobre enzimas $\alpha$ -glucosidasas

Para la realización de estos ensayos se utilizaron las  $\alpha$ -glucosidasas de *Saccharomyces cerevisiae* ( $\alpha$ Sc, 0.4 U/mL) y un 'pool' de enzimas intestinales de rata ( $\alpha$ Ir, 0.4 U/mL). En un estudio biodirigido, se evaluaron extractos, fracciones y compuestos puros. Las muestras por evaluar se disolvieron en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7) o en metanol, para obtener concentraciones de 1000 ppm para los extractos y fracciones, y de 30 mM para los compuestos

puros, en un primer ensayo preliminar. Se utilizó a la acarbosa como control positivo, a una concentración de 30 mM disuelta en buffer de fosfatos. El procedimiento general consistió en la adición de alícuotas de 0-10  $\mu\text{L}$  de las muestras a evaluar más un volumen fijo de la enzima por cada pozo (10  $\mu\text{L}$ ). La mezcla inhibidor-enzima se incubó a 37 °C durante 10 min. Posteriormente, se añadió 10  $\mu\text{L}$  de sustrato *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (*p*NPG, 5 mM para  $\alpha\text{Sc}$ , y 10 mM para  $\alpha\text{Ir}$ ). Inmediatamente después de agregar el sustrato, se leyó la absorbancia de las muestras al tiempo cero ( $T_{\text{inicial}}$ ). La placa de 96 pozos con las mezclas de reacción se colocó a incubación a 37 °C durante 30 min, y se leyeron las absorbancias a 415 nm al finalizar el tiempo de incubación ( $T_{\text{final}}$ ). El cálculo de los porcentajes de inhibición se obtuvo por comparación con un blanco de reacción de acuerdo con la siguiente ecuación (Copeland, 2000):

$$\% \text{ Inhibición} = \left( 1 - \frac{A_{Tc}}{A_{Bc}} \right) \times 100$$

En donde  $A_{Tc}$  es la absorbancia corregida de la sustancia de prueba ( $A_{\text{final}} - A_{\text{inicial}}$ ) y  $A_{Bc}$  es la absorbancia corregida del blanco ( $A_{B\text{final}} - A_{B\text{inicial}}$ ).

La concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) se calculó mediante un ajuste de regresión no lineal, con la siguiente ecuación (Copeland, 2000):

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A_{100}}{1 + \left( \frac{I}{CI_{50}} \right)^S}$$

En donde  $A_{100}$  es el porcentaje máximo de inhibición enzimática,  $I$  es la concentración de inhibidor y  $S$  es el grado de cooperatividad.

### 5.5.3. Determinación de los parámetros cinéticos de la inhibición

Con el objetivo de determinar el tipo de inhibición que ejercen los productos activos, se siguió el protocolo descrito en el inciso 5.6.1. Se construyeron curvas de inhibición por sustrato en un intervalo de concentraciones de 0-2 mM de *p*NPG con concentraciones de inhibidor que se encontraran en el intervalo de 20 -80% de inhibición. Los resultados obtenidos se analizaron mediante una curva de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk, y las constantes de inhibición se calcularon mediante un análisis de regresión no lineal de acuerdo con la siguiente ecuación (Copeland, 2000):

$$v = \frac{V_{max}S}{k_m(1 + [I]/k_i) + S(1 + [I]/\alpha k_i)}$$

En donde  $v$  es la velocidad inicial en ausencia y presencia de inhibidor,  $S$  e  $I$  son las concentraciones de sustrato e inhibidor, respectivamente;  $V_{max}$  es la velocidad máxima de reacción,  $k_m$  es la constante de Michaelis-Menten,  $k_i$  es la concentración de inhibición competitiva y  $\alpha k_i$  es la constante de inhibición no competitiva. El análisis de los datos se realizó con el programa GraphPadPrism (versión 5.0, GraphPad Inc., La Jolla, CA, EE. UU.)

## 5.6. Estudios *in silico*

### 5.6.1. Estudios de acoplamiento molecular

Las estructuras de energía mínima se construyeron con el software Spartan'10 (Wavefunction Inc., Irvine, CA, EE. UU.). Las estructuras de mínima energía para las simulaciones de acoplamiento se prepararon con el paquete Autodock Tools v1.5.6 (ADT, <http://mgltools.scripps.edu/>). Para los metabolitos, se establecieron la adición de cargas de Gasteiger, se

determinaron los tipos de átomos, el número de enlaces de giro libre, y se eliminaron los hidrógenos no polares. El modo de unión de ZGE con el receptor serotoninérgico se realizó utilizando la estructura cristalizada de 5-HT<sub>1B</sub> (código pdb 4IAR) (Wang *et al.*, 2013). Para los receptores opioides, se utilizaron las estructuras cristalizadas de los receptores opioides  $\delta$ ,  $\kappa$  y  $\mu$  con código pdb 6PT3, 6VI4 y 5C1M, respectivamente (Huang *et al.*, 2015; Claff *et al.*, 2019; Che *et al.*, 2020). Debido a la falta de datos estructurales cristalográficos para el receptor GABA<sub>A</sub>, se decidió utilizar el modelo de homología para el receptor GABA<sub>A</sub> (Richter *et al.*, 2012; Dumitrascuta *et al.*, 2020). Para la  $\alpha$ -glucosidasa de *S. cerevisiae* se utilizó la estructura cristalizada, con código pdb 3A4A. Para los receptores, se agregaron los hidrógenos polares y las cargas de Kollman, se eliminaron las moléculas de agua, y los parámetros de solvatación se asignaron de forma predeterminada. Los estudios de acoplamiento molecular se realizaron con AutoDock Vina 1.1.2. (Trott y Olson, 2010) Primero, se realizó un ‘docking ciego’ para establecer el sitio común de interacción de los metabolitos con los receptores. El espacio de búsqueda para este acoplamiento preliminar se definió como un tamaño de caja de  $80 \times 80 \times 80 \text{ \AA}$  en las dimensiones x, y, z, y la macromolécula se estableció como el centro de la caja. A continuación, se realizó un acoplamiento refinado con una caja más pequeña de espacio de búsqueda ( $25 \times 25 \times 25 \text{ \AA}$ ), estableciendo como centro de la caja de cuadrícula la pose de menor energía obtenida del acoplamiento ciego. Los estados conformacionales de las simulaciones de acoplamiento se analizaron utilizando los programas AutoDock Tools y Maestro 11.8.012, que también identificaron los enlaces H y las interacciones de Van der Waals entre receptores y ligandos. Los complejos acoplados predichos (proteína-ligando) fueron aquellas conformaciones que mostraban la energía de unión más baja. El protocolo de acoplamiento se validó reproduciendo el modo de unión de cada compuesto cocrystalizado con cada receptor (**Fig. 9 y 10, Anexo I**). Los valores de RMSD inferiores a  $2 \text{ \AA}$  indican la predicción correcta de la estructura unida. La preparación de las figuras se

realizó con la herramienta de visualización PyMOL (PyMOL Molecular Graphics System v1.7.4, Schrödinger, New York, NY, USA) (Seeliger and De Groot, 2010; Schrödinger, 2015) y Maestro 11.8.012 (Schrödinger). (Schrödinger, 2018)

### 5.6.2. Predicción de las propiedades químicas, farmacológicas y toxicológicas de los metabolitos secundario de *Z. grandiflora*

Se utilizaron tres herramientas web gratuitas para evaluar las propiedades de las zinagrandinólidas D-F, y la desmetilisoencecalina. Las propiedades farmacocinéticas y de similitud con los fármacos se analizaron con el servidor en línea SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>). Se utilizó el software gratuito Osiris Property Explorer (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>) para predecir la mutagenicidad, la tumorigenicidad y los efectos irritativos y reproductivos. Para la predicción de la bioactividad se utilizó el software MolInspiration Cheminformatics (<http://www.molinspiration.com>), compatible con el cribado virtual basado en fragmentos.

## 5.7. Pruebas de identidad y composición

### 5.7.1. Desarrollo del método analítico a partir de la fracción de diclorometano de la infusión de *Z. grandiflora*

Las pruebas de composición de la droga cruda de *Z. grandiflora* se desarrollaron a partir de la fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> obtenida por partición de la infusión de dicha planta. La elección de esta fracción orgánica se realizó con base en la menor complejidad presentada en el perfil cromatográfico correspondiente al realizar el análisis comparativo con aquel presentado por el

preparado tradicional (infusión), y la zinagrandinólida E fue seleccionada como compuesto marcador. El desarrollo del perfil cromatográfico se realizó por cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplado a espectrometría de masas (CLUE-ESI/EM). El desarrollo del perfil cromatográfico se realizó por cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplada a la espectrometría de masas (CLUE-ESI/EM). El equipo de cromatografía se encuentra equipado con una bomba cuaternaria, un inyector automático, y un detector de arreglo de fotodiodos (PDA) acoplado a un detector de masas SQD2 (cuadrupolo simple) con una fuente de ionización por electrospray (ESI) en los modos positivo (ESI<sup>+</sup>) y negativo (ESI<sup>-</sup>). El control del equipo, la adquisición de datos, procesamiento y manipulación de la información se efectuaron utilizando el programa MassLynx® versión 4.1 (Waters). Las condiciones del equipo fueron: volumen de inyección: 3 µL; velocidad del flujo: 3 mL/min; temperatura del horno: 40°C; longitud de onda de detección: 254 nm; flujo de nitrógeno: 650 L/hr; voltaje del cono: 30 V; voltaje del capilar: 3.0 kV (modo positivo) y 2.5 kV (modo negativo); temperatura de desolvatación: 400°C. Todos los análisis se realizaron en una columna BEH Phenyl Acquity (1.7 µm, 2.1 × 100 mm). El gradiente de elución empleado consistió en una mezcla binaria compuesta por CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (0.1% ácido fórmico) (Tabla 6).

**Tabla 6.** Gradiente de elución utilizado para el desarrollo del perfil cromatográfico por UPLC

Tiempo (min)	Agua (0.1% ácido fórmico) (%)	MeCN (%)
0	85	15
3	55	45
10	20	80
11	0	100
12	0	100
12.5	85	15
15	85	15

### 5.7.2. Preparación de la matriz de trabajo

La matriz de trabajo (75 mg/mL) se disolvió en una mezcla de dioxano-MeOH (v/v, 1:1). La solución resultante se filtró a través de membranas de nylon Acrodisc® 0.20 µm, antes de ser inyectada en el cromatógrafo.

### 5.7.3. Validación del método analítico para la cuantificación de la zinagrandinólida E

La validación del método analítico se realizó de acuerdo con los criterios establecidos en la Guía de Validación de Métodos Analíticos de la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH, por sus siglas en inglés) (International Conference on Harmonisation, 2005).

#### **Linealidad del sistema**

Este parámetro se evaluó construyendo seis curvas de calibración (concentración vs absorbancia) por quintuplicado de ZGE a las concentraciones finales de 5, 10, 25, 50, 75 y 100 µg/mL. Cada curva se construyó mediante diluciones seriadas e independientes a partir de una solución de referencia (1000 µg/mL). La respuesta analítica se determinó obteniendo el ABC del pico correspondiente a la ZGE a 254 nm, y del pico correspondiente a  $m/z$  de la ZGE. El cálculo de la ordenada al origen ( $\beta_0$ ), pendiente de la recta ( $\beta_1$ ), coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el coeficiente de correlación ( $R$ ), se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple. Los parámetros obtenidos se compararon con los siguientes criterios:  $R^2 > 0.98$ ;  $R \geq 0.99$ ;  $\beta_0 \neq 0$  y  $\beta_1 = 1$  [ICH; Q2 (R1) 2005].

### Límite de detección y límite de cuantificación

Para determinar los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se construyeron curvas de calibración del estándar a las concentraciones de 0.1, 1.0, 2.5, 5.0, 10 µg/mL, por triplicado. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de regresión lineal, y se calcularon los valores de  $\beta_0$ ,  $\beta_1$ , R,  $R^2$ . Finalmente, el cálculo del LD y LC se realizó de acuerdo con las siguientes fórmulas:

$$LD = \frac{(3.3)(S_{y/x})}{b_1} \qquad LC = \frac{(10)(S_{y/x})}{b_1}$$

### Linealidad del método y exactitud

Para evaluar la linealidad del método se construyeron curvas de calibración, analizando la concentración de ZGE presente en la matriz de trabajo adicionada con una concentración conocida del estándar [10, 50 y 75 µg/mL]. La respuesta de la cantidad recuperada del estándar se realizó considerando el valor de la respuesta de la matriz de trabajo sin adicionar el estándar. Se evaluaron tres réplicas por concentración para así obtener los valores correspondientes del ABC. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de regresión lineal entre la cantidad adicionada (x) y la cantidad recuperada (y), y se calcularon los valores de  $\beta_0$ ,  $\beta_1$ , R,  $R^2$ . Los parámetros para la linealidad del método deben cumplir los valores de  $R^2 > 0.98$ ;  $R \geq 0.99$  [ICH; Q2 (R1) 2005].

La exactitud del método se refiere a la concordancia entre el valor de la concentración de estándar recuperada y el valor de referencia, que se refiere a la concentración adicionada. Este parámetro de desempeño se determinó mediante el análisis de los porcentajes de recobro. Se calculó, para cada nivel de concentración adicionado, la media aritmética ( $\bar{X}$ ) y el coeficiente de variación (CV) de los porcentajes de recobro. El método analítico es exacto si los

porcentajes de recobro se encuentran en un rango entre 98-102% y el coeficiente de variación no es mayor del 2% [ICH; Q2 (R1) 2005].

$$\% \text{ Recobro} = \frac{\text{Cantidad recuperada}}{\text{Cantidad adicionada}} \times 100$$

### **Precisión del sistema**

En el presente trabajo se evaluó la precisión del sistema en términos de repetibilidad con el análisis de doce réplicas de una concentración definida del estándar (50 µg/mL). Para este análisis se determinó la respuesta analítica bajo las mismas condiciones experimentales, mismo analista y durante un intervalo corto de tiempo. Los resultados obtenidos se analizaron mediante una prueba ANADEVA utilizando el estadístico de Fischer (F) y se expresa en términos de coeficiente de variación (CV). El criterio de aceptación establece que para que un método sea preciso el CV no debe ser mayor al 2.0 % (ICH; Q2 (R1) 2005).

### **Precisión intermedia**

Para el análisis de este parámetro se determinó la respuesta analítica bajo las mismas condiciones experimentales, mismo analista, en días diferentes, utilizando datos de doce réplicas de una concentración definida del estándar (50 µg/mL). El criterio de aceptación establece que para que un método sea preciso el CV no debe ser mayor al 2.0 % (ICH; Q2 (R1) 2005).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

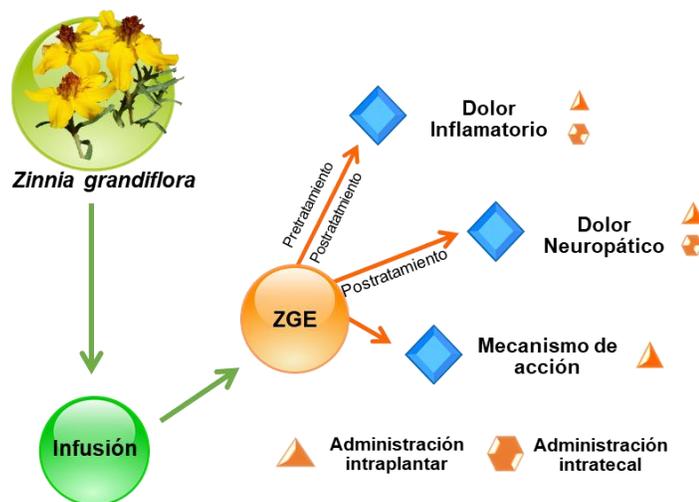
---

### 6.1. Evaluación del efecto antiinflamatorio y antialodínico de la zingrandinólida E

En un estudio que precede al presente se aisló la zinagrandinólida E (ZGE), compuesto mayoritario, y principio activo anticonceptivo del preparado tradicional de *Z. grandiflora*. Este compuesto mostró una acción antinociceptiva significativa en la prueba de formalina en ratones (3.16, 10 y 31.6 mg/kg, i.g.), siendo este más notorio en la fase inflamatoria del ensayo. (Reyes-Pérez et al., 2019). Con el propósito de profundizar sobre el potencial analgésico y antiinflamatorio de la ZGE en este estudio se realizaron varios experimentos utilizando el modelo de edema de pata inducido por carragenina (1%), y uno neuropático. El diseño experimental involucro dos esquemas de tratamiento, uno preventivo y el segundo paliativo.

Con la finalidad de obtener un panorama más amplio sobre el potencial analgésico y antiinflamatorio de la ZGE, se propusieron varios experimentos que involucraron evaluar tanto su efecto preventivo (pretratamiento) como paliativo (postratamiento). La **Figura 14** muestra que el diseño experimental para esta investigación se dividió en dos esquemas de tratamiento, pre- y postratamiento de carragenina al 1%. En el esquema de pretratamiento, se administró la ZGE por vía i.pl. o por vía i.t., 15 min antes de la inyección de carragenina. En otra serie de experimentos, los animales también fueron pretratados con la ZGE (3, 10, 30 µg/pata) como se describe anteriormente, pero en este caso, los efectos antiinflamatorios y antialodínicos se evaluaron cada tercer día durante 15 días. En el esquema postratamiento, se administró ZGE (30 µg/pata) y diclofenaco (30 µg/pata) 6 días después de la inyección de carragenina, cuando el proceso inflamatorio estuvo instaurado. La inflamación

y el umbral retiro se midieron durante 6 h después de la administración de la ZGE siguiendo los mismos procedimientos descritos en la sección de desarrollo experimental. Por último, se probó el efecto antialodínico de la ZGE en un modelo de neuropatía diabética en ratones, inducido con STZ.

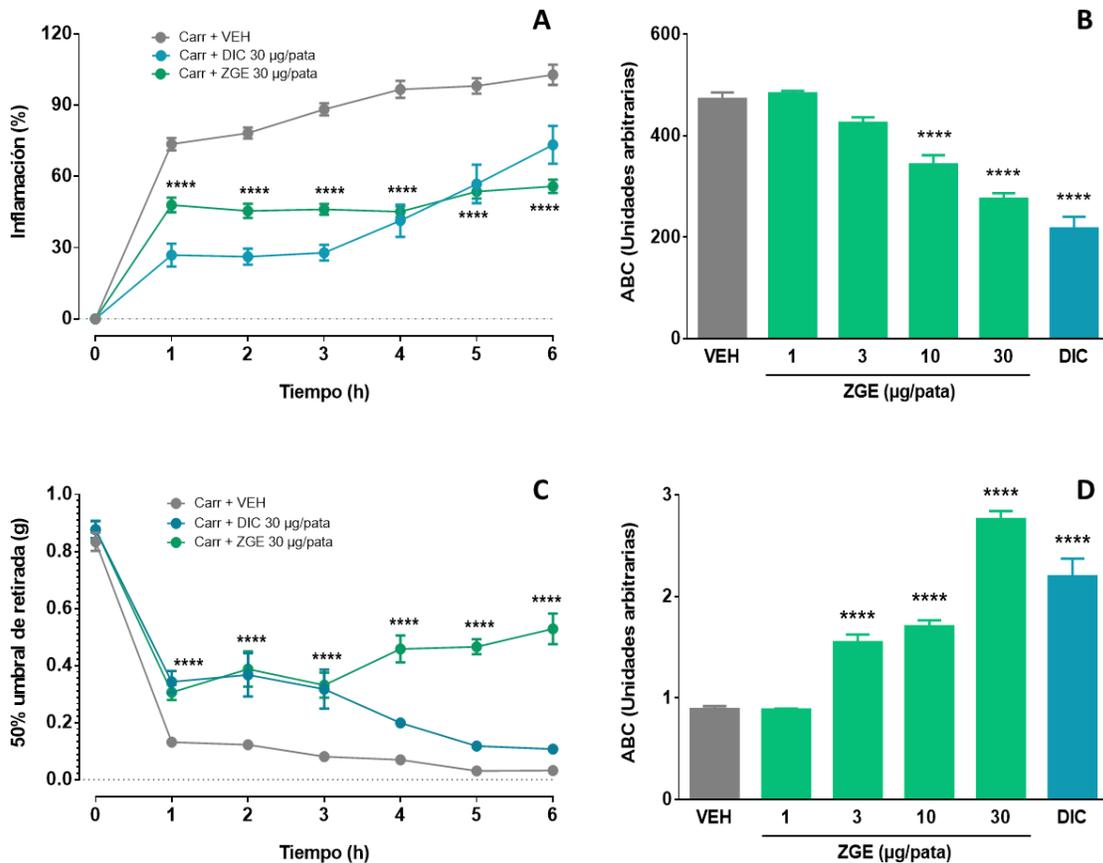


**Figura 14.** Esquema del diseño experimental para la evaluación del potencial antiinflamatorio y analgésico de la ZGE.

### 6.1.1. Efecto antiinflamatorio y antialodínico en el modelo del edema de pata inducido por carragenina

En los experimentos realizados, la carragenina indujo el edema y alodinia táctil con un máximo de efecto a la tercera hora de administrado el alógeno. El pretratamiento periférico local con ZGE, inhibió de manera significativa la inflamación inducida por carragenina a las concentraciones de 10 y 30  $\mu\text{g/pata}$  (**Figura 15–A**) y, la alodinia táctil (**Figura 15–C**) a partir de la concentración de 3  $\mu\text{g/pata}$ . En ambos casos, los efectos fueron dependientes de la concentración. Así mismo, el efecto antiinflamatorio y antialodínico máximo de la ZGE se alcanzó entre 4 y 6 h. El diclofenaco (30  $\mu\text{g/pata}$ ), utilizado como control positivo, también redujo significativamente el edema, de manera comparable a la ZGE a la concentración más alta utilizada. Sin embargo, el

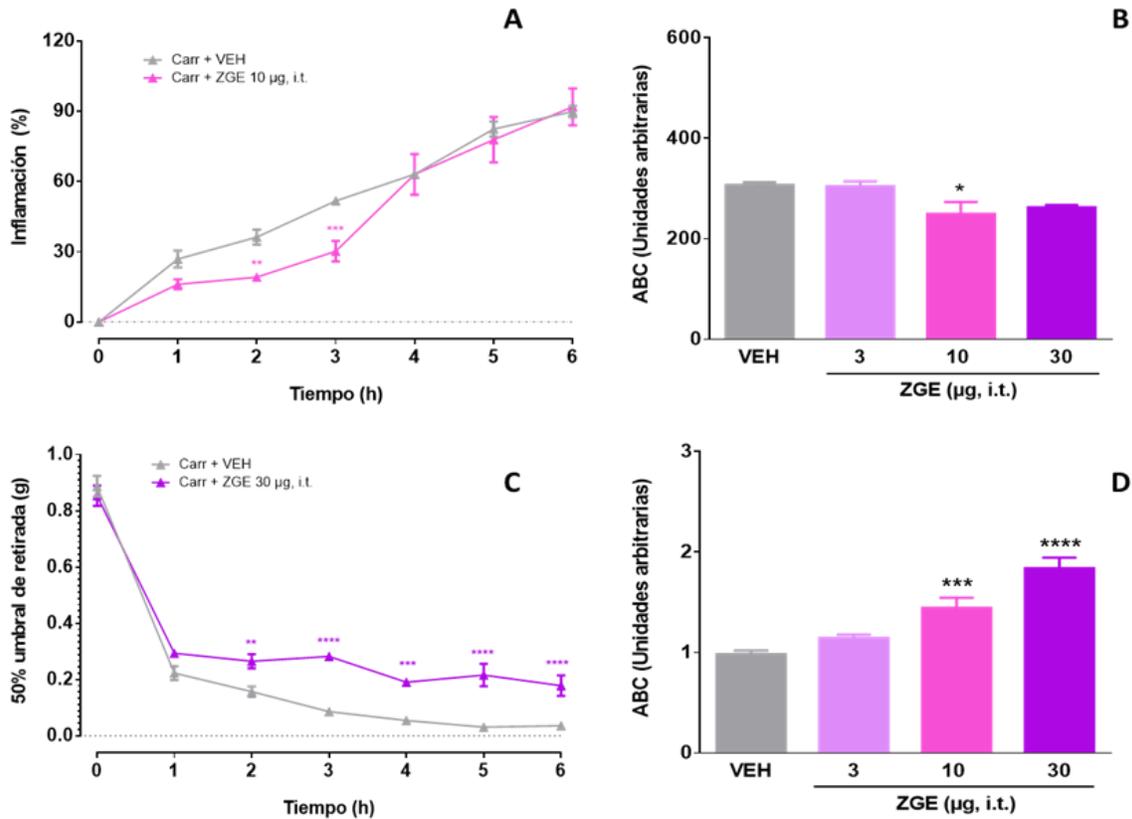
efecto del diclofenaco, aunque significativo, fue menor que el de la concentración de 30  $\mu\text{g}$  de ZGE (Figura 15–D).



**Figura 15.** Efecto antiinflamatorio y antialodínico local de ZGE en el modelo del edema de pata inducido por carragenina. Panel A: Curso temporal del porcentaje de inflamación. Panel B: ABC del curso temporal (Porcentaje de inflamación contra tiempo, UA). Panel C: Curso temporal del 50% de umbral de retirada (g). Panel D: ABC del curso temporal (50% de umbral de retirada contra tiempo, UA). VEH: DMSO 50% en SSI. DIC: diclofenaco (30  $\mu\text{g/pata}$ ). Cada medición representa la media  $\pm$  EEM con ocho ratones por grupo ( $n=8$ ). Los valores significativamente diferentes del vehículo (VEH) (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ) se determinaron por ANADEVa de dos vías seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni (paneles A y C) o ANADEVa de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Dunnett (paneles B y D).

A continuación, se exploró el efecto antiinflamatorio y antialodínico sistémico de la ZGE, a través de su administración intratecal (3, 10 y 30  $\mu\text{g}$ ). En este caso, la ZGE tuvo un efecto muy pobre sobre la inflamación inducida

por carragenina (**Figura 16–A y B**), pero redujo significativamente la alodinia táctil de una manera dependiente de la concentración (**Figura 16–C y D**). Estos resultados muestran que la ZGE ejerce un efecto local importante, actuando sobre el sitio donde se genera el proceso inflamatorio.



**Figura 16.** Efecto antiinflamatorio y antialodínico sistémico de ZGE en el modelo del edema de pata inducido por carragenina. Panel **A**: Curso temporal del porcentaje de inflamación. Panel **B**: ABC del curso temporal (Porcentaje de inflamación contra tiempo, UA). Panel **C**: Curso temporal del 50% de umbral de retirada (g). Panel **D**: ABC del curso temporal (50% de umbral de retirada contra tiempo, UA). VEH: DMSO 50% en SSI. DIC: diclofenaco (30 µg). Cada medición representa la media ± EEM con ocho ratones por grupo (n=8). Los valores significativamente diferentes del vehículo (VEH) (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ) se determinaron por ANADEVa de dos vías seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni (panel **A** y **C**) o ANADEVa de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Dunnett (panel **B** y **D**).

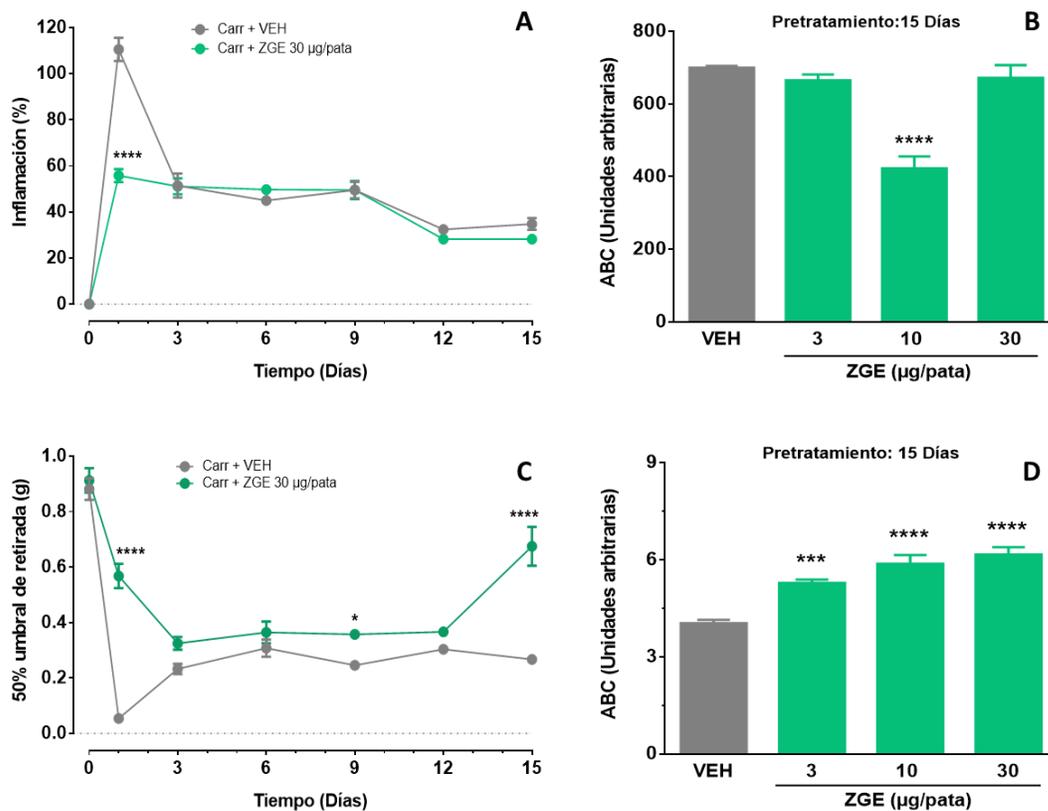
La inyección de carragenina produce una inflamación aguda inmediata no inmune, como consecuencia de la producción y liberación de sustancias proinflamatorias como la sustancia P, histamina, serotonina, bradicinina y

complemento (dentro de las primeras horas), así como del aumento de los niveles de COX-2 y óxido nítrico sintasa (iONS) con la posterior síntesis de prostanoïdes (especialmente PGE<sub>2</sub>) y óxido nítrico (ON), correspondientemente, que coincide con la producción de eritema, edema e hiperalgesia (Hoeger Bement *et al.*, 2003; Morris, 2003a). El efecto antiinflamatorio observado en este modelo sugiere que la  $\delta$ -elemánólida actúa principalmente de manera local mediando el proceso de inflamación en el tejido periférico donde ocurre la lesión, ya que su administración intratecal provocó un efecto leve en la reducción del edema.

De manera adicional, el efecto antialodínico, tanto en la administración local como intratecal, sugiere que la ZGE puede modular la nocicepción en la periferia y centros sensoriales superiores, misma que estaría asociada con la producción de sustancias proinflamatorias típicas de la hiperalgesia primaria. También el efecto se podría asociar a la elaboración de monoaminas excitatorias (aspartato, glutamato y glutamina) y sus receptores, los cuales están relacionados con hiperalgesia secundaria causada por sensibilización central en el modelo de edema de pata inducido por carragenina (Sluka y Westlund, 1993). Estos resultados son consistentes con la reducción del porcentaje de inflamación después de la administración por vía i.g. de la infusión de *Z. grandiflora* en el modelo de carragenina. También son congruentes con los efectos de la infusión y ZGE en la primera y segunda fase del ensayo de la formalina; en la primera fase, hay una actividad aferente primaria periférica; en tanto que, en la segunda hay una combinación de excitación neuronal periférica y central a nivel de la asta dorsal de la médula espinal (McCall, Tanner y Levine, 1996; Pitcher y Henry, 2002; Fischer *et al.*, 2014).

Por otro lado, para evaluar el efecto de la ZGE sobre un proceso de inflamación instaurada durante un periodo más largo de tiempo, se tomó en cuenta que la inyección de carragenina induce una respuesta inflamatoria

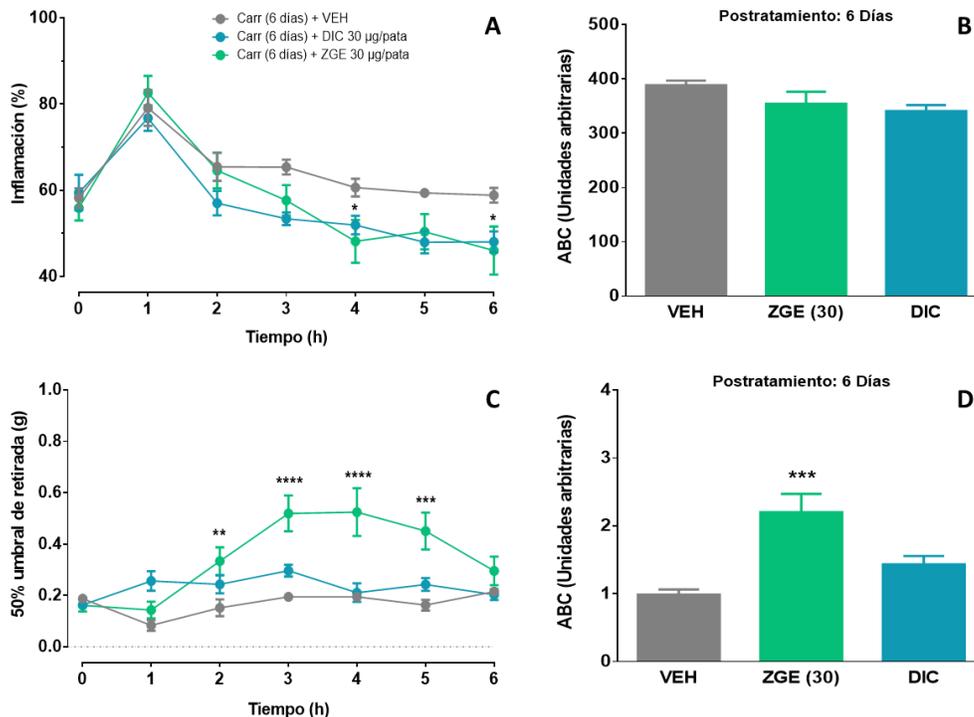
aguda con infiltración de neutrófilos durante la primera semana, y luego ocurre una inflamación crónica dominada por macrófagos en las siguientes ocho semanas. (Radhakrishnan, Moore y Sluka, 2003). Por lo tanto, para hacer visible el efecto de la ZGE sobre los dos procesos mencionados anteriormente, se administró un pretratamiento – previo a la inyección de carragenina – con concentraciones de 3, 10 y 30  $\mu\text{g/pata}$ , monitoreando durante 15 días, los efectos antiinflamatorios y antialodínicos provocados. Los resultados revelaron que este pretratamiento único, a nivel periférico local con la ZGE, no disminuyó la inflamación inducida por carragenina cuando se ensayó a concentraciones de 3 y 30  $\mu\text{g/pata}$  (**Figura 17–A y B**). Sin embargo, la ZGE tuvo un efecto leve a 10  $\mu\text{g/pata}$ . En cuanto al efecto antialodínico, la administración periférica local de la ZGE indujo una acción preventiva de larga duración, de forma dependiente de la concentración (**Figura 17–C y D**).



**Figura 17.** Efecto antiinflamatorio y antialodínico local de ZGE monitoreado durante 15 días en el modelo del edema de pata inducido por carragenina. Panel A: Curso

temporal del porcentaje de inflamación. Panel **B**: ABC del curso temporal (Porcentaje de inflamación contra tiempo, UA). Panel **C**: Curso temporal del 50% de umbral de retirada (g). Panel **D**: ABC del curso temporal (50% de umbral de retirada contra tiempo, UA). VEH: DMSO 50% en SSI. Cada medición representa como la media  $\pm$  EEM de ocho ratones por grupo (n=8). Los valores significativamente diferentes del vehículo (VEH) (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ) se determinaron por ANADEVVA de dos vías seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni (paneles **A** y **C**) o ANADEVVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Dunnett (paneles **B** y **D**).

En la segunda serie de experimentos, a los ratones se les inyectó carragenina y seis días después (postratamiento) se les trató con vehículo, ZGE (30  $\mu\text{g/pata}$ ) o diclofenaco (30  $\mu\text{g/pata}$ ). En este caso, el postratamiento periférico local con la ZGE mostró una tendencia a revertir la inflamación inducida por carragenina; sin embargo, el efecto no fue estadísticamente significativo (**Figura 18–A y B**). Asimismo, el diclofenaco no fue capaz de revertir la inflamación al sexto día de inyectada la carragenina. Por el contrario, la ZGE (30  $\mu\text{g/pata}$ ), pero no el diclofenaco, revirtió parcialmente la alodinia táctil establecida en ratones (**Figura 18–C y D**). Con estos resultados, de nuevo se vuelve evidente el efecto antinociceptivo de la ZGE encima de su efecto antiinflamatorio.



**Figura 18.** Efecto antiinflamatorio y antialodínico local de ZGE después de 6 días de la inyección de carragenina. Panel **A**: Curso temporal del porcentaje de inflamación. Panel **B**: ABC del curso temporal (Porcentaje de inflamación contra tiempo, UA). Panel **C**: Curso temporal del 50% de umbral de retirada (g). Panel **D**: ABC del curso temporal (50% de umbral de retirada contra tiempo, UA). VEH: DMSO 50% en SSI. DIC: diclofenaco (30  $\mu$ g/pata). Cada medición representa la media  $\pm$  EEM con ocho ratones por grupo (n=8). Los valores significativamente diferentes del vehículo (VEH) (\*p <0.05, \*\*p <0.01, \*\*\*p <0.001, \*\*\*\*p <0.0001) se determinaron por ANADEVa de dos vías seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni (paneles **A** y **C**) o ANADEVa de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Dunnett (paneles **B** y **D**).

El curso de seis horas realizado después de la inyección de carragenina nos permitió establecer la actividad potencial del pretratamiento con la ZGE en procesos agudos de inflamación y dolor, sin embargo, después de 15 días de la inyección de carragenina, el pretratamiento con la ZGE mostró diferencias significativas frente al grupo control, lo que sugiere que podría tener actividad antiinflamatoria y analgésica sobre procesos subcrónicos. Sin embargo, cuando se administra la ZGE como postratamiento, 6 días después de la inyección de carragenina, no se observa el efecto antiinflamatorio, solo el efecto antialodínico, lo que sugiere que la ZGE actúa por un mecanismo de acción diferente, dependiendo de la evolución la inflamación o el proceso nociceptivo, dirigiéndose a una diana diferente.

El efecto antialodínico en estos experimentos, también se puede explicar a través de la participación de la ZGE en la inhibición del sistema excitatorio en los nervios periféricos, ya que los neurotransmisores excitatorios monoaminérgicos contribuyen al proceso de sensibilización después de la lesión tisular, así mismo, la PGE<sub>2</sub> reduce la sinapsis glicinérgica en las neuronas del asta dorsal (Sluka y Westlund, 1993; Ahmadi *et al.*, 2002). Entonces, la ZGE puede actuar por modulación de los receptores GABA<sub>A</sub> que pueden compensar la reducción de la neurotransmisión mediada por glicina en la hiperalgesia inflamatoria. Esta aseveración después se comprobó a partir de la administración del antagonista flumazenil, en los experimentos de la sección 6.1.3.

En resumen, la actividad antiinflamatoria y antialodínica de la ZGE, es mayor cuando se administra de manera local, y no sistémica. La administración local periférica de ZGE reduce únicamente la inflamación aguda inducida por carragenina; sin embargo, revierte la alodinia táctil instaurada de manera aguda y crónica, cuando se administra de manera preventiva o paliativa. Este efecto antialodínico, es consistente con el efecto antinociceptivo de la ZGE previamente demostrado en el modelo de formalina en ratones por vía oral (Reyes-Pérez *et al.*, 2019). En conjunto, estos resultados sugieren que la ZGE es eficaz para tratar y prevenir el dolor inflamatorio.

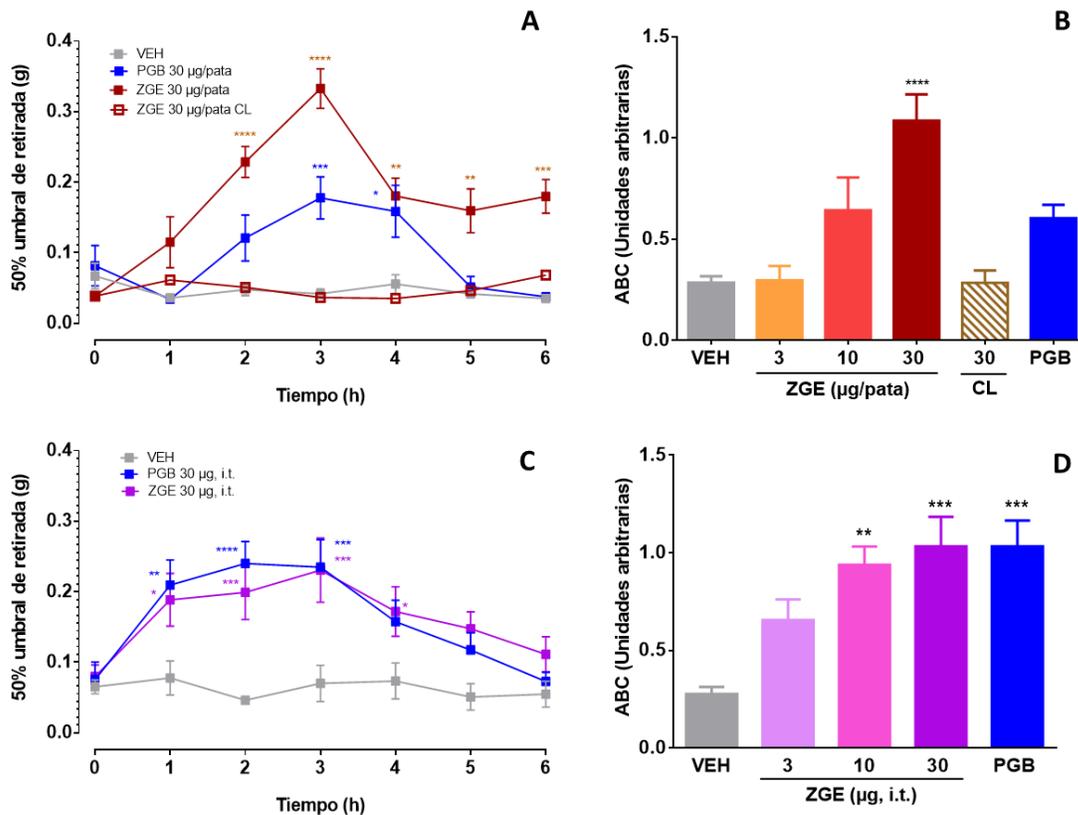
### 6.1.2. Efecto antialodínico en el modelo de neuropatía diabética inducida por STZ

El dolor clínico, ya sea dolor de tipo inflamatorio producido por lesiones a los tejidos o inflamación, como el dolor neuropático causado por lesiones en el sistema nervioso, se caracterizan por hipersensibilidad en el sitio del daño y el tejido adyacente normal. La hipersensibilidad por dolor inflamatorio puede desaparecer si el daño o enfermedad que lo causa es controlado; sin embargo, el dolor neuropático persiste mucho después de aparecido el evento que lo inició (Woolf and Salter, 2000). Por lo que, después de observar los resultados antinociceptivos de la ZGE en un modelo de dolor inflamatorio, se decidió estudiar su potencial analgésico en un modelo de dolor neuropático, como se presenta a continuación.

Para determinar si la ZGE es capaz de disminuir el dolor neuropático en ratones hiperglucémicos por STZ, usamos dos esquemas de administración: intraplantar e intratecal. En estas condiciones, la administración periférica local de la ZGE (30 µg/pata) revirtió parcialmente la alodinia táctil en ratones hiperglucémicos (**Figura 19-A**). Sorprendentemente, el tratamiento periférico local con pregabalina (30 µg/pata), utilizada como fármaco de elección para el

tratamiento del dolor neuropático, indujo un efecto antialodínico menor que la ZGE. El efecto antialodínico de la ZGE (3–30  $\mu\text{g/pata}$ ) fue dependiente de la concentración (**Figura 19–B**).

Por su parte, la administración intratecal de la ZGE (30  $\mu\text{g}$ ) revirtió parcialmente la alodinia táctil en ratones hiperglucémicos (**Figura 19–C**). Mientras que el tratamiento con pregabalina (30  $\mu\text{g}$ ) indujo un efecto antialodínico similar al de la ZGE. Al igual que en el experimento anterior, la ZGE (3–30  $\mu\text{g}$ ) revirtió la alodinia de una forma concentración-dependiente (**Figura 19–D**).



**Figura 19.** Efecto antialodínico de la ZGE en un modelo de neuropatía diabética en ratones. Panel **A**: Curso temporal de la administración local vía i.pl. Panel **B**: ABC del curso temporal (50% del umbral de retirada contra el tiempo, UA). VEH: DMSO 50% en SSI. PGB: pregabalina (30  $\mu\text{g/paw}$ ). Panel **C**: Curso temporal de la administración sistémica vía i.t. Panel **D**: ABC del curso temporal (50% del umbral de retirada contra el tiempo, UA). VEH: DMSO 60% en SSI. PGB: pregabalina (30  $\mu\text{g, i.t.}$ ). Cada medición representa la media  $\pm$  EEM con ocho ratones por grupo ( $n=8$ ). Los valores

significativamente diferentes del vehículo (VEH) (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ) se determinaron por ANADEVVA de dos vías seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni (paneles **A** y **C**) o ANADEVVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Dunnett (paneles **B** y **D**).

El modelo animal de dolor neuropático diabético inducido por STZ intenta imitar los principales signos del dolor neuropático humano, a través de la inducción de hiperglucemia (Wattiez y Barrière, 2012) que induce cambios estructurales en el sistema nervioso periférico que conducen a hiperalgesia y alodinia (Frank, Nawroth y Kuner, 2019).

En este estudio se demostró que la ZGE tiene una actividad antialodínica local ya que aumenta significativamente el umbral de retiro solo en la pata ipsilateral, y no hay efecto en la pata contralateral, lo que sugiere que ejerce su actividad en el sistema nervioso periférico cuando se administra por vía intraplantar, pero también ejerce una modulación a nivel central ya que también revierte la alodinia cuando se administra por vía intratecal.

Con base en la eficacia para revertir la alodinia, la ZGE podría tener un mecanismo de acción como los medicamentos actuales utilizados para el tratamiento del dolor neuropático que incluye anticonvulsivos, antidepresivos y opioides; además de un mecanismo similar con los gabapentinoides (derivados del ácido gamma-aminobutírico) que son el tratamiento de primera línea para el dolor neuropático, como es el caso de la pregabalina. La pregabalina ha demostrado actividad en el tratamiento de pacientes con neuropatía periférica diabética y neuralgia posherpética, disminuyendo la liberación de neurotransmisores excitatorios (glutamato y norepinefrina) al unirse a las subunidades  $\alpha 2\text{-}\delta$  de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, considerados responsables de la actividad antinociceptiva o anticonvulsiva (Tassone *et al.*, 2007; Alles y Smith, 2017).

Por otro lado, la sensibilización central produce hipersensibilidad al dolor al incrementar directamente mecanismos excitatorios; sin embargo, la pérdida patológica de mecanismos de inhibición (desinhibición) también puede incrementar la excitabilidad y por lo tanto el dolor. Cuando ocurre una lesión en los nervios periféricos, esto se manifiesta en la pérdida sustancial de corrientes inhibitorias, particularmente aquellas mediadas por GABA. Lo anterior sugiere que la desinhibición contribuye a la hipersensibilidad en pacientes con dolor neuropático (Woolf, 2004). De acuerdo con los resultados en este modelo, la ZGE puede ejercer su efecto antialodínico al restaurar los mecanismos inhibición GABAérgica (Mogil *et al.*, 1999; Rondón *et al.*, 2010). El presunto efecto inhibitor de la ZGE podría ser el puente entre su eficacia en el dolor inflamatorio y el dolor neuropático.

Todos los experimentos realizados hasta el momento indican que la ZGE puede ser un fármaco potencial para el tratamiento tanto del dolor inflamatorio como neuropático, por lo que este estudio no solo contribuye a la justificación científica del uso etnofarmacológico de *Z. grandiflora*, sino que, además, representa una propuesta de un fármaco potencial para la terapia del dolor.

### 6.1.3. Evaluación del mecanismo de acción de la ZGE

La evidencia de la actividad de la ZGE, principalmente como un agente antinociceptivo, condujo al estudio de la participación de los sistemas serotoninérgico, opioidérgico, GABAérgico y nitrérgico, ya que es bien sabido que estos sistemas participan en la modulación del dolor a nivel central y periférico cuando se produce un proceso inflamatorio (Millan, 1999). Para ello, se utilizó el modelo de la carragenina en ratones. Los ratones fueron tratados inicialmente con naloxona (5 y 50 µg/pata), metiotepina (0,03 y 0,3 µg/pata) o flumazenil (6 y 30 µg/pata), respectivamente. Y, para evaluar la participación de la cascada ON-GMPcíclico–canales de K<sup>+</sup>ATP, se administró a los animales L-

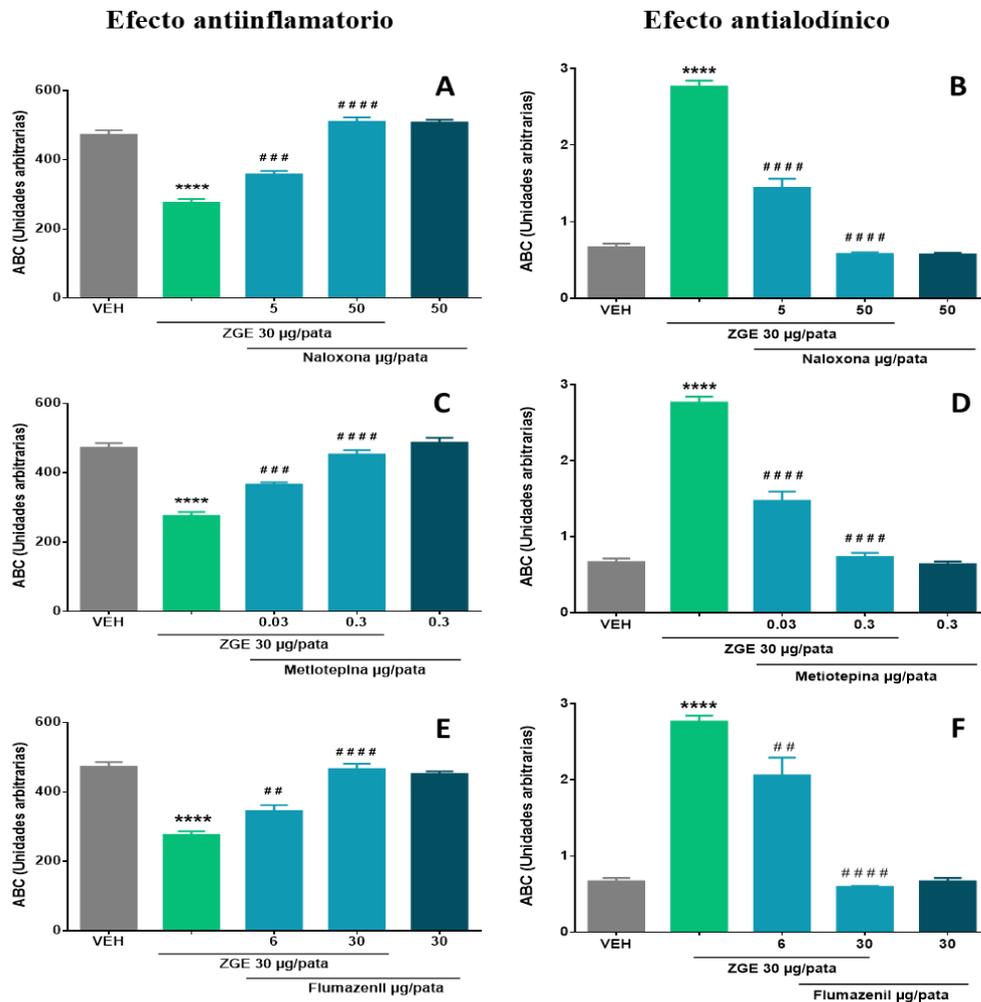
NAME (15 y 150  $\mu\text{g/pata}$ ), ODQ (7.5 y 75  $\mu\text{g/pata}$ ) o glibenclamida (10 y 100  $\mu\text{g/pata}$ ). En todos los casos, luego de la administración de los antagonistas, los animales recibieron la dosis más activa de la ZGE (30  $\mu\text{g/pata}$ ) en los experimentos previos.

Los resultados revelaron que las administraciones periféricas locales de naloxona (**Figura 20–A y B**), metiotepina (**Figura 20–C y D**) y flumazenil (**Figura 20–E y F**), revirtieron los efectos antiinflamatorios y antialodínicos de ZGE (30  $\mu\text{g/pata}$ ) de forma dependiente de la concentración. Por su parte, estos antagonistas administrados solos, no produjeron ningún efecto sobre la inflamación y la alodinia táctil inducida por carragenina (**Figura 20**), lo que demuestra que *per se* no presentan ninguno de estos dos efectos a la concentración mayor administrada o que, por el contrario, no causan una inflamación y umbral de retirada mayores al vehículo.

Estos resultados sugieren que ZGE produce su efecto mediante la activación de los receptores opioides periféricos, 5-HT y GABA<sub>A</sub>. Lo anterior no es de extrañarse, ya que hay una cantidad considerable de experimentos, en los que se ha demostrado que las vías opiodérgicas, serotoninérgicas y GABAérgicas conducen a la antinocicepción en varios modelos de dolor en roedores (Millan, 1999).

Los receptores opioides participan en los procesos periféricos de las neuronas sensoriales (presentes en las fibras C y A) y, además, los agonistas opioides inyectados sistémicamente actúan sobre los receptores opioides espinales y supraespinales, pero actúan predominantemente sobre los periféricos, los cuales se sobreexpresan tras el daño tisular (Stein, Schäfer y Machelska, 2003), consecuencia de la administración de carragenina al 1%. La naloxona, (un antagonista no selectivo), tiene afinidad por los receptores  $\mu$  (pKi 9),  $\delta$  (pKi 7,8) y  $\kappa$  (pKi 7,8–8) (Meng et al., 1993). Entonces, los datos obtenidos sugieren que cualquiera de estos tres receptores opioides, participan en el

efecto antiinflamatorio y antialodínico periférico de la ZGE. Sin embargo, dado que existen receptores  $\mu$  en las terminales periféricas de los nociceptores, que juegan un papel importante en la antinocicepción, estos podrían estar implicados preferentemente en la acción de la ZGE. (Iwaszkiewicz, Schneider y Hua, 2013)



**Figura 20.** Evaluación del mecanismo antiinflamatorio y antinociceptivo de la ZGE en el modelo del edema de pata inducido por carragenina: participación de receptores opioides (panel A y D), modulación mediante los sistemas serotoninérgico (panel B and D) y GABAérgico (panel C y F). VEH: vehículo (DMSO 50% en SSI). Paneles A-C: Cada barra representa el valor de la media del área bajo la curva (ABC, porcentaje de inflamación contra el tiempo)  $\pm$  EEM de  $n = 8$  ratones. Paneles D-F: Cada barra representada por el valor de la media del área bajo la curva (ABC, 50% del umbral de retirada contra el tiempo)  $\pm$  EEM de  $n = 8$  ratones. Los valores significativamente diferentes del vehículo (VEH) (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ) se determinaron mediante ANADEV

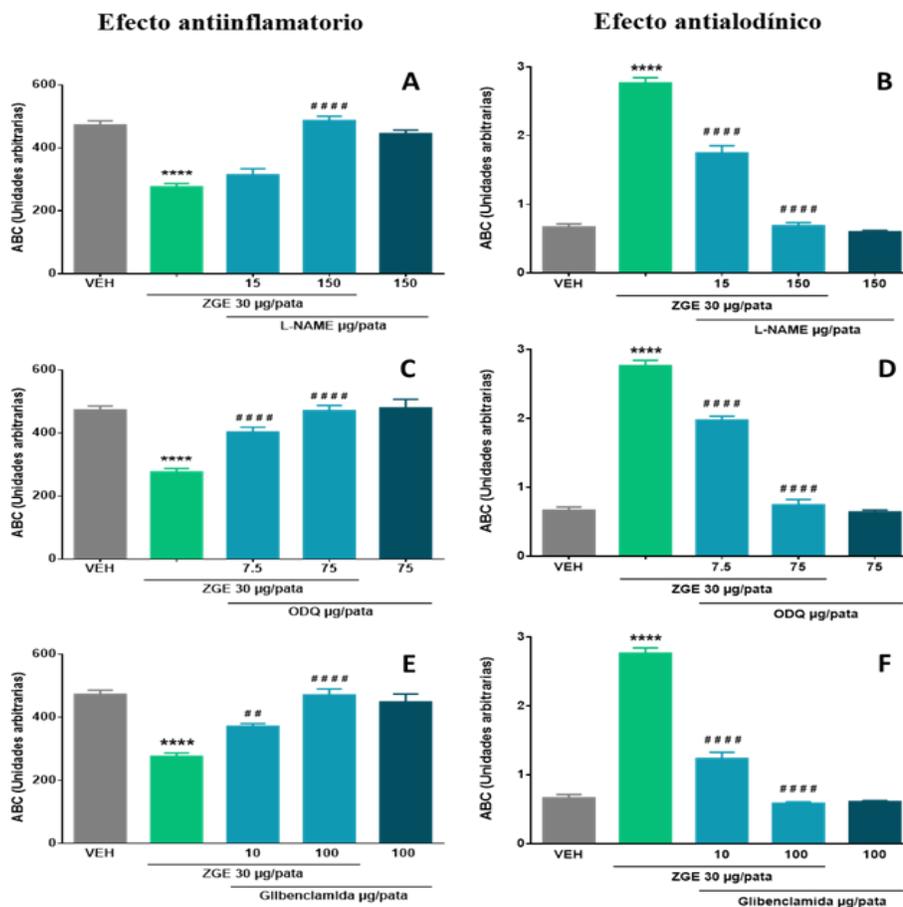
de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Dunnett, y los valores significativamente diferentes de ZGE (##p < 0.01, ###p < 0.001 and ####p < 0.0001) se determinaron mediante ANADEVIA de una vía seguido por la prueba *post hoc* de Tukey.

Con respecto a la vía serotoninérgica, está bien justificado papel importante de la serotonina (5-HT) en el proceso de inflamación ya que esta se almacena en mastocitos, plaquetas y células endoteliales, y se libera cuando se produce una lesión; también existe evidencia de la participación de esta sustancia en la modulación de la nocicepción (Rocha-González *et al.*, 2005) cuya complejidad radica en la naturaleza del receptor 5-HT activado (Millan, 1999). En esta serie de experimentos, el antagonista de los receptores 5-HT<sub>1/2/5/6/7</sub>, metiotepina, (Sánchez-López *et al.*, 2009) revirtió los efectos de la ZGE, por lo que se deduce su participación en la actividad farmacológica de esta molécula. Sin embargo, a pesar de la inespecificidad de la metiotepina, estudios previos mostraron que los receptores periféricos 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>6</sub> y 5-HT<sub>7</sub> tienen un efecto pronociceptivo mientras que los receptores periféricos 5-HT<sub>1</sub> (afinidad a la metiotepina pKi 6.2-8.1), y 5-HT<sub>5A</sub> (afinidad a la metiotepina pKi 7.5) juegan un papel antinociceptivo. (Hoyer *et al.*, 1994; Cervantes-Durán *et al.*, 2012; Muñoz-Islas *et al.*, 2014). Por lo tanto, la ZGE podría activar cualquiera de los receptores periféricos 5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>5A</sub>.

El dolor también puede modularse desde la periferia con la participación de los receptores GABA<sub>A</sub> en el asta dorsal de la médula espinal, donde impiden la propagación de señales excitatorias a áreas superiores del sistema nervioso central (Zeilhofer, Möhler y Di Lio, 2009). Existe evidencia que apoya fuertemente la pérdida de la inhibición GABAérgica en los procesos inflamatorios periféricos causados por el bloqueo de los receptores de glicina en el asta dorsal, que a su vez es secundario a la producción espinal de PGE<sub>2</sub>, sin afectar los receptores GABA<sub>A</sub> (Ahmadi *et al.*, 2002).

El flumazenil (un antagonista de los receptores GABA<sub>A</sub>) tiene diferentes afinidades por las diferentes subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> [ $\alpha_5$  (pKi 9.2),  $\alpha_1$  (pKi 9.1),  $\alpha_2$  (pKi 9.1),  $\alpha_3$  (pKi 9) y  $\alpha_6$  (pKi 6.8)] (Huang *et al.*, 1998). La subunidad  $\alpha_5$  promueve la nocicepción; en contraste, la activación de las subunidades  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  y  $\alpha_6$  del receptor GABA<sub>A</sub> se ha relacionado con la antinocicepción. (Xu *et al.*, 2013; Witkin *et al.*, 2019). Los datos obtenidos en el presente estudio sugieren que la interacción de la ZGE con cualquiera o todas estas subunidades pueden dar cuenta de sus efectos antiinflamatorios y antialodínicos; en particular porque los receptores GABA<sub>A</sub> se localizan en las neuronas aferentes primarias (Carlton, Zhou and Coggeshall, 1999), involucradas en la inyección periférica de la carragenina. Sin embargo, la regulación del sistema de inhibición GABAérgico, también puede explicar la actividad antialodínica de la ZGE en los experimentos realizados previamente en el modelo de la carragenina y en modelo de neuropatía diabética, como se infirió.

Finalmente, se reconoce que la vía del ON-GMPc con la subsiguiente activación de los canales K<sup>+</sup> dependientes de ATP, participa en la modulación de la nocicepción periférica, ya que se ha propuesto como mecanismo de acción de una variedad de analgésicos clásicos (Romero y Duarte, 2009; De Carvalho Veloso *et al.*, 2015), incluidos los opioides como la morfina (A. R.A. Rodrigues and Duarte, 2000), y los AINES como el diclofenaco (Ortiz, Granados-Soto and Castañeda-Hernández, 2003). La administración periférica local de L-NAME (**Figura 21–A y B**), ODQ (**Figura 21–C y D**) o glibenclamida (**Figura 21–E y F**) revirtieron de manera dependiente de la concentración los efectos antiinflamatorios y antialodínicos de ZGE (30  $\mu$ g/pata). L-NAME, ODQ y glibenclamida por sí solos, no produjeron ningún efecto sobre la inflamación y la alodinia táctil inducida por carragenina (**Figura 21**), lo que evidencia la participación de la cascada ON-GMPc-canales de K<sup>+</sup> sensibles a ATP.



**Figura 21.** Evaluación del mecanismo antiinflamatorio y antinociceptivo de la ZGE en el modelo del edema de pata inducido por carragenina: participación de la ruta del óxido nítrico. VEH: vehículo (DMSO 50% en SSD), L-NAME: NG-L-nitro-arginine methyl ester, ODQ: 1-H-[1,2,4]oxodiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. Paneles **A-C**: Cada barra representa el valor de la media del área bajo la curva (ABC, porcentaje de inflamación contra el tiempo)  $\pm$  EEM de  $n = 8$  ratones. Paneles **D-F**: Cada barra representada por el valor de la media del área bajo la curva (ABC, 50% del umbral de retirada contra el tiempo)  $\pm$  EEM de  $n = 8$  ratones. Los valores significativamente diferentes del vehículo (VEH) (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ) se determinaron mediante ANADEVa de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Dunnett, y los valores significativamente diferentes de ZGE (##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$  and ####  $p < 0.0001$ ) se determinaron mediante ANADEVa de una vía seguido por la prueba *post hoc* de Tukey.

L-NAME, un inhibidor de la síntesis de óxido nítrico bloqueó los efectos de la ZGE de forma dependiente de la concentración, lo que concordó con evidencias previas sobre la participación del ON en el efecto antinociceptivo de varios fármacos a nivel periférico (Duarte, Lorenzetti y Ferreira, 1990;

Granados-Soto *et al.*, 1997). Los antiinflamatorios y los efectos antialodínicos de la ZGE también fueron bloqueados por ODQ, un inhibidor de la guanililciclase soluble sensible al óxido nítrico (Moro *et al.*, 1996), lo que indica que la activación de la vía NO-GMPc está involucrada en estos efectos. Finalmente, el bloqueador de canales de K<sup>+</sup> sensible a ATP, glibenclamida (Edwards y Weston, 2003), también revirtió los efectos de la ZGE, por lo que es importante mencionar que el ON puede estimular la guanilil ciclase soluble (Horst *et al.*, 2019) y diferentes tipos de canales de K<sup>+</sup> en varios tejidos, (Armstead, 1996) incluido el muscular, como el de la pata de ratón.

Estos resultados indican que la ZGE activa la cascada ON-GMPc-canales de K<sup>+</sup> sensibles a ATP, que es un mecanismo común para varios fármacos, como los antiinflamatorios no esteroideos (AINES), la dipirona y la morfina. (Kusuda *et al.*, 2020) También son consistentes con hallazgos previos que demuestran que la activación periférica de esta cascada de señalización induce antinocicepción en roedores. (Rodrigues y Duarte, 2000)

En resumen, la actividad antiinflamatoria y antialodínica de la ZGE es polivalente ('multitarget'), involucrando mecanismos opioidérgicos, serotoninérgicos y GABAérgicos, así como la cascada de ON-GMPc-canales de K<sup>+</sup> sensibles a ATP.

#### 6.1.4. Estudios de acoplamiento molecular de la ZGE con diversos receptores

Con base en los resultados anteriores, se llevaron a cabo análisis de acoplamiento molecular con el objetivo de respaldar los resultados obtenidos en el modelo *in vivo* sobre la participación de los receptores serotoninérgicos, opioidérgicos y GABAérgicos en la actividad biológica. Las energías de unión de ZGE, compuestos antagonistas y compuestos co-cristalizados (para la

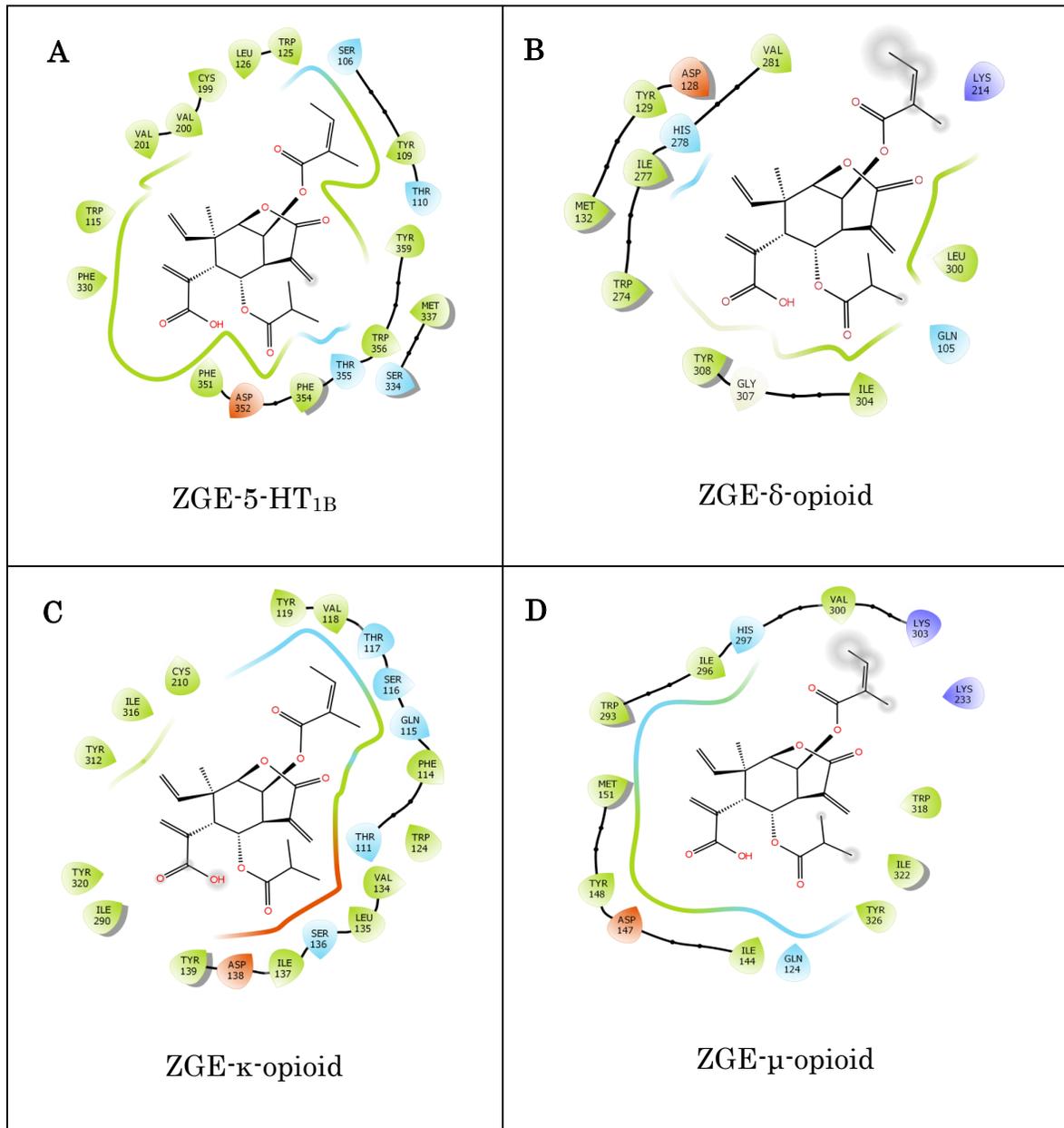
validación de los protocolos de acoplamiento) con los receptores utilizados se presentan en la **Tabla 7**.

**Tabla 7.** Energías de unión de los compuestos utilizados para los estudios de acoplamiento molecular con los receptores evaluados.

Compuestos	5-HT <sub>1B</sub> (4IAR)	δ-opioide (6PT3)	κ-opioide (6VI4)	μ-opioide (5C1M)	GABA <sub>A</sub>
	Energías de unión (kcal/mol)				
ERM	-14.3				
Metiotepina	-7.7				
DPI		-11.1			
JD <sub>Tic</sub>			-11.0		
4VO				-10.6	
Naloxona		-8.4	-8.9	-7.9	
Flumazenil					-6.3
ZGE	-8.2	-7.5	-7.4	-7.6	-7.9

En el caso de la interacción con receptores serotoninérgicos, en los estudios, *in vivo* se planteó la posibilidad de que la ZGE ejerza su actividad antinociceptiva a partir de la interacción con los receptores 5-HT<sub>1</sub> o 5-HT<sub>5A</sub>, sin embargo, para los estudios de acoplamiento molecular sólo se encontró la estructura cristalizada del receptor 5-HT<sub>1B</sub> (código pdb 4IAR), por lo que se analizó este. Los resultados predijeron que la ZGE se une al sitio activo del receptor 5-HT<sub>1B</sub> (-8,2 kcal/mol) con mayor afinidad que el antagonista metiotepina (-7,7 kcal/mol) (**Tabla 7**), lo que confirma su participación en la actividad antinociceptiva observada en el modelo de la carragenina. El sitio de unión se conforma por Ser106, Tyr109, Thr110, Trp115, Trp125, Leu126, Cys199, Val200, Val201, Phe330, Ser334, Met337, Phe351, Asp352, Phe354, Thr355, Trp356 y Try359 (Wang *et al.*, 2013). La ZGE presenta un enlace tipo puente de hidrógeno con Tyr109 (**Figura 22-A**). Este resultado es consistente con el hecho de que el sumatriptán, un agonista del receptor 5HT<sub>1B/1D</sub>, está involucrado en la reducción de la vasodilatación inducida por capsaicina y la

hiperalgesia térmica inducida por carragenina en roedores (Bingham *et al.*, 2001; Carmichael, Charlton y Dostrovsky, 2008). Además, los receptores 5-HT<sub>1B</sub> juegan un papel inhibitor de la nocicepción inducida por formalina y calor nocivo en ratones “knock-out” para 5-HT<sub>1B</sub> (Granados-Soto *et al.*, 2010).





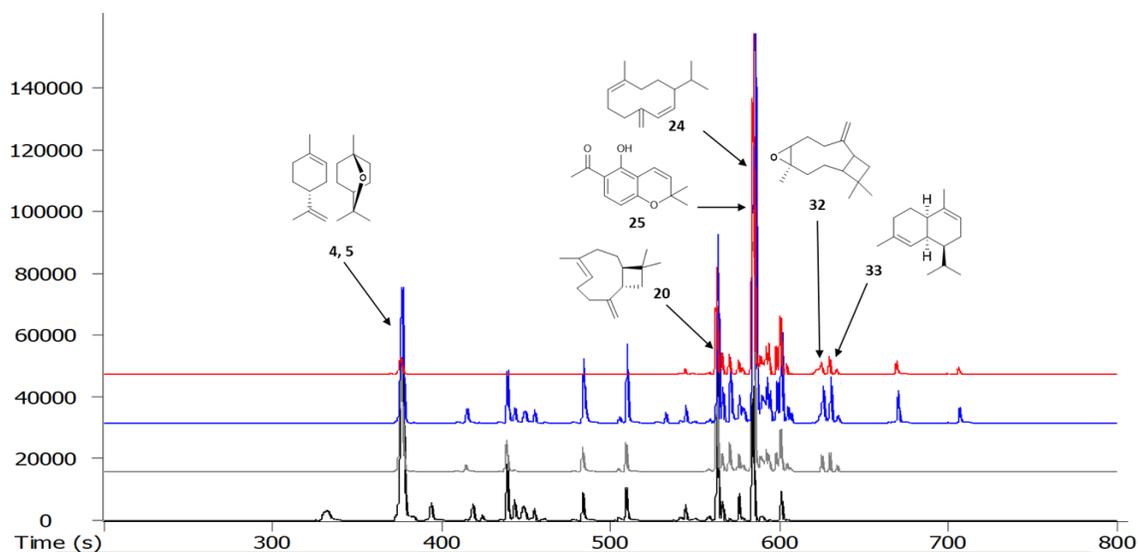
Tyr139 fueron importantes para el reconocimiento de sustratos (**Figura 22–C**). Finalmente, el estudio de acoplamiento del compuesto ZGE con el receptor  $\mu$  reveló interacciones con los principales residuos en el sitio activo, Asp147, Tyr148, Met151, Val300, Ile322 y Tyr326. Tyr148 son importantes para el reconocimiento de moléculas pequeñas (Dumitrascuta *et al.*, 2020). Otras interacciones fueron con los residuos Gln124, Ile144, Lys233, Trp293, Ile296, Lys303 y Trp318 (**Figura 22–D**). Con estos estudios, se encontró que el compuesto ZGE presenta un modo de unión similar a los receptores opioides  $\delta$ ,  $\kappa$  y  $\mu$ , en los cuales la ZGE adopta una orientación similar a la naloxona y otros agonistas, además, comparte varias interacciones esenciales entre receptor y ligando. Por lo cual, se puede concluir que de acuerdo con los estudios *in silico*, la ZGE se comporta como un agonista no selectivo de receptores opioides.

Por otro lado, el análisis de acoplamiento de la ZGE con la subunidad  $\alpha 1\gamma 2$  del receptor GABA<sub>A</sub> (**Figura 22–E**) y la pose de energía mínima de acoplamiento (–7.9 kcal/mol) mostró que esta molécula se une en un sitio diferente al del flumazenil (–6.3 kcal/mol), con una energía mayor que este. La ZGE interactúa con los residuos Arg28, Arg30, Pro31, Gly32, Trp94, Thr95, Pro96, Asp97 y Tyr161 de la subunidad  $\alpha 1$ ; y con Leu34, Tyr38, Ser100, Asn101, Met102, Val103, Lys105, Asn128 y Arg129 de la subunidad  $\gamma 2$ . Además, se identificaron dos enlaces por puentes de hidrógeno entre la Tyr161 de la subunidad  $\alpha 1$  y el hidrógeno de la amida de Met102 de la subunidad  $\gamma 2$  con el compuesto ZGE. Estos resultados confirman la participación de los receptores GABA<sub>A</sub> en la actividad antinociceptiva de la ZGE, observado en el modelo de la carragenina.

## 6.2. Análisis de los compuestos volátiles en la infusión y el aceite esencial de *Z. grandiflora*

De acuerdo con los antecedentes etnobotánicos, *Z. grandiflora* se usa para el alivio del dolor bajo la forma de infusión o cataplasmas (Stevenson, 1915; Swank, 1932). Esta última forma de uso sugiere la participación del volatilo en el efecto terapéutico de la planta. Para determinar, entonces, esta posibilidad se decidió evaluar farmacológicamente el aceite esencial de la planta, obtenido por hidrodestilación, y establecer su composición química; de manera adicional, se estudió la composición de volátiles de la infusión activa. Cabe señalar que el potencial terapéutico de los aceites esenciales ha ganado mucho interés en los últimos años, ya que algunos de sus moléculas pequeñas cumplen con los requisitos de fármacos aprobados, o sirven para el desarrollo de fármacos basados en fragmentos (Feyaerts, Luyten y Van Dijck, 2020).

La composición volátil de la infusión de *Z. grandiflora* se estableció mediante MEFS-EC acoplada a CG-EM. Para el proceso de microextracción se utilizaron cuatro tipos de fibras MEFS para detectar un número más significativo de compuestos en el espacio de cabeza, según su afinidad con cada recubrimiento de las fibras. Cada fibra está recubierta con materiales específicos con diferentes propiedades de adsorción relacionadas con el peso molecular y la polaridad de los compuestos presentes en el material vegetal (Souza-Silva *et al.*, 2015). Así, la fibra cubierta con polidimetilsiloxano (PDMS; 100  $\mu\text{m}$ ) tiene mayor afinidad por compuestos no polares; la que tiene un envoltorio de polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB; 65  $\mu\text{m}$ ) adsorbe compuestos de polaridad media; la fibra revestida con divinilbenceno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/carboxeno/ PDMS; 50/30  $\mu\text{m}$ ) es afín a una amplia gama de compuestos de distintas polaridades; y, por último, la de carboxeno/polidimetilsiloxano (Carboxeno/PDMS; 75  $\mu\text{m}$ ) es afín a compuestos no polares (Wasielewska, Banel y Zygmunt, 2013).

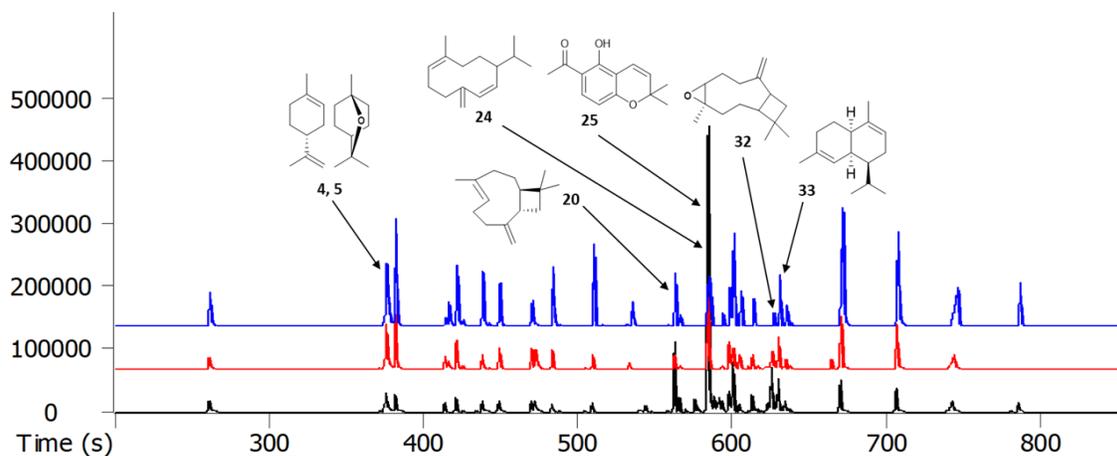


**Figura 23.** Cromatogramas de iones totales obtenidos por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) de los compuestos volátiles presentes en *Z. grandiflora* obtenidos por la técnica de microextracción en fase sólida en espacio de cabeza (MEFS-EC). Cada cromatograma corresponde a una fibra diferente de MEFS: PDMS, 100  $\mu\text{m}$  (rojo); PDMS/DVB, 65  $\mu\text{m}$  (azul); DVB/ Carboxen/PDMS, 50/30  $\mu\text{m}$  (gris); Carboxen/PDMS, 75 $\mu\text{m}$  (negro). Cada análisis se llevó a cabo por triplicado.

De acuerdo con los cromatogramas de iones totales (CIT) obtenidos por CG (**Figura 23**) se observaron claramente extracciones diferenciadas con una de las cuatro fibras empleadas. En total, se identificaron mediante CG-EM, 34 compuestos volátiles en la infusión de *Z. grandiflora*. La fibra de PDMS/DVB absorbió una mayor cantidad de compuestos de polaridad media, y extrajo la mayor cantidad de moléculas, destacándose entre ellas, la DME (**25**) y el germacreno D (**24**) por su alta concentración (**Tabla 8**).

Por otra parte, el análisis de CG-EM del aceite esencial de *Z. grandiflora* (AE) reveló la presencia de 24 compuestos (**Figura 24**). De estos, el germacreno D (13.24%) y la DME (13.24%) se encontraron en mayor proporción, seguidos del óxido de cariofileno (9.77%), D-limoneno (6.05%),  $\alpha$ -cadineno (5.1%), y eucaliptol (4.67%) (**Tabla 8**). Estos resultados son consistentes con los compuestos volátiles identificados en la infusión. Sin embargo, con la técnica MEFS-EC se identificaron más moléculas, ya que este tipo de extracción es más

suave, manejable y sensible que la hidrodestilación (Souza-Silva *et al.*, 2015). El  $\alpha$ -tolualdehído, el alcohol feniletílico, la L-verbenona, la dihidroactinólida, el trans- $\alpha$ -bisaboleno, el ácido n-hexadecanoico y el fitol no fueron extraídos por ninguna de las fibras utilizadas, lo que plantea la pregunta de si, alguno de éstos, se genera durante la hidrodestilación (Hüsnü and Buchbauer, 2015).



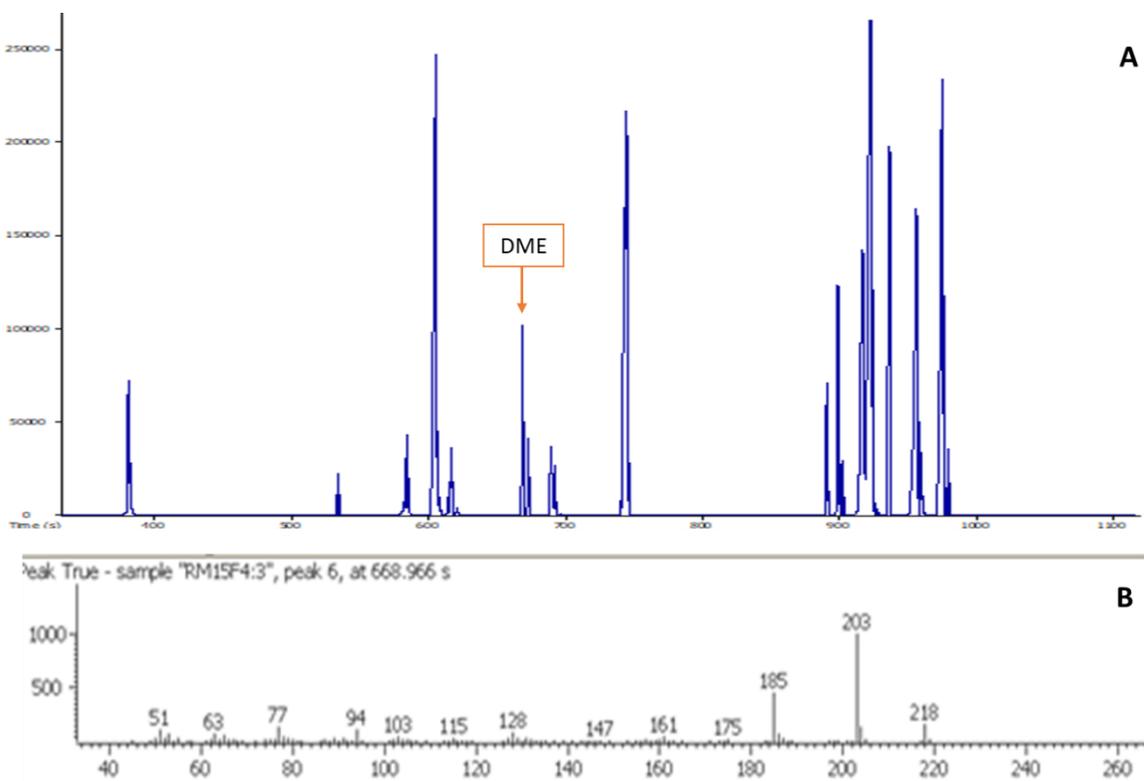
**Figura 24.** Cromatogramas de iones totales obtenidos por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) de tres muestras ( $n = 3$ ) de aceite esencial obtenido por hidrodestilación, a partir de un mismo lote de las partes aéreas de *Z. grandiflora*.

**Tabla 8.** Compuestos volátiles identificados por CG-EM en la infusión de *Zinnia grandiflora* y su aceite esencial (AE).

No.	Compuestos	IR <sup>a</sup>	Composición (%)					Método de identificación <sup>b</sup>
			AE	PDMS 100 µm	PDMS/ DVB 65 µm	DVB/Car/ PDMS 50/30 µm	Carboxen/ PDMS 75 µm	
1	1-Hexanol	868	1.33	–	–	–	7.02	EM, IR
2	Benzaldehído	950	–	–	–	–	3.42	EM, IR
3	3-Octenol	970	–	–	–	–	4.95	EM, IR
4	D-Limoneno	1017	6.05	3.90	16.71	24.66	22.15	EM, IR, RMN
5	Eucaliptol	1019	4.67	–	–	4.53	22.41	EM, IR, RMN
6	α-Tolualdehído	1028	2.18	–	–	–	–	EM, IR
7	Artemisia cetona	1051	–	–	–	–	1.13	EM, IR
8	Alcohol feniletílico	1103	0.97	–	–	–	–	EM, IR
9	L-Canfor	1135	2.42	–	2.70	5.94	4.07	EM, IR
10	L-Mentona	1144	–	–	2.33	–	2.04	EM, IR
11	Pinocarvona	1152	–	–	–	–	1.73	EM, IR
12	Borneol	1156	2.00	–	0.99	–	–	EM, IR
13	L-4-terpineol	1166	–	–	–	–	0.85	EM, IR
14	L-Verbenona	1196	2.71	–	–	–	–	EM, IR
15	Pulegona	1225	1.94	–	3.59	4.76	2.26	EM, IR
16	O-Metil timol	1227	–	–	2.88	–	–	EM, IR
17	Carvacrol	1286	1.88	–	1.78	5.05	2.98	EM, IR
18	α-Cubebeno	1339	–	–	0.69	–	–	EM, IR
19	α-Copaeno	1366	–	0.94	2.17	–	0.95	EM, IR
20	Cariofileno	1412	3.85	6.78	5.94	7.30	7.38	EM, IR, RMN
21	Aromadendreno	1420	–	–	1.14	–	–	EM, IR
22	Geranil acetona	1431	–	–	–	3.94	–	EM, IR
23	Humuleno	1447	0.66	1.88	0.90	1.60	1.18	EM, IR
24	Germacreno D	1466	13.24	22.60	17.35	1.82	5.69	EM, IR, RMN
25	Desmetilisoencecalina	1469	13.24	22.66	17.40	25.16	5.61	EM, IR, RMN
26	α-Muuroleno	1489	–	1.85	–	1.64	–	EM, IR
27	γ-Cadineno	1505	–	1.97	0.88	–	–	EM, IR
28	δ-Cadineno	1511	3.56	6.17	3.69	–	–	EM, IR
29	Calameneno	1513	3.56	6.17	3.69	2.90	2.49	EM, IR
30	Dihidroactinólido	1523	1.24	–	–	–	–	EM, IR
31	trans-α-Bisaboleno	1545	2.34	–	–	–	–	EM, IR
32	Óxido de cariofileno	1578	9.77	9.52	5.07	4.67	–	EM, IR, RMN
33	α-Cadineno	1590	5.13	3.72	3.92	3.13	–	EM, IR, RMN
34	Epóxido de humuleno II	1602	2.68	1.33	1.50	1.52	–	EM, IR
35	Óxido de ledeno II	1649	–	–	2.47	–	–	EM, IR
36	p-Heptilacetofenona	1706	–	3.42	–	–	–	EM, IR
37	Hexahidrofarnesil acetona	1819	3.42	2.02	0.47	–	–	EM, IR
38	Ácido n-hexadecanoico	1941	3.80	–	–	–	–	EM, IR
39	Fitol	2085	2.17	–	–	–	–	EM, IR
	<b>% Total identificado</b>		<b>94.81</b>	<b>94.94</b>	<b>98.26</b>	<b>98.62</b>	<b>98.32</b>	

IR<sup>a</sup> es el índice de retención en la columna no polar (DB-5MS) de los compuestos identificados. EM<sup>b</sup> = espectro de masas; IR = Índice de retención comparado con los respotes en la literatura (base de datos NIST); RMN = resonancia magnética nuclear (<sup>1</sup>H y/o <sup>13</sup>C). Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado (n = 3).

Para asegurar la identidad de los componentes principales del AE (germacreno D, DME, óxido de cariofileno y D-limoneno), estos se aislaron y caracterizaron como se describe en la sección de desarrollo experimental. En el caso de la DME, su identificación inequívoca a partir de los análisis de RMN de una y dos dimensiones (**Figs. 1-4, Anexo 1**), fueron importantes, ya que no se contaba con referencias en las bases de datos de su espectro de masas. Además del AE, también detectó DME en la fracción de hexano obtenida por reparto de la infusión, utilizando la técnica de coelución del estándar como se presenta en la **Figura 25**.



**Figura 25.** Análisis de CG-EM de la fracción hexánica de la infusión de *Z. grandiflora*. Panel **A**: Cromatograma de iones totales. Panel **B**: Espectro de masas del pico correspondiente a la desmetilisoencecalina (DME).

### 6.3. Evaluación del potencial antiinflamatorio y antialodínico del aceite esencial de *Z. grandiflora*

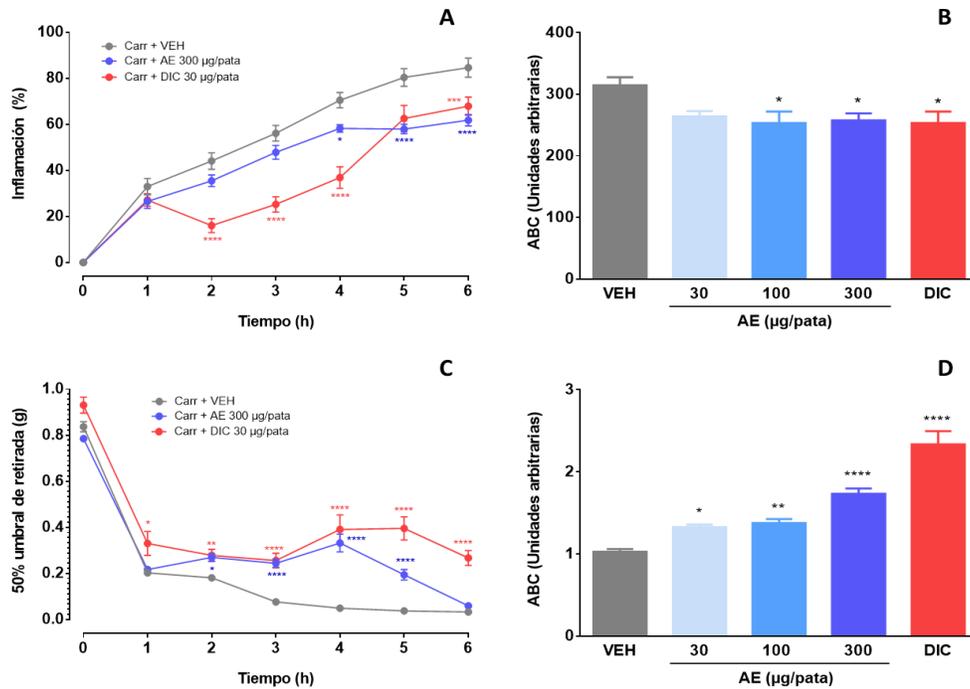
#### 6.3.1. Evaluación en el modelo del edema de pata inducido por carragenina

La inflamación inducida por carragenina ha sido bastante útil para predecir la actividad de los fármacos antiinflamatorios. Más aún, este modelo también ofrece la posibilidad de explorar los efectos sobre el dolor inflamatorio localizado; ya que varios estudios han demostrado que el desarrollo de edema inicial causado por la inyección de carragenina va seguido de un período de alodinia (Morris, 2003b). Durante nuestra investigación previa de los efectos farmacológicos de *Z. grandiflora*, encontramos que este modelo es bastante adecuado para el estudio de sus propiedades antiinflamatorias y antinociceptivas (Reyes-Pérez *et al.*, 2019, 2021).

En los ensayos con este modelo, la carragenina indujo una respuesta inflamatoria máxima entre 5 y 6 h, mientras que la alodinia táctil máxima se observó después de 3 h (**Figura 26–A y C**). La inyección periférica local de AE (30, 100 y 300  $\mu\text{g/pata}$ ) redujo ligeramente el porcentaje de inflamación, en comparación con el grupo VEH, con diferencias significativas a la concentración de 300  $\mu\text{g/pata}$ , 5 y 6 h después de la inyección de carragenina (**Figura 26–A**). El efecto antiinflamatorio preventivo observado con todos los tratamientos fue independiente de la concentración (**Figura 26–B**) y comparable con el efecto del diclofenaco (30  $\mu\text{g/pata}$ ), fármaco de referencia en este modelo (Morris, 2003b).

Además, la alodinia táctil se revirtió parcialmente (**Figura 26–C**) con todas las concentraciones de AE ensayadas, de manera dependiente de la concentración (**Figura 26–D**). Sin embargo, este efecto no fue más significativo que el producido por el diclofenaco. Aunque el AE fue ligeramente eficaz en la prevención de los cambios inducidos por la carragenina, fue evidente que posee

un mayor potencial antinociceptivo que antiinflamatorio. Los resultados son consistentes con el efecto antinociceptivo, previamente informado, de la infusión en ambas fases del ensayo de la formalina y la respuesta antiinflamatoria en el edema de la pata inducido por carragenina (Reyes-Pérez *et al.*, 2019).



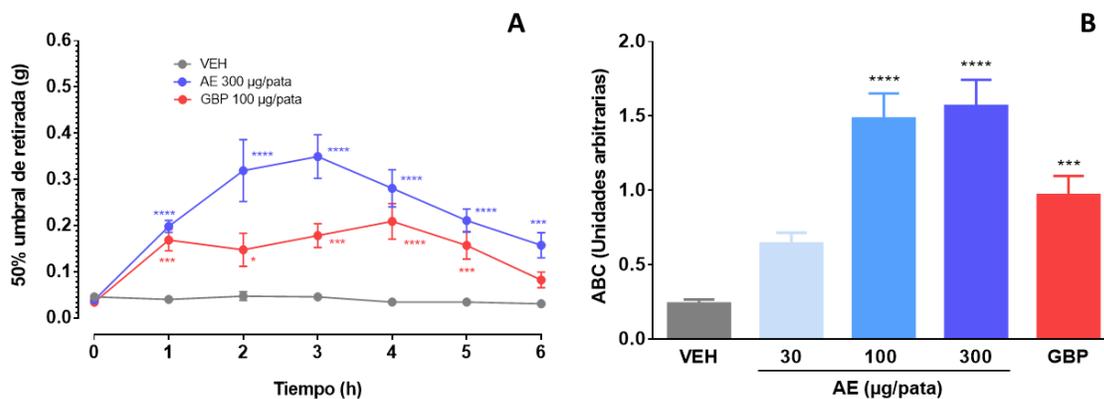
**Figura 26.** Efecto antiinflamatorio y antialodínico del aceite esencial (AE) de *Zinnia grandiflora* en el modelo del edema de pata inducido por carragenina en ratones. Panel A: Curso temporal del porcentaje de inflamación. Panel B: ABC del curso temporal (porcentaje de inflamación contra tiempo, UA). Panel C: Curso temporal del 50% de umbral de retirada (g). Panel D: ABC del curso temporal (50% de umbral de retirada contra tiempo, UA). VEH: aceite mineral. Cada medición representa la media  $\pm$  EEM con ocho ratones por grupo (n=8). Los valores significativamente diferentes del vehículo (VEH) (\*p<0.5, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p <0.0001) se determinaron por ANADEVA de dos vías seguido de la prueba post hoc de Bonferroni (paneles A y C) o ANADEVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Dunnett (paneles B y D).

### 6.3.2. Evaluación en el modelo LNE en ratones

El dolor neuropático ocurre después de daño o disfunción del sistema nervioso periférico o central caracterizado por hiperalgesia, alodinia y dolor

espontáneo. Sobre este tema, existen estudios limitados sobre la efectividad de los AEs o sus componentes contra el dolor crónico como la neuropatía. El modelo SNL se ha convertido en el procedimiento estándar para los estudios de la neuropatía periférica y la detección de nuevos analgésicos y sus mecanismos de acción (Ye *et al.*, 2015).

Los resultados en el modelo LNE revelaron que el AE revirtió parcialmente la alodinia táctil de manera dependiente de la concentración (Figura 27), alcanzando el efecto máximo con la mayor concentración analizada (300  $\mu\text{g}$ ) tres horas después de la administración (Figura 27–A). El efecto antialodínico del AE fue más significativo que el efecto producido por el control positivo, gabapentina (GBP, 100  $\mu\text{g}$ ), que es eficaz en el alivio del dolor neuropático en humanos, ratas y ratones (Gilron and Flatters, 2006; Kiso *et al.*, 2008). También se administró diclofenaco (DIC, 30  $\mu\text{g}$ ) como control con el objetivo de comparar su efecto en el modelo LNE y en el modelo de la carragenina. Este AINE mostró un efecto antialodínico deficiente, en concordancia con estudios previos en los que el diclofenaco (3, 10 y 30 mg/kg, i.p.) es ineficaz en un modelo de dolor neuropático en ratones (Kiso *et al.*, 2008).



**Figura 27.** Efecto antialodínico del aceite esencial (AE) de *Zinnia grandiflora* en el modelo de ligadura de nervio espinal en ratones. Panel **A**: Curso temporal del 50% de umbral de retirada (g). Panel **B**: ABC del curso temporal (50% de umbral de retirada contra tiempo, UA). VEH: aceite mineral. Cada medición representa la media  $\pm$  EEM con ocho ratones por grupo ( $n=8$ ). Los valores significativamente diferentes del vehículo (VEH) (\* $p<0.5$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ , \*\*\*\* $p<0.0001$ ) se determinaron por

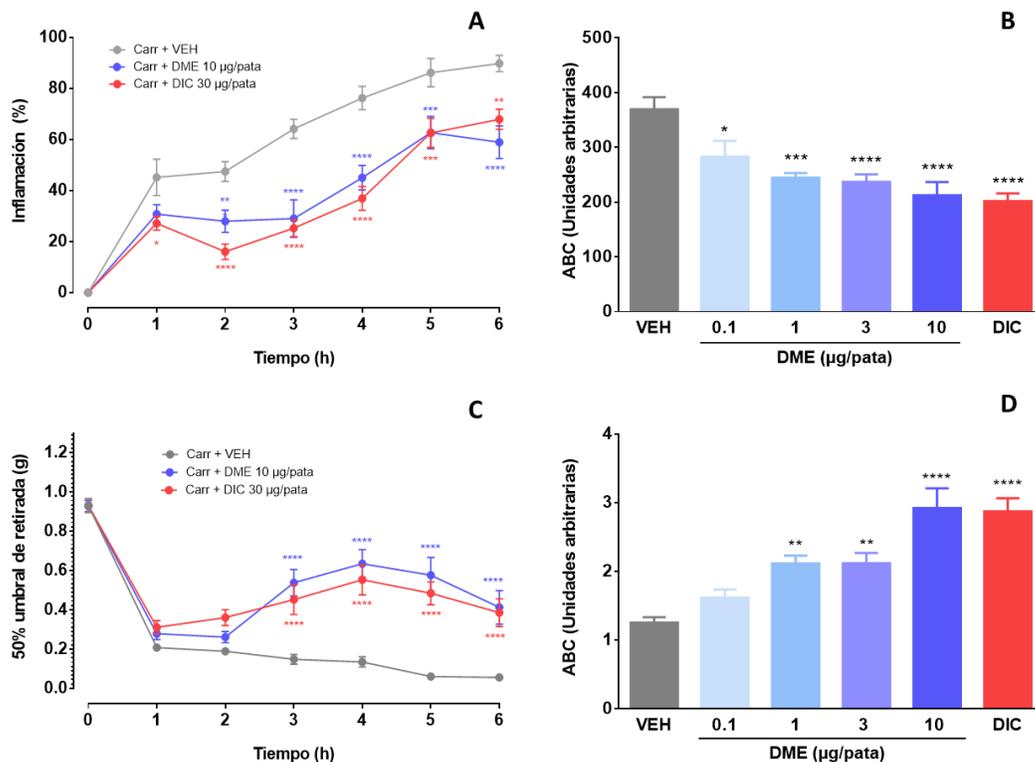
ANADEVA de dos vías seguido de la prueba post hoc de Bonferroni (panel **A**) o ANADEVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Dunnett (panel **B**).

## 6.4. Evaluación del potencial antiinflamatorio y antialodínico de la DME

Por lo general, los componentes principales de los aceites esenciales reproducen fielmente las propiedades biofísicas y biológicas del aceite del que fueron aislados; y constantemente, el efecto general del aceite depende de las concentraciones de sus componentes principales (Bakkali *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta que la DME era uno de los componentes principales del AE, se evaluó en los mismos modelos farmacológicos que este último.

### 6.4.1. Evaluación en el modelo de pata inducido por carragenina

En la prueba de edema de la pata inducida por carragenina, la DME (0,1, 1, 3 y 10  $\mu\text{g/pata}$ ) redujo significativamente la inflamación en función de la concentración (**Figura 28-B**). A la mayor concentración, DME mostró la máxima reducción de la inflamación desde la primera hora después de la inyección de carragenina y durante las 6 horas que duró el experimento (**Figura 28-A**). Estos resultados indicaron que la DME actúa tanto en la fase fagocítica como no fagocítica de la respuesta a la carragenina (Salvemini *et al.*, 1996). La DME también mostró un efecto antialodínico dependiente de la concentración en este modelo (**Figura 28-D**) con una reversión significativa de la alodinia táctil a concentraciones de 1, 3 y 10  $\mu\text{g}$ . El curso temporal de las respuestas antialodínicas y antiinflamatorias de la DME a 10  $\mu\text{g/pata}$  mostró un patrón similar al diclofenaco (30  $\mu\text{g/pata}$ ) (**Figura 28-A y C**).

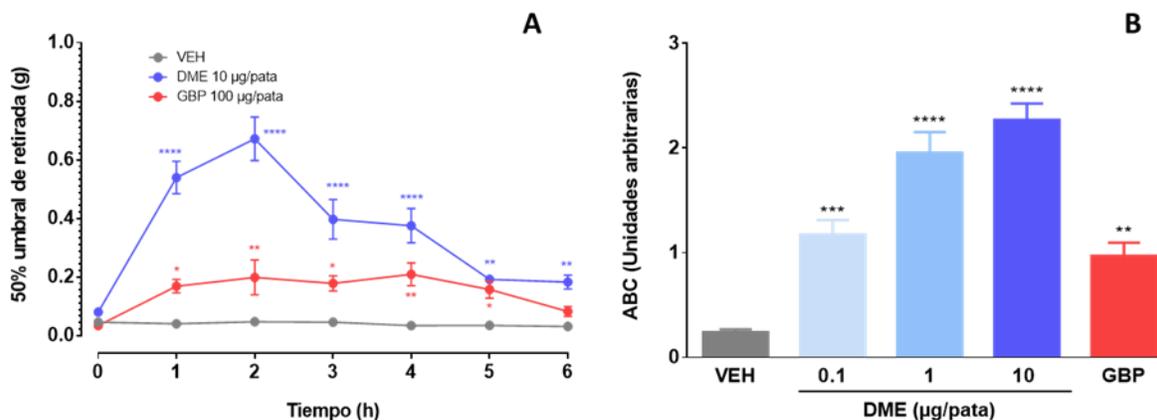


**Figura 28.** Efecto antiinflamatorio y antialodínico de la desmetilisoencecalina (DME) en el modelo del edema de pata inducido por carragenina en ratones. Panel **A**: Curso temporal del porcentaje de inflamación. Panel **B**: ABC del curso temporal (porcentaje de inflamación contra tiempo, UA). Panel **C**: Curso temporal del 50% de umbral de retirada (g). Panel **D**: ABC del curso temporal (50% de umbral de retirada contra tiempo, UA). VEH: aceite mineral. Cada medición representada como la media  $\pm$  EEM con ocho ratones por grupo ( $n=8$ ). Los valores significativamente diferentes del vehículo (VEH) (\* $p<0.5$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ , \*\*\*\* $p<0.0001$ ) se determinaron por ANADEVAs de dos vías seguido de la prueba post hoc de Bonferroni (paneles **A** y **C**) o ANADEVAs de una vía seguido de la prueba post hoc de Dunnett (paneles **B** y **D**).

#### 6.4.2. Evaluación en el modelo LNE

La DME (0.1, 1, 3 y 10  $\mu\text{g/pata}$ ) también ejerció un efecto antialodínico dependiente de la concentración en el modelo LNE (Figura 29–B). A la dosis de 10  $\mu\text{g}$ , la DME ejerció su efecto máximo dos horas después de la administración, revirtiendo la alodinia táctil a un valor medio de 0.67 g del 50% del umbral de retiro (Figura 6a). Por el contrario, el efecto máximo de AE fue de 0.35 g (Figura 26–A). En este conjunto de experimentos, el efecto de GBP

(100  $\mu\text{g}$ ) fue comparable a la dosis más baja de DME estudiada (0.1  $\mu\text{g}$ ) (Figura 29–B).



**Figura 29.** Efecto antialodínico de la desmetilisoencecalina (DME) en el modelo LNE en ratones. Panel **A**: Curso temporal del 50% de umbral de retirada (g). Panel **B**: ABC del curso temporal (50% de umbral de retirada contra tiempo, UA). VEH: aceite mineral. Cada medición representa la media  $\pm$  EEM con ocho ratones por grupo ( $n=8$ ). Los valores significativamente diferentes del vehículo (VEH) ( $*p<0.5$ ,  $**p<0.01$ ,  $***p<0.001$ ,  $****p<0.0001$ ) se determinaron por ANADEVa de dos vías seguido de la prueba post hoc de Bonferroni (panel **A**) o ANADEVa de una vía seguido de la prueba post hoc de Dunnett (panel **B**).

La evidencia revela que los mecanismos inflamatorios e inmunitarios tanto en el sistema nervioso central como en el periférico juegan un papel importante en el dolor neuropático. La infiltración de células inflamatorias, en respuesta al daño nervioso, con la posterior liberación de mediadores inflamatorios, podría sensibilizar las neuronas aferentes primarias contribuyendo a la hipersensibilidad al dolor (Moalem y Tracey, 2006). Así, el efecto antiinflamatorio de DME en el modelo de carragenina sugiere una modulación positiva del efecto antialodínico en el sistema nervioso periférico. El mismo razonamiento podría explicar, al menos en parte, la reversión de la alodinia táctil en el modelo LNE que implica un daño nervioso; sin embargo, se necesitan más experimentos para confirmar esta hipótesis.

La mayor efectividad de la DME que el AE sugiere que es un importante principio activo de la mezcla compleja. Sin embargo, no se puede descartar el

papel del resto de componentes principales, en especial el germacreno D, presente en la misma proporción que la DME. Este compuesto aún no ha sido evaluado como agente antinociceptivo o antiinflamatorio; sin embargo, muchos aceites esenciales que contienen germacreno D como componente principal, poseen actividad antinociceptiva y/o antiinflamatoria. Por ejemplo, la esencia de *Ageratum fastigiatum*, que contiene un 24% de germacreno D, inhibió los estiramientos inducidos por el ácido acético, y ambas fases de la prueba de formalina (Lenardão *et al.*, 2016).

Además, hay mucha información sobre la actividad antinociceptiva y/o antiinflamatoria de otros componentes del AE, probados por separado, en varios modelos animales. Así, el  $\beta$ -cariofileno mostró marcadas propiedades antinociceptivas orales en las pruebas de placa caliente y formalina; y también mostró actividad, en el modelo de lesión por constricción del nervio ciático en ratones, a lo largo de las vías opioide y endocannabinoide (Paula-Freire *et al.*, 2014). El D-limoneno, por su parte, inhibió la nocicepción inducida por ácido acético y la segunda fase de la prueba de formalina en ratones (Do Amaral *et al.*, 2007); y también indujo un efecto antihiperalgésico en un modelo de dolor neuropático en ratas (Piccinelli *et al.*, 2015). En ratones, el eucaliptol inhibió la nocicepción química inducida por la administración de formalina intraplantar y ácido acético intraperitoneal en ratones. Además, su actividad antiinflamatoria se ha demostrado en los modelos de edema de la pata inducido por carragenina y granuloma inducido por algodón (Santos y Rao, 2000).

En el caso de la DME, informes anteriores mostraron que este cromeno posee actividades antifúngicas, antifertilidad antialimentarias y antihiperglucémicas (Agarwal *et al.*, 1999, 2000; Escandón-Rivera *et al.*, 2017). Sin embargo, no existe una descripción de sus efectos antinociceptivos y antiinflamatorios, por lo que este trabajo, sentó un precedente para futuras investigaciones sobre el potencial de la DME para tratar diferentes tipos de

dolor, incluido el dolor neuropático, cuya terapia actual carece de tratamientos eficaces para la mayoría de los pacientes (Jensen *et al.*, 2011).

Por último, toda la información anterior sugiere que el sinergismo entre las moléculas contenidas en un aceite esencial puede ser cuestionable cuando los efectos biológicos de uno o dos de sus componentes principales son comparables con los efectos producidos por la mezcla compleja. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que otras moléculas minoritarias modulen la actividad de los componentes principales (Bakkali *et al.*, 2008). Así, hasta este punto, podemos aseverar que tanto las zingradinólidas D-F como la DME, contenidos en la infusión de *Z. grandiflora*, contribuyen a la actividad antiinflamatoria y antinociceptiva demostrada.

En síntesis, toda la información generada en este trabajo, y los estudios sobre la actividad otros compuestos volátiles mayoritarios en el AE, o la infusión justifican el uso de *Z. grandiflora* como cataplasmas o emplastos en el tratamiento de diversos padecimientos dolorosos.

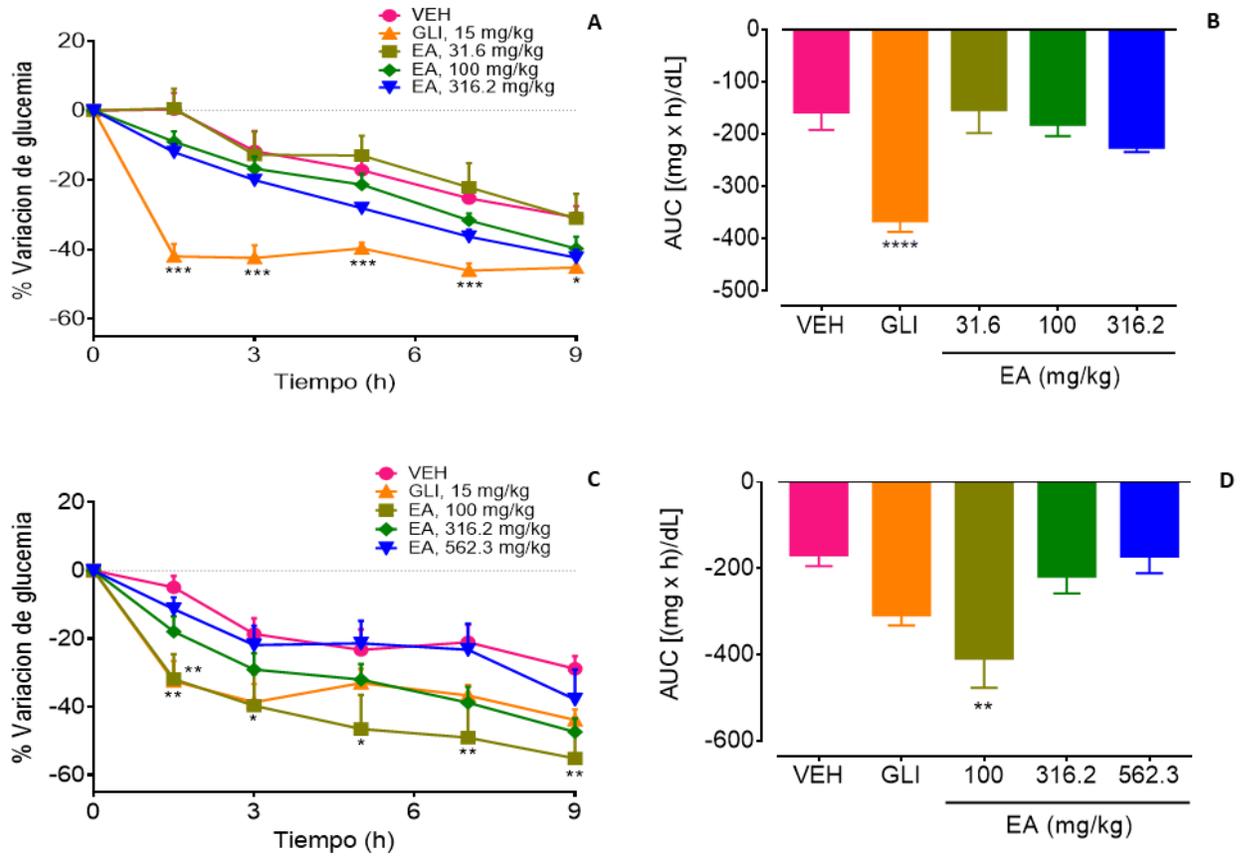
### 6.5. Evaluación de la eficacia preclínica antidiabética del extracto acuoso de *Zinnia grandiflora*

En estudios anteriores a éste se estableció la eficacia preclínica de la infusión de *Z. grandiflora* como analgésico y antiinflamatorio (Reyes-Pérez *et al.*, 2019). En este estudio, también se abordó el estudio del potencial antidiabético de la planta con base en las observaciones de campo de los botánicos colaboradores. Para cumplir con este objetivo se realizaron estudios *in vivo* e *in vitro* que mimetizan los procesos fisiopatológicos y algunos blancos moleculares de importancia involucrados en la diabetes, respectivamente.

### 6.5.1. Efecto hipoglucemiante agudo en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos

El modelo experimental de hiperglucemia inducida por estreptozotocina (STZ 130 mg/kg) en coadministración con nicotinamida (NA, 50 mg/kg), mimetiza muy bien la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) ya que evita un daño total a las células  $\beta$ -pancreáticas; de tal forma que no existe un abatimiento total de la insulina y el animal hiperglucémico se puede tratar con glibenclamida; además, en los animales se observan cambios metabólicos y perfiles bioquímicos similares a los que se presentan en humanos que padecen DMT2. (Szkudelski, 2012; Ghosh y Rangan, 2015). Para evaluar el efecto hipoglucemiante se administraron tres dosis (31.6–562.3 mg/kg, i.g.) del extracto acuoso de *Z. grandiflora*, tanto en animales normoglucémicos como hiperglucémicos, utilizando como control positivo a la glibenclamida (15 mg/kg, i.g.).

Los resultados de este experimento (**Figura 30**) revelaron el extracto acuoso de *Z. grandiflora* no induce efecto hipoglucemiante agudo a las dosis administradas en los ratones normoglucémicos, ya que el porcentaje de variación de la glucemia es comparable con el grupo vehículo. En cambio, en los ratones hiperglucémicos (**Figura 30–C y D**) hay un cambio significativo en la variación de la glucemia ( $p < 0.05$ ) con la dosis de 100 mg/kg respecto al efecto observado en el grupo VEH. Lo anterior indica que uno de los posibles mecanismos de acción del extracto acuoso de *Z. grandiflora* es un efecto secretagogo de la insulina dependiente de glucosa. Sin embargo, es necesario realizar otros experimentos para confirmar este mecanismo de acción.

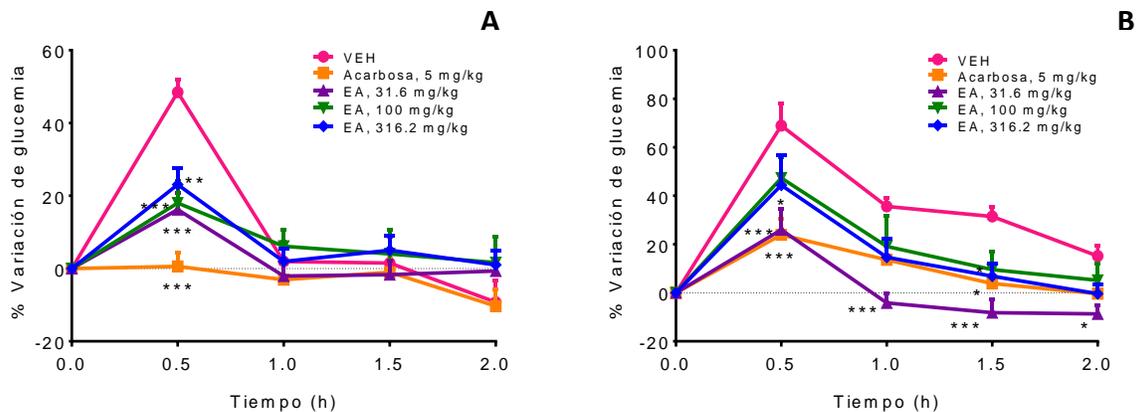


**Figura 30.** Efecto hipoglucemiante agudo del extracto acuoso (EA) de *Zinnia grandiflora* en ratones normoglucémicos (paneles A y B) e hiperglucémicos (paneles C y D). ABC: área bajo la curva; VEH: vehículo (SSI); GLI: glibenclamida. Cada barra o punto representa el promedio  $\pm$  error estándar de la media para cada grupo (n = 6). (A) y (C) ANADEVAs de dos vías, *post hoc* Bonferroni (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001). (B) y (D) ANADEVAs de una vía, *post hoc* de Dunnett (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001).

### 6.5.2. Efecto antihyperglucémico en ratones normoglucémicos e hiperglucémicos

Para evaluar el efecto antihyperglucémico del extracto acuoso de *Z. grandiflora* se realizó la prueba de tolerancia a la sacarosa (PTOS). Para ello se administraron tres dosis (31.6, 100, 316.2 mg/kg, i.g.) del EA de la planta 30 min antes de la administración de 2 g/kg (i.g.) de sacarosa. Como control positivo se utilizó a la acarbosa (5 mg/kg, i.g.). Los resultados de este ensayo se presentan en la **Figura 31**. De manera general, se puede observar en estos

gráficos que el EA disminuye de manera significativa el pico postprandial de la glucosa tanto en los ratones normoglucémicos (**Figura 31–A**) como en los hiperglucémicos (**Figura 31–B**). Sin embargo, resulta interesante resaltar que en los primeros los niveles de glucosa sérica descienden a la media hora de administrado el carbohidrato de manera independiente de la dosis, y posteriormente se mantienen sin cambios significativos estos niveles. Por otro lado, en los ratones hiperglucémicos, la dosis de 31.6 mg/kg del extracto acuoso provoca una disminución significativa de los niveles de glucosa sérica a partir de la media hora de administrado el carbohidrato y hasta las dos horas de duración del experimento. En este caso, incluso el efecto del EA es más pronunciado que el de la acarbosa. Con base en estos resultados, se puede inferir que la especie *Z. grandiflora* biosintetiza metabolitos secundarios que pueden actuar como inhibidores de las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales (Suzuki *et al.*, 2016).



**Figura 31.** Prueba de tolerancia oral a la sacarosa (PTOS) del extracto acuoso (EA) de *Z. grandiflora* en ratones normoglucémicos (**A**) e hiperglucémicos (**B**). VEH: vehículo (SSI) Cada punto representa el promedio  $\pm$  error estándar de la media para cada grupo ( $n = 6$ ). ANADEVAs de dos vías, *post hoc* de Bonferroni (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

### Evaluación de la actividad inhibitoria sobre enzimas $\alpha$ -glucosidasas

De acuerdo con los resultados *in vivo* en la PTS, se evaluó la actividad inhibitoria de *Z. grandiflora* sobre las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas de levadura de cerveza (*Saccaromyces cerevisiae*). El ensayo tiene como base la hidrólisis del sustrato *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido debido a la actividad enzimática de las  $\alpha$ -glucosidasas, de modo que la cuantificación espectrofotométrica del producto colorido de la hidrólisis, *p*-nitrofenol, es inversamente proporcional a la inhibición de la enzima (Oki, Matsui y Osajima, 1999).

Para la realización de estos ensayos *in vitro* se evaluaron el EA de *Z. grandiflora*, fracciones orgánicas, y compuestos puros, con la finalidad de establecer los principios activos del extracto. Cada una de las muestras antes mencionadas se evaluó, en primer lugar, mediante un ensayo “todo o nada” con concentraciones de 200 y 1000 ppm para extractos y fracciones; y de 0.6 y 3.0 mM para compuestos puros. Las muestras que presentaron un porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas mayor al 50% con alguna de estas concentraciones, se seleccionaron para la realización de una curva de actividad inhibitoria contra concentración, y cálculo de la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>).

De acuerdo con los resultados obtenidos (**Tabla 9**) en este ensayo, todas las muestras evaluadas mostraron actividad inhibitoria de las  $\alpha$ -glucosidasas; sin embargo, las muestras de EA y EOT presentaron los porcentajes de inhibición más bajos (menores al 50%) por lo que no fue posible el cálculo de la CI<sub>50</sub>. Los gráficos de CI<sub>50</sub> de las demás muestras analizadas se encuentran en la **Fig. 11, Anexo I**. La fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y de AcOEt obtenidas por reparto de la infusión fueron más activas que el EA, con porcentajes de inhibición de 85.6 y 78.4%, respectivamente. De acuerdo con los análisis previos de estas fracciones, ambas contienen a las zinagrandinólidas D-F (Reyes-Pérez *et al.*, 2019); siendo la fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> la que contiene en mayor cantidad a la zinagrandinólida E. La mayor concentración de las lactonas sesquiterpénicas en las fracciones

orgánicas de la infusión, puede ser la razón de que presenten una mayor actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas. Por lo anterior, se evaluaron las zinagrandinólidas E y F, por separado. Desafortunadamente, no se contaba con suficiente cantidad para la evaluación de la zinagrandinólida D; mientras que la DME no pudo evaluarse debido a su baja solubilidad. Ambas lactonas mostraron actividad, con porcentajes de inhibición de 74.1% para la ZGE, y de 92.7% para la ZGF. Así mismo, la  $CI_{50}$  de la ZGF, fue menos que la de  $CI_{50}$  de la ZGE. Estos resultados nos permitieron identificar a ambas  $\delta$ -elemánólidas como metabolitos activos y, posiblemente, responsables de la actividad antihiper glucémica del extracto acuoso de *Z. grandiflora*.

**Tabla 9.** Efecto inhibitorio de los extractos, fracciones y metabolitos de *Z. grandiflora* sobre las  $\alpha$ -glucosidasas de *Saccharomyces cerevisiae*.

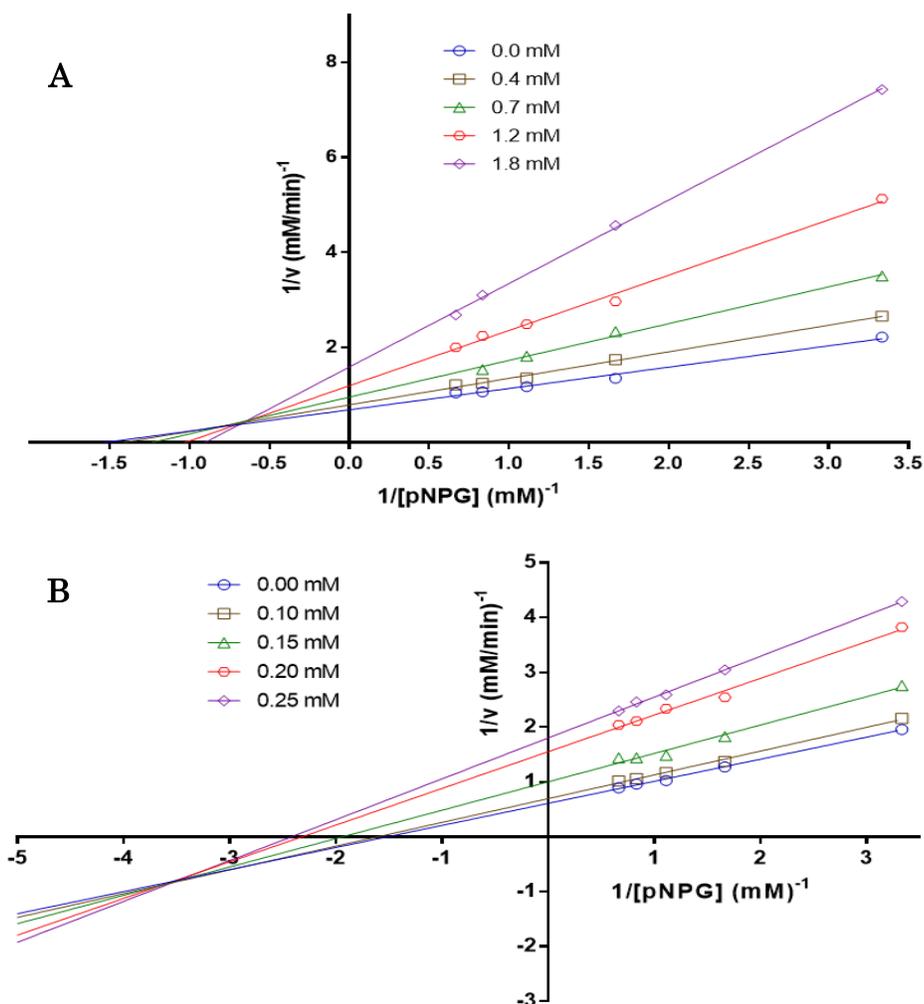
Muestras	$CI_{50}$ (ppm) <sup>a</sup>	% de Inhibición <sup>b</sup>
Extracto acuoso	---	18.5
Extracto Orgánico Total	---	30.4
Fracción AcOEt	613.81 $\pm$ 43.1967	78.4
Fracción CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	473.06 $\pm$ 23.3059	85.6
	$CI_{50}$ (mM) <sup>a</sup>	% de Inhibición <sup>b</sup>
Acarbosa <sup>c</sup>	0.60 $\pm$ 0.0222	81.9
Zinagrandinólida E	2.35 $\pm$ 0.0162	74.1
Zinagrandinólida F	1.42 $\pm$ 0.0409	92.7

<sup>a</sup>Resultado del promedio  $\pm$  la desviación estándar (n = 3); <sup>b</sup>% de inhibición a una concentración máxima de 3.0 mM; <sup>c</sup>Control positivo.

Por otro lado, se realizó la cinética enzimática de la ZGE y ZGF, con la finalidad de caracterizar el tipo de inhibición que ejercen estas elemánólidas sobre las  $\alpha$ -glucosidasas de *Saccharomyces cerevisiae*. El ensayo se realizó variando las concentraciones tanto del sustrato (*p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-

glucopiranosido) como del inhibidor. Con estos datos se generaron gráficos de Lineweaver-Burk de ambos compuestos, los cuales consisten en graficar la recíproca de la respuesta obtenida contra la recíproca de la concentración del sustrato, con lo que se obtiene una serie de rectas con diferentes pendientes que se intersectan entre éstas o en un mismo punto en el eje de las abscisas o de las ordenadas. Con este método se puede identificar de manera gráfica si la inhibición enzimática es competitiva, no competitiva o mixta. Así, cuando las rectas se intersectan en el eje de las ordenadas, se trata de una inhibición competitiva, como es el caso de la acarbosa (Kim *et al.*, 1999). Por otro lado, cuando las rectas se intersectan en eje de las abscisas, se trata de una inhibición no-competitiva. Por último, si las rectas de la gráfica de Lineweaver-Burk se intersectan ya sea por encima o por debajo del eje de las abscisas, entonces hablamos de inhibición mixta (Bhagavan, 2002).

De acuerdo con lo anterior, ambas zinagrandinólidas analizadas muestran una inhibición de tipo mixta, ya que como podemos observar en los gráficos de Lineweaver-Burk (**Figura 32**) las rectas de dobles recíprocos se intersectan por arriba y debajo del eje de las abscisas para la zinagrandinólida E y F, respectivamente. El valor calculado de  $K_i$  de la acarbosa fue de  $0.116 \pm 0.017$  mM ( $R^2 = 0.9883$ ), mientras que para la zinagrandinólida E fue  $0.664 \pm 0.122$  mM ( $R^2 = 0.9804$ ) y para la zinagrandinólida F de  $0.355 \pm 0.094$  mM ( $R^2 = 0.9809$ ).



**Figura 32.** Gráficos de Lineweaver-Burk de la ZGE (panel A) y ZGF (panel B) sobre la inhibición de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas de levadura.

### Estudios de acoplamiento molecular con la enzima $\alpha$ -glucosidasa de levadura

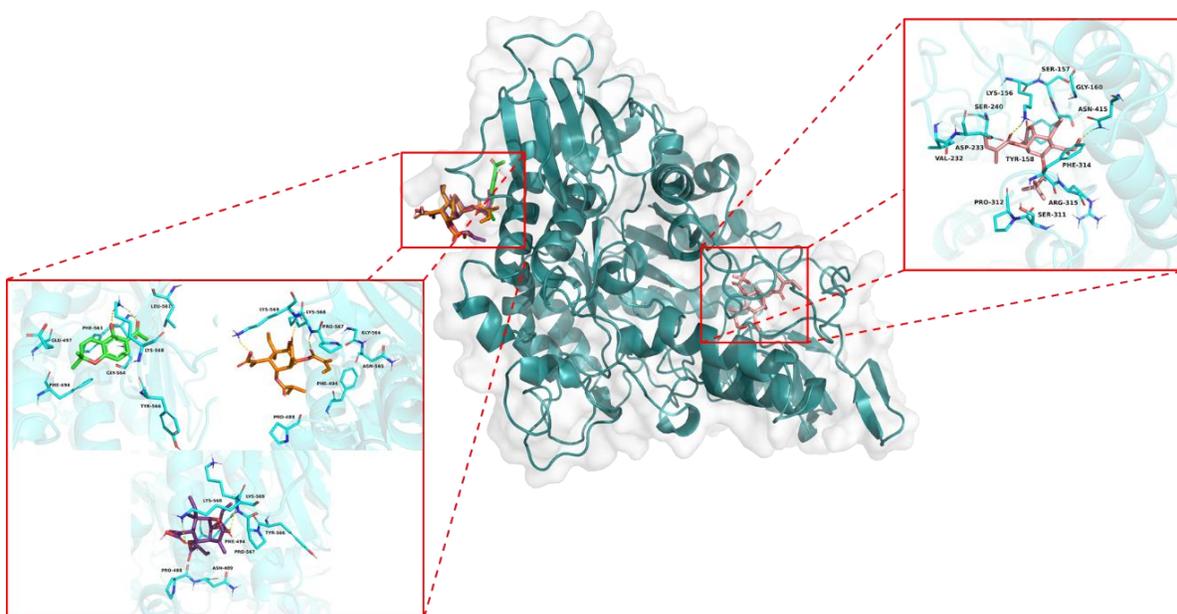
Con la finalidad de respaldar los resultados *in vitro* para la ZGE y ZGF, se realizaron estudios de acoplamiento molecular con la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*. También se estudiaron las interacciones de la enzima con los compuestos ZGD y DME, ya que no se lograron evaluar *in vitro*. Estos estudios se realizaron con la estructura de la enzima cristalizada disponible en Protein Data Bank (código pdb 3A4A), con el protocolo descrito en

la sección de desarrollo experimental. Los resultados revelaron que la todos los compuestos analizados se unen a la enzima en sitios alostéricos (**Figura 33**) y con una afinidad menor que la acarbosa (**Tabla 10**). El compuesto con mayor afinidad por la enzima, de acuerdo con los estudios *in silico*, es la ZGD, por lo que no se puede descartar que este compuesto contribuya también al efecto antihiper glucémico observado en los experimentos *in vivo* para el extracto acuoso de *Z. grandiflora*.

En conjunto, estos estudios, junto con los ensayos *in vivo* e *in vitro*, proporcionan información científica que ayuda a respaldar la eficacia preclínica, y el uso etnobotánico del preparado tradicional de *Z. grandiflora* como antidiabético.

**Tabla 10.** Energía de unión estimada de diversos compuestos de *Z. grandiflora* con  $\alpha$ -glucosidasa de levadura

Compuesto	Energía libre de unión estimada (kcal/mol)
DME	-5.3
ZGD	-6.1
ZGE	-5.8
ZGF	-5.5
Acarbosa	-9.9



**Figura 33.** Posibles sitios de unión para la desmetilisoencecalina (verde claro), zinagrandinólida D (rosa), zinagrandinólida E (naranja), zinagrandinólida F (morado) en sitios alostéricos con la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de levadura (cian, pdb 3A4A)

## 6.6. Predicción de las propiedades químicas, farmacológicas y toxicológicas de los metabolitos secundarios de *Z. grandiflora*

En la actualidad existen herramientas computacionales que han revolucionado la manera de estudiar química y farmacológicamente la potencialidad de las moléculas para actuar como fármacos. En este trabajo se utilizaron los programas de acceso abierto Swiss ADME, Osiris Property Explorer y MolInspiration, como herramientas para estimar parámetros fisicoquímicos, farmacocinéticos, toxicológicos y bioquímicos de moléculas selectas de *Z. grandiflora*.

El software Swiss ADME utiliza un radar de biodisponibilidad, que permite observar la similitud de una molécula con un fármaco. En este gráfico, el área rosa representa el rango óptimo de cada propiedad fisicoquímica para

una molécula con similitud a un fármaco. Al mismo tiempo, la línea roja representa los valores de seis propiedades calculadas que afectan su biodisponibilidad oral. Los compuestos con una similitud óptima con los fármacos deben tener líneas rojas dentro del área rosa. Los descriptores óptimos se establecen de la siguiente manera: lipofilicidad (LIPO):  $-0,7 < XLOGP_3 < +5,0$ ; TAMAÑO:  $150 \text{ g/mol} < PM < 500 \text{ g/mol}$ ; POLAR (polaridad):  $20 \text{ \AA}^2 < \text{área de superficie topológica (TPSA)} < 130 \text{ \AA}^2$ ; INSOLU (solubilidad):  $0 < \log S \text{ (ESOL)} < 6$ ; INSATU (saturación):  $0,25 < \text{fracción de carbonos } sp^3 < 1$ ; y FLEX (flexibilidad):  $0 < \text{número de enlaces giratorios} < 9$ . (Daina, Michielin and Zoete, 2017)

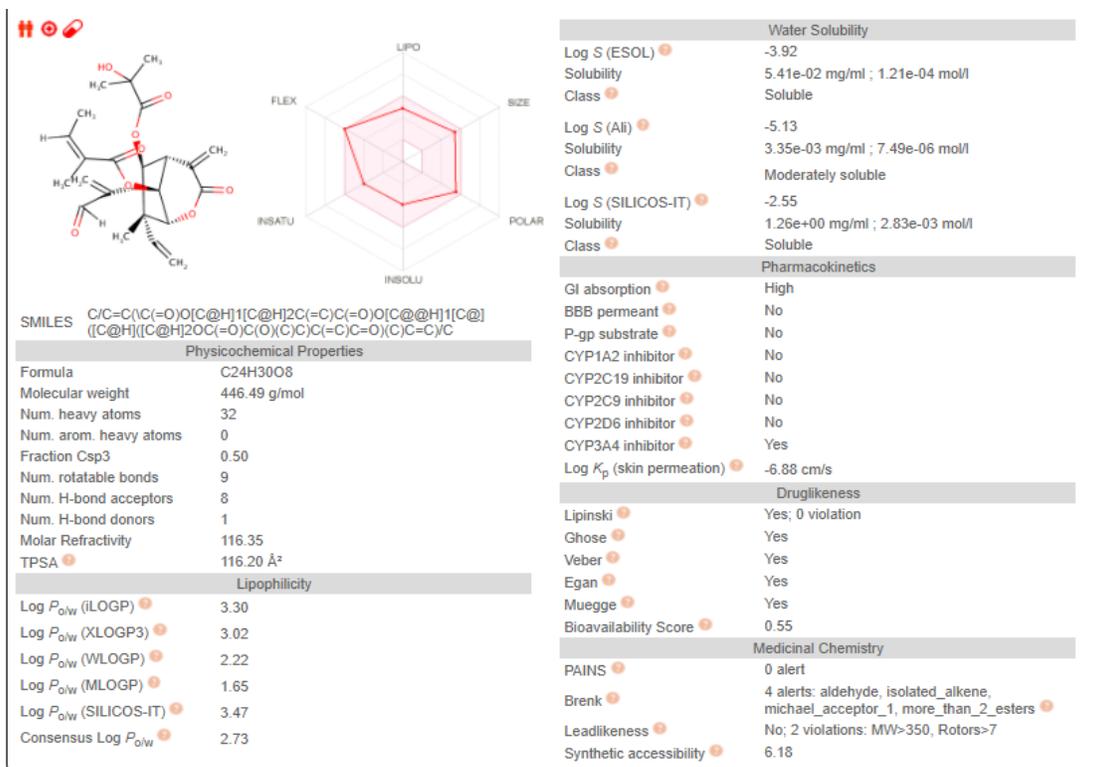
El software de Swiss ADME también proporciona información sobre las características farmacocinéticas de la molécula analizada, como su capacidad para permear la barrera gastrointestinal (g.i.) o hematoencefálica (BBB). Así como datos sobre la unión a la glicoproteína P (P-gp), una proteína implicada en la eliminación activa de xenobióticos de las células, y que está relacionada con la resistencia a fármacos. Toda esta información se encuentra gráficamente representada en modelo de “huevo cocido” (‘BOILED-Egg model’). (Daina y Zoete, 2016)

Otros parámetros estimados para este programa es la similitud a fármacos (‘drug-likeness’) de una molécula basado en 5 filtros: Lipinski, Egan, Weber, Muegee y Ghose. Se incluyen, también, aproximaciones acerca de la probabilidad de que un compuesto presente al menos el 10% de biodisponibilidad oral en ratas o permeabilidad en células Caco-2 (Martin, 2005).

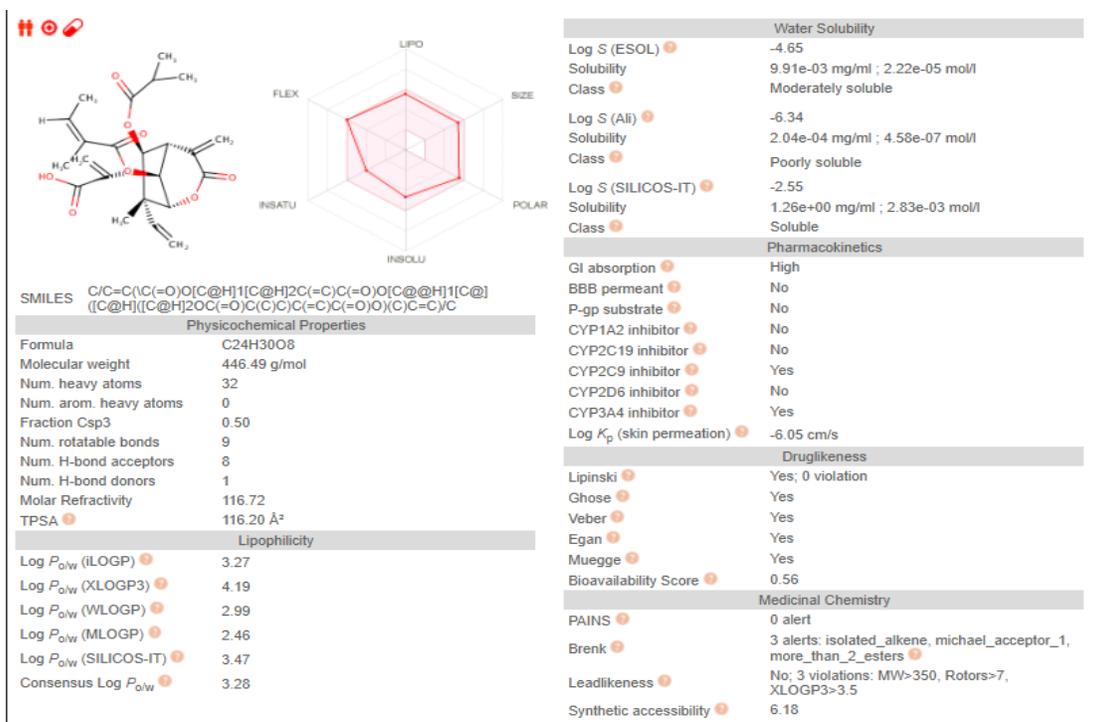
Finalmente, Swiss ADME incluye una sección de química medicinal para facilitar el descubrimiento de nuevos fármacos. En esta sección se incluyen dos aproximaciones complementarias de reconocimiento de patrones para la identificación de fragmentos potencialmente problemáticos. El primer filtro es

la detección de compuestos tipo PAIN ('Pan-assay interference compounds'), los cuales son altamente susceptibles a dar resultados falsos positivos en ensayos de actividad biológica (Baell y Holloway, 2010). En segundo lugar, el filtro de alertas de Brenk, indica si la molécula contiene fragmentos putativamente tóxicos o químicamente reactivos (Brenk *et al.*, 2008).

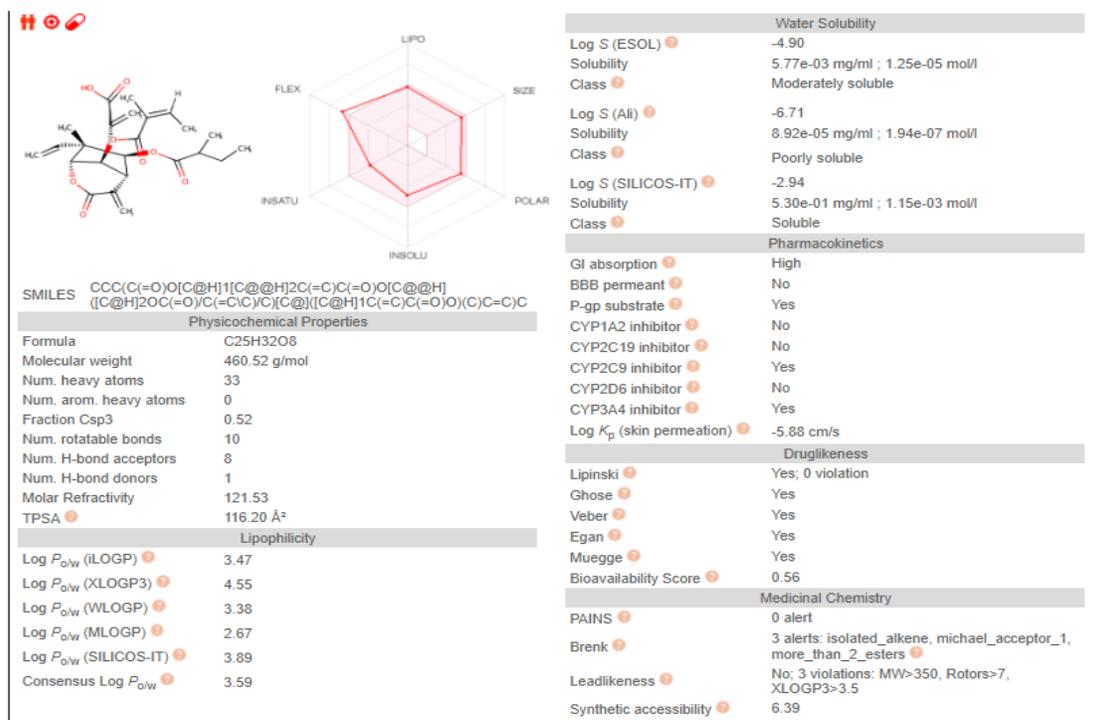
De acuerdo con las estimaciones fisicoquímicas y farmacocinéticas obtenidas con ayuda del programa Swiss ADME, las zinagrandinólidas D-F, mostraron resultados similares (**Figura 34–Figura 36**), entre los que destacan una absorción gastrointestinal alta, cumplimiento todos los filtros de similitud a fármacos ('druglikeness') con un puntaje de biodisponibilidad de 0.55, 0.56, 0.56, respectivamente para la zinagrandinólida D, E y F, lo que es consistente con una buen potencial de perfil farmacocinético para un fármaco oral. Este puntaje podría ser mayor, si se mejoran parámetros como la solubilidad en agua, que en el caso de las zinagrandinólidas E y F se ha comprobado son moderadamente solubles. En cuanto a la permeabilidad de barreras, las tres moléculas mostraron potencial para una alta absorción en el tracto gastrointestinal, sin que se traviese la barrera hematoencefálica. Sin embargo, estas  $\delta$ -elemánólidas presentan alertas de Brenk, relacionadas principalmente a dobles enlaces aislados, funciones oxigenadas, y aceptores de Michael, lo que podría representar un potencial riesgo toxicológico. Además, las zinagrandinólidas D-F no cumplen con el parámetro de moléculas líder ('leadlikeness'), debido principalmente, a su peso molecular, que al intentar hacer adiciones mediante síntesis orgánica sería demasiado alto para considerarlas potenciales fármacos. En este sentido, las moléculas con un peso molecular igual o superior a 250 e igual o inferior a 350 se consideran mejores como cabezas de serie (Teague *et al.*, 1999).



**Figura 34.** Parámetros fisicoquímicos y farmacocinéticos de la zinagrandinólida D (ZGD) estimados a partir del programa Swiss ADME.

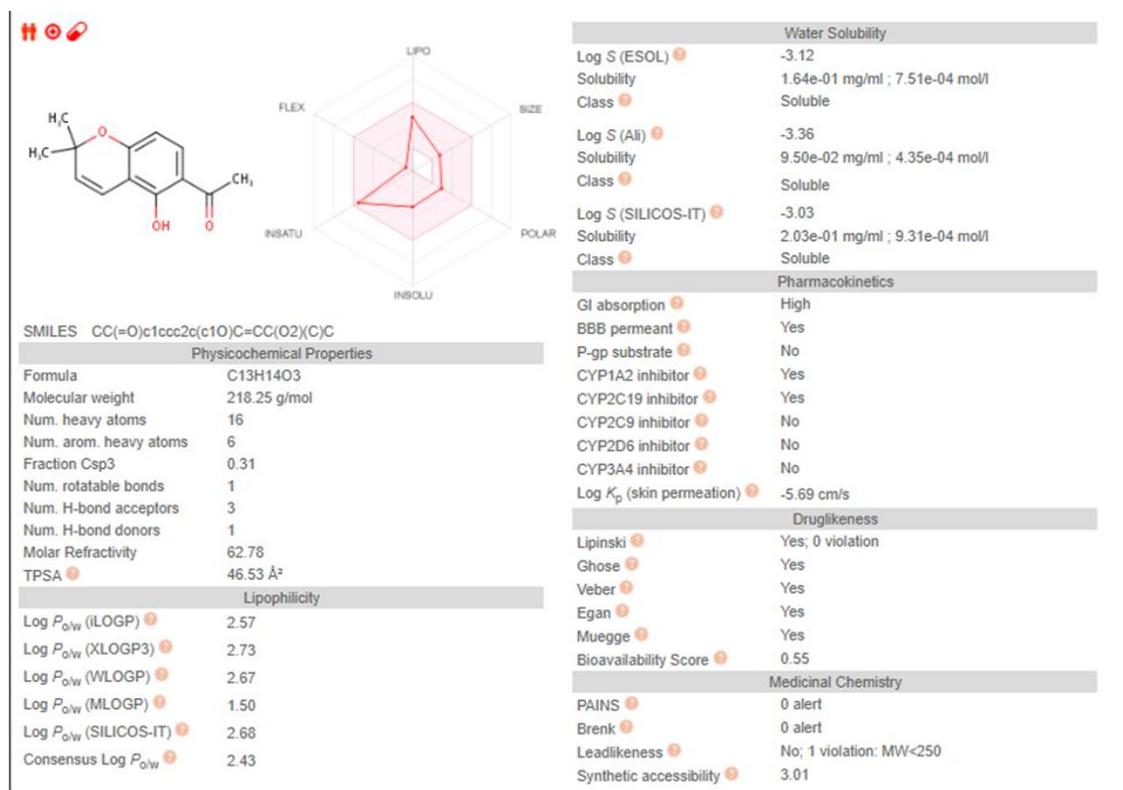


**Figura 35.** Parámetros fisicoquímicos y farmacocinéticos de la zinagrandinólida E (ZGE) estimados a partir del programa Swiss ADME.



**Figura 36.** Parámetros fisicoquímicos y farmacocinéticos de la zingrandinólida F (ZGF) estimados a partir del programa Swiss ADME.

La DME, por su parte, presenta un radar de biodisponibilidad con todas las líneas rojas dentro de la zona rosa (**Figura 37**); sin embargo, los parámetros de saturación y flexibilidad de la molécula pueden ser optimizados, ya que se encuentran casi en los límites de los valores ideales de acuerdo con el programa. La DME no presenta ninguna violación de los filtros de similitud a fármacos, y presenta un puntaje de biodisponibilidad de 0.55. Esta molécula, además, presenta una alta posibilidad de una alta absorción gastrointestinal, además de permear la barrera hematoencefálica; sin embargo, tiene altas oportunidades de inhibir dos de las cinco principales isoenzimas CYP: CYP1A2 y CYP2C19, lo que podría indicar interacciones farmacológicas adversas con fármacos que son sustratos de estas isoformas (Daina, Michielin y Zoete, 2017). La DME tampoco presenta fragmentos potencialmente problemáticos, ya que no presenta alertas de Brenk, ni se clasifica como un compuesto tipo 'PAIN'.



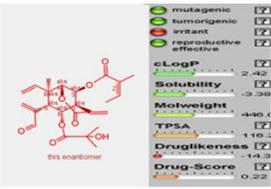
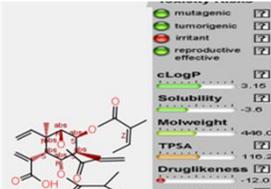
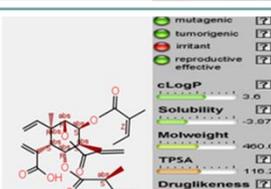
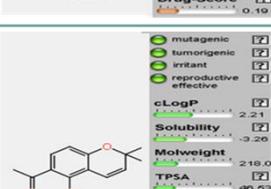
**Figura 37.** Parámetros fisicoquímicos y farmacocinéticos de la desmetilisoencecalina (DME) estimados a partir del programa Swiss ADME.

En cuanto a la actividad toxicológica estimada con Osiris Property Explorer, las zinagrandinólidas D-F presentaron alta posibilidad de ser irritantes; sin embargo, no mostraron potencial mutagénico, tumorgénico o con efectos tóxicos sobre la reproducción; mientras que la DME, no presentó riesgos de toxicidad (**Figura 38**).

Por último, se utilizó la herramienta Molinspiration para la predicción de la bioactividad. Esta plataforma proporciona una puntuación para los blancos farmacológicos más importantes (ligandos de GPCR, inhibidores de quinasas, moduladores de canales iónicos o receptores nucleares); cuanto mayor sea el valor de la puntuación, mayor será la probabilidad de que una molécula sea activa. Las estimaciones revelan que las zinagrandinólidas D-F podrían actuar principalmente como ligandos de receptores nucleares, con puntajes de 0.83, 0.68 y 0.69, respectivamente, y como inhibidores de enzimas,

con puntajes de 0.55, 0.40 y 0.45, respectivamente (**Figura 38**). Esta última actividad ya se ha comprobado para las zinagrandinólidas E y F sobre las  $\alpha$ -glucosidasas de levadura como se describió anteriormente. La predicción de este parámetro en conjunto con los resultados acoplamiento molecular es de suma importancia para la zinagrandinólida D, ya que se puede asumir que también presenta actividad inhibitoria de las  $\alpha$ -glucosidasas. Otras posibilidades de actividades biológicas para estos compuestos son: como moduladores de canales iónicos y como inhibidores de proteasas. La DME, tiene potencial como inhibidor enzimático también (0.28), y en menor medida como ligando de receptores nucleares (0.10).

Con la ayuda de este programa se pueden enfocar esfuerzos para estudiar el efecto de estas moléculas sobre blancos moleculares más específicos, en futuros trabajos de investigación como, por ejemplo, el potencial inhibitorio de enzimas que presentaron todos los compuestos analizados, no sólo sobre  $\alpha$ -glucosidasas, sino sobre enzimas que modulen la respuesta inflamatoria y nociceptiva como es COX. En este mismo sentido, el potencial de la DME como ligando de receptores nucleares, podría estar involucrado en su mecanismo de modulación de la respuesta antialodínica, ya que se ha demostrado la participación de la activación de los receptores nucleares en el control del dolor, destacando los efectos de los ligandos en el receptor activado por proliferador de peroxisomas (PPAR), cuyos agonistas de PPAR $\alpha$  reducen el dolor agudo y crónico en una variedad de ensayos de dolor; mientras que los ligandos de PPAR $\gamma$  atenúan la hipersensibilidad mecánica y térmica asociada con la lesión a nervios (Fehrenbacher *et al.*, 2009).

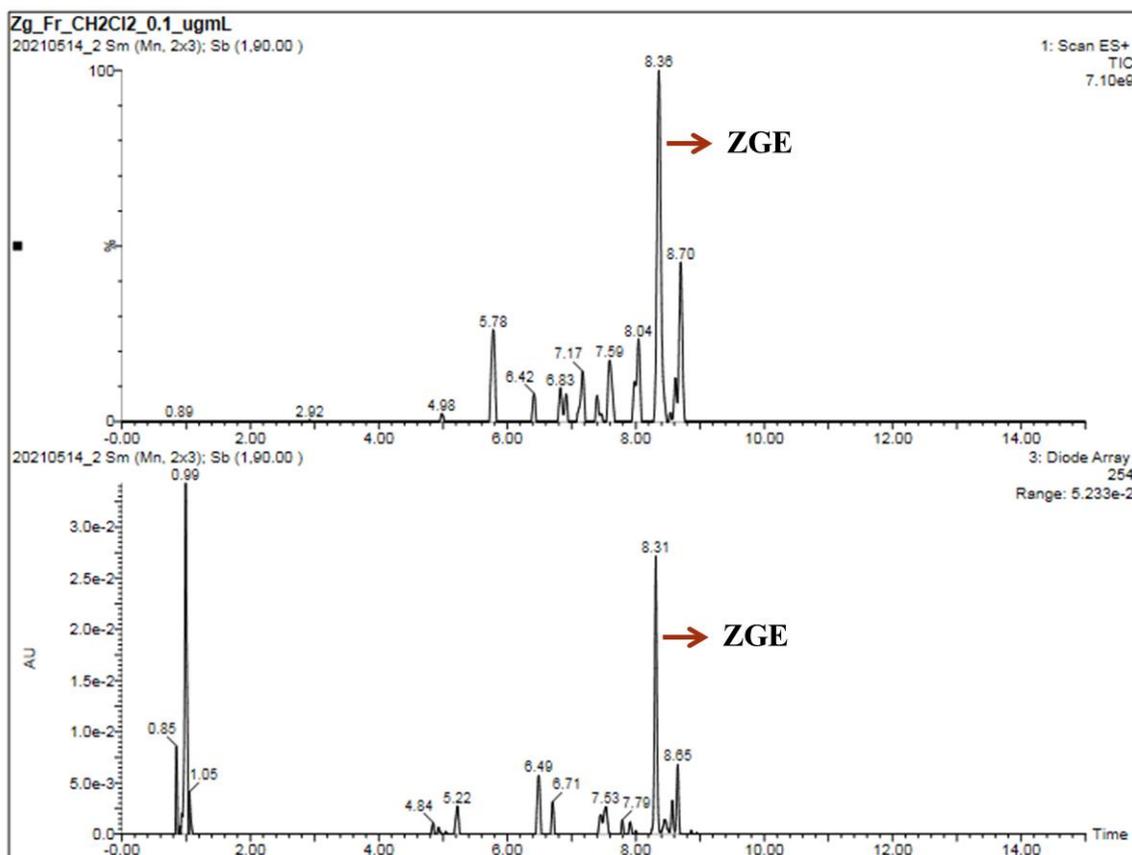
Molécula	Osiris Property Explorer	MolInspiration
Zinagrandinólida D (ZGD)	 <p> <input checked="" type="checkbox"/> mutagenic  <input checked="" type="checkbox"/> tumorigenic  <input checked="" type="checkbox"/> irritant  <input checked="" type="checkbox"/> reproductive effective  cLogP: 2.42  Solubility: -3.39  Molweight: 440.0  TPSA: 119.2  Druglikeness: -14.3  Drug-Score: 0.22 </p>	<p>Molinspiration bioactivity_score v2018.03</p> <p>GPCR ligand 0.08  Ion channel modulator 0.34  Kinase inhibitor -0.20  Nuclear receptor ligand 0.83  Protease inhibitor 0.22  Enzyme inhibitor 0.55</p>
Zinagrandinólida E (ZGE)	 <p> <input checked="" type="checkbox"/> mutagenic  <input checked="" type="checkbox"/> tumorigenic  <input checked="" type="checkbox"/> irritant  <input checked="" type="checkbox"/> reproductive effective  cLogP: 3.15  Solubility: -3.0  Molweight: 440.0  TPSA: 119.2  Druglikeness: -12.0  Drug-Score: 0.23 </p>	<p>Molinspiration bioactivity_score v2018.03</p> <p>GPCR ligand 0.07  Ion channel modulator 0.32  Kinase inhibitor -0.36  Nuclear receptor ligand 0.68  Protease inhibitor 0.15  Enzyme inhibitor 0.40</p>
Zinagrandinólida F (ZGF)	 <p> <input checked="" type="checkbox"/> mutagenic  <input checked="" type="checkbox"/> tumorigenic  <input checked="" type="checkbox"/> irritant  <input checked="" type="checkbox"/> reproductive effective  cLogP: 3.0  Solubility: -3.07  Molweight: 440.0  TPSA: 119.2  Druglikeness: -11.05  Drug-Score: 0.19 </p>	<p>Molinspiration bioactivity_score v2018.03</p> <p>GPCR ligand 0.12  Ion channel modulator 0.33  Kinase inhibitor -0.40  Nuclear receptor ligand 0.69  Protease inhibitor 0.21  Enzyme inhibitor 0.45</p>
Desmetilisoencecalina (DME)	 <p> <input checked="" type="checkbox"/> mutagenic  <input checked="" type="checkbox"/> tumorigenic  <input checked="" type="checkbox"/> irritant  <input checked="" type="checkbox"/> reproductive effective  cLogP: 2.21  Solubility: -3.26  Molweight: 219.0  TPSA: 40.53  Druglikeness: -2.17  Drug-Score: 0.40 </p>	<p>Molinspiration bioactivity_score v2018.03</p> <p>GPCR ligand -0.27  Ion channel modulator -0.21  Kinase inhibitor -0.65  Nuclear receptor ligand 0.10  Protease inhibitor -0.35  Enzyme inhibitor 0.28</p>

**Figura 38.** Parámetros de toxicidad y actividad biológica de las zinagrandinólidas D-F y la DME, estimados a partir de los programas Osiris Property Explorer y MolInspiration.

## 6.7. Pruebas de identidad y composición

Las pruebas de composición de la droga cruda de *Z. grandiflora* se desarrollaron a partir de la fracción de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  obtenida por reparto de la infusión de dicha planta. La elección de esta fracción orgánica se hizo con base en su menor complejidad comparado con el perfil del preparado tradicional, lo que facilitó los subsecuentes análisis. Se seleccionó a la ZGE como compuesto marcador, al ser este uno de los compuestos mayoritarios y activos de la infusión de la planta. Los parámetros más adecuados para la separación de la

ZGE se lograron utilizando una columna BEH Phenyl-Acquity UPLC y una fase móvil binaria compuesta por acetonitrilo y agua con ácido fórmico al 0.1 % utilizando un equipo CLUE-ESI/EM, de acuerdo con las condiciones descritas en la sección de desarrollo experimental. El perfil cromatográfico obtenido bajo estas se presenta en la **Figura 39**.



**Figura 39.** Cromatogramas de la fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de la infusión de *Zinnia grandiflora*. A) Cromatograma de iones totales ESI-Positivo, B) Cromatograma PDA (254 nm).

### 6.7.1. Validación de un método analítico para la cuantificación de la ZGE

Una vez establecido el método se procedió a su validación. El proceso de validación consiste en generar la información que demuestre, desde el punto de

vista analítico, que un método experimental es adecuado para un propósito específico, a partir de que dicho método cumpla con las características de desempeño aprobadas por las Guías de Validación de la ICH [ICH; Q2 (R1) 2005]. En este trabajo se realizó la validación de un método analítico mediante CLAE para la cuantificación de la ZGE en la fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de la infusión de *Zinnia grandiflora*. Para fines de la validación de este método, se utilizó el detector de PDA, y se seleccionó la longitud de onda de 254 nm; así como el análisis de espectrometría de masas con método de ionización ESI en modo positivo.

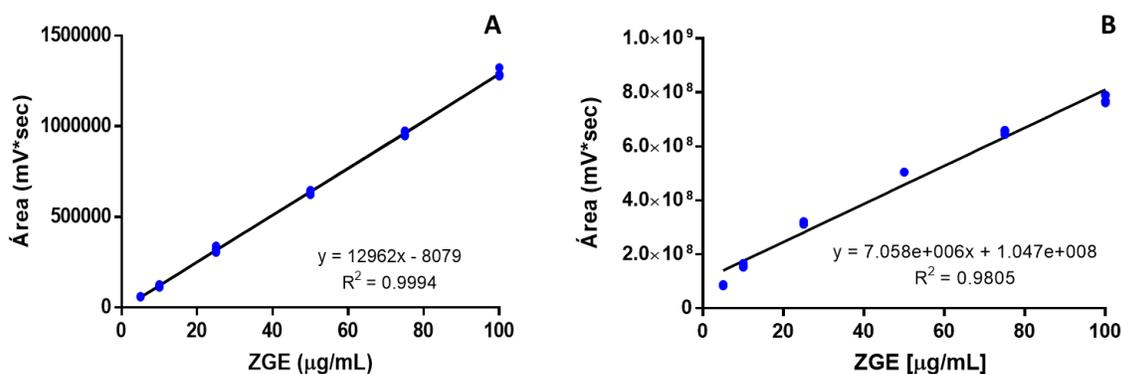
### Linealidad del sistema

La linealidad del sistema corresponde a la capacidad de un método para obtener respuestas analíticas directamente proporcionales a la concentración de un analito en un intervalo de concentraciones aplicaciones para la aplicación del método (ICH; Q2 (R1) 2005). Este parámetro se evaluó en el rango de concentración entre 5 y 100 µg/mL y se encontró que era lineal en el rango de concentración utilizado (**Tabla 11**). Las curvas de calibración mostraron una buena relación lineal entre las áreas de los picos y el rango de concentración probado. Se encontró que la ecuación de regresión lineal era  $y = 12962x - 8079$  ( $R^2 = 0.9994$ ) para el detector de PDA (254 nm) (**Figura 40–A**), y de  $y = 7.058e+006x + 1.047e+008$  ( $R^2 = 0.9805$ ) para el detector de masas (**Figura 40–B**).

**Tabla 11.** Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del sistema de la ZGE.

	<b>PDA</b>	<b>ESI-Positivo</b>
<b>β<sub>1</sub></b>	12962 ± 61.97	7.058e+006 ± 202924
<b>β<sub>0</sub></b>	-8079 ± 3476	1.047e+008 ± 1.189e+007

<b>R</b>	0.9997		0.9902	
<b>R<sup>2</sup></b>	0.9994		0.9805	
<b>IC (<math>\beta_1</math>) al 95%</b>	<b>IC inferior</b>	<b>IC superior</b>	<b>IC inferior</b>	<b>IC superior</b>
	12835	13089	6.639e+006	7.477e+006
<b>IC (<math>\beta_0</math>) al 95%</b>	<b>IC inferior</b>	<b>IC superior</b>	<b>IC inferior</b>	<b>IC superior</b>
	-15197	-960.6	8.015e+007	1.292e+008



**Figura 40.** Curva de calibración para la evaluación de la linealidad del sistema analítico. A) PDA, B) ESI-Positivo.

De acuerdo con estos resultados se cumplen con los criterios de aceptación de la ICH con ambos detectores, por lo que se puede concluir que la linealidad del sistema se cumple para el rango de concentraciones analizadas y tomando en cuenta la respuesta analítica de los dos detectores.

### Límite de detección y límite de cuantificación

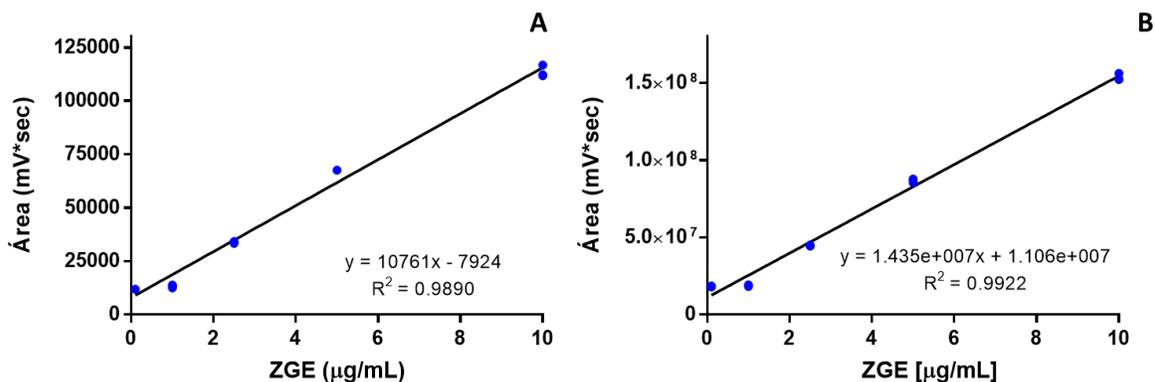
El límite de detección (LD) de un método analítico se refiere a la concentración mínima de analito presente en una muestra que puede ser detectada, y no necesariamente cuantificada. Mientras que el límite de cuantificación (LC) expresa la cantidad mínima de analito presente en una

muestra que puede determinarse con precisión y exactitud. Para establecer ambos límites se realizaron curvas de calibración de cada estándar con un intervalo de concentraciones de 0.1 a 10  $\mu\text{g/mL}$  por triplicado, y se realizó el análisis de regresión lineal de los mismos (**Tabla 12**, **Figura 41**). El valor del LD para la ZGE fue de 1.33  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que el valor LC fue de 4.01  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabla 12.** Resultados para LD y LC de la zinagrandinólida E.

Solución	Concentración de ZGE ( $\mu\text{g/mL}$ )	PDA	ESI-Positivo
		ABC	ABC
1	0.1	11883.602	17997764
2	0.1	11809.129	17729660
3	0.1	12289.948	18491798
4	1.0	13830.9	18298348
5	1.0	13271.769	19252512
6	1.0	12564.291	18302178
7	2.5	34202.75	45123648
8	2.5	33262.945	45805680
9	2.5	33650.734	44288044
10	5.0	67547.703	87789264
11	5.0	67216.555	85477864
12	5.0	67194.148	87041432
13	10.0	112175.469	152377888
14	10.0	111715.766	152481200
15	10.0	116729.516	156160608
	$\beta_1$	$10761 \pm 314.1$	$1.435\text{e}+007 \pm 352529$
	$\beta_0$	$7924 \pm 1616$	$1.106\text{e}+007 \pm 1.813\text{e}+006$
	<b>R</b>	0.9944	0.9960
	<b>R<sup>2</sup></b>	0.9890	0.9922
	<b>S<sub>y/x</sub></b>	4321	$4.849\text{e}+006$

	<b>LD (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>1.33</b>	<b>1.11</b>
	<b>LC (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>4.01</b>	<b>3.38</b>



**Figura 41.** Curvas de calibración para la determinación del LD y LC de ZGE. **A)** PDA (254 nm), **B)** ESI-Positivo.

### Linealidad del método

Para evaluar la linealidad del método se realizaron curvas de calibración recuperando de la matriz de trabajo una cantidad adicionada del estándar. Para ello, se adicionaron a la matriz concentraciones de 10, 50 y 75  $\mu\text{g/mL}$  del producto. La respuesta de la cantidad recuperada del estándar se realizó considerando el valor de la respuesta de la matriz de trabajo sin adición de ningún estándar. Los resultados de la respuesta analítica y los análisis de regresión lineal se presentan en la **Tabla 13** y **Tabla 14**, mientras que las curvas de calibración se presentan en la **Figura 42**. En este caso también se cumplen todos los criterios de aceptación establecidos por la ICH ( $R^2 > 0.98$ ;  $R \geq 0.99$ ;  $\beta_0 \neq 0$  y  $\beta_1 = 1$ ) por lo que se concluye que el método es lineal en el rango de concentraciones usadas para ambos detectores empleados.

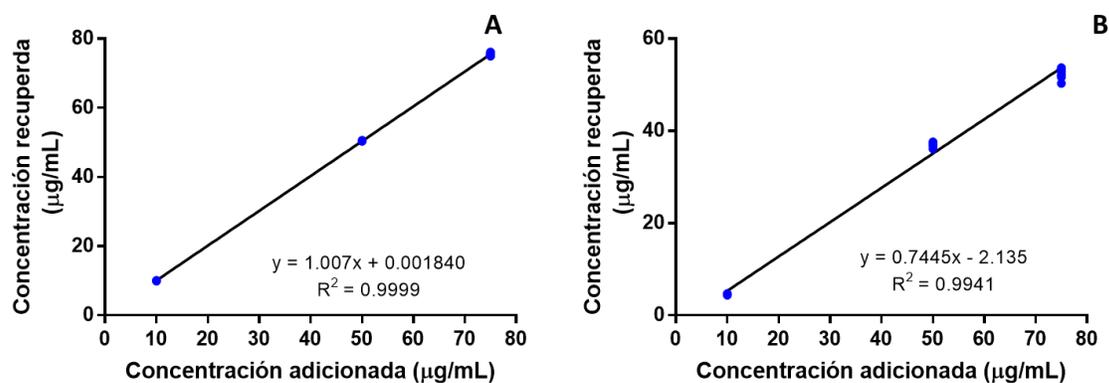
**Tabla 13.** Resultados experimentales de la evaluación de la linealidad del método para la ZGE.

Concentración de ZGE (µg/mL)	Concentración adicionada (µg/mL)	PDA		ESI-Positivo	
		ABC	Concentración recuperada (µg/mL)	ABC	Concentración recuperada (µg/mL)
10	10	120534.4	9.9	138160220.4	4.7
10	10	122894.0	10.1	135674556.4	4.4
10	10	124872.1	10.3	136842140.4	4.6
10	10	119817.9	9.9	138160220.4	4.7
10	10	118597.2	9.8	136431772.4	4.5
10	10	122894.0	10.1	136842140.4	4.6
10	10	119817.9	9.9	136431772.4	4.5
10	10	124872.1	10.3	136842140.4	4.6
10	10	120534.4	9.9	136731132.4	4.5
50	50	648136.6	50.6	370237852.4	37.6
50	50	645103.3	50.4	368270940.4	37.3
50	50	644770.8	50.4	367469020.4	37.2
50	50	645301.6	50.4	370975132.4	37.7
50	50	649188.4	50.7	366199324.4	37.1
50	50	645493.4	50.4	368424220.4	37.4
50	50	644490.6	50.3	359824540.4	36.1
50	50	649278.2	50.7	359901596.4	36.2
50	50	649025.3	50.7	363427804.4	36.7
75	75	979027.4	76.1	483867228.4	53.7
75	75	964010.0	74.9	477239068.4	52.8
75	75	964205.4	75.0	479864476.4	53.2
75	75	977765.3	76.1	482011740.4	53.5
75	75	965744.8	75.1	473076956.4	52.2
75	75	974295.9	75.8	480999964.4	53.3

75	75	969454.0	75.4	469309020.4	51.7
75	75	965803.0	75.1	459910620.4	50.3
75	75	969090.0	75.4	471415836.4	51.9

**Tabla 14.** Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del método.

	PDA		ESI-Positivo	
$\beta_1$	1.007 $\pm$ 0.002219		0.7445 $\pm$ 0.01151	
$\beta_0$	0.001840 $\pm$ 0.1162		-2.135 $\pm$ 0.6029	
R	0.9963		0.9970	
R <sup>2</sup>	0.9927		0.9941	
IC ( $\beta_1$ ) al 95%	IC inferior	IC superior	IC inferior	IC superior
	1.003	1.012	0.7208	0.7682
IC ( $\beta_0$ ) al 95%	IC inferior	IC superior	IC inferior	IC superior
	-0.2375	0.2411	-3.377	-0.8934



**Figura 42.** Linealidad del método para la cuantificación de ZGE. A) PDA (254 nm), B) ESI-Positivo

### Exactitud del método

La exactitud del método se refiere a la concordancia entre el valor de la concentración de estándar recuperada y el valor de referencia, que se refiere a

la concentración adicionada. Los experimentos de recobro se realizaron añadiendo tres muestras a diferentes niveles de concentración (10, 50 y 75  $\mu\text{g/mL}$ ) del estándar a la fracción soluble en diclorometano, por triplicado. Los porcentajes de recobro se indican en la **Tabla 15**. De acuerdo con estos resultados, el porcentaje de recobro para los datos generados con el detector de PDA se encuentra dentro del rango 98 – 102% y valores de CV por debajo de 2% por lo que se considera que el método es exacto para las determinaciones realizadas con este detector; sin embargo, los porcentajes de recobro para las determinaciones realizadas por ESI-Positivo no entran dentro de los límites establecidos por la ICH.

**Tabla 15.** Resultados de los experimentos de recobro para evaluar la exactitud del método.

Concentración adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	PDA				ESI-Positivo			
	Recobro (%)	$\bar{x}$	DE	CV	Recobro (%)	$\bar{x}$	DE	CV
10	99.2	100.1	1.78	1.8	47.4	45.6	1.14	2.5
10	101.0				43.9			
10	102.6				45.5			
10	98.7				47.4			
10	97.7				44.9			
10	101.0				45.5			
10	98.7				44.9			
10	102.6				45.5			
10	99.2				45.4			
50	101.3				101.0			
50	100.8	74.7						
50	100.7	74.5						
50	100.8	75.5						
50	101.4	74.1						
50	100.8	74.7						
50	100.7	72.3						
50	101.4	72.3						
50	101.4	73.3						
75	101.5	100.6	0.59	0.59		71.6	70.0	1.45

75	99.9				70.4			
75	100.0				70.9			
75	101.4				71.3			
75	100.2				69.6			
75	101.1				71.1			
75	100.6				68.9			
75	100.2				67.1			
75	100.5				69.3			

### Precisión

En el presente trabajo se evaluó la precisión del sistema en términos de repetibilidad con el análisis de doce réplicas de una concentración definida del estándar (50 µg/mL). Para este análisis se determinó la respuesta analítica bajo las mismas condiciones experimentales, mismo analista y durante un intervalo corto de tiempo. Los datos experimentales y análisis estadístico de los mismos se presentan en la **Tabla 16**. Estos resultados demuestran que el método es preciso ya que el CV calculado para las determinaciones es menor al 2.0%.

**Tabla 16.** Repetibilidad del método para la cuantificación de la ZGE.

Replica	Concentración adicionada (µg/mL)	PDA	ESI-Positivo
		ABC	ABC
1	50	961425.4	634187904
2	50	951030.7	629248256
3	50	955854.6	638180352
4	50	963436.5	624058176
5	50	964749.3	623460032
6	50	957897.6	623857408
7	50	956782.0	623415104
8	50	963107.8	613860928
9	50	967425.3	632939584
10	50	969651.1	629656064
11	50	964193.4	630222720

12	50	951634.6	620055168
	$\bar{X}$	960599.0	630248288
	DE	5954.4	4770474.9
	CV (%)	0.619	0.756

### Precisión intermedia

Para el análisis de este parámetro se determinó la respuesta analítica bajo las mismas condiciones experimentales, mismo analista, en días diferentes, utilizando datos de doce réplicas de una concentración definida del estándar (50 µg/mL). Los resultados del análisis estadístico que se presentan en la **Tabla 17** indican que el CV es menor al 2.0% por lo que se cumple con los límites establecidos por la ICH para este parámetro.

**Tabla 17.** Precisión intermedia del método para la cuantificación de ZGE.

Día	Replica	Concentración adicionada (µg/mL)	UV	ESI-Positivo
			ABC	ABC
1	1	50	961425.4	634187904
	2	50	951030.7	629248256
	3	50	955854.6	638180352
	4	50	963436.5	624058176
	5	50	964749.3	623460032
	6	50	957897.6	623857408
	7	50	956782.0	623415104
	8	50	963107.8	613860928
	9	50	967425.3	632939584
	10	50	969651.1	629656064
	11	50	964193.4	630222720
	12	50	951634.6	620055168
2	1	50	965660.8	624572928
	2	50	961949.6	633487232
	3	50	969434.8	629785856
	4	50	966148.5	632401920

5	50	961267.8	631022400
6	50	971694.4	633648704
7	50	964211.6	629747136
8	50	956431.4	623662848
9	50	961267.8	635634688
10	50	967710.0	636867456
11	50	968302.9	630508352
12	50	963095.8	621639936
	$\bar{x}$	962681.8	628588381.3
	<b>DE</b>	5488.2	5954962.9
	<b>CV (%)</b>	0.570	0.947

## 7. CONCLUSIONES

---

- Se estableció el potencial antiinflamatorio y antialodínico de la ZGE, compuesto activo de la infusión de *Zinnia grandiflora*, en el modelo de edema inducido por carragenina en ratones. Así como su potencial antialodínico en un modelo un modelo de neuropatía diabética en ratones.
- Se determinó que el mecanismo de acción antiinflamatorio y antialodínico de la ZGE es multidiana involucrando al sistema serotoninérgico, opioidérgico, GABAérgico, y a la cascada de ON-GMPcíclico–canales de  $K^+_{ATP}$ .
- Se identificaron los compuestos volátiles de la infusión y el aceite esencial de *Zinnia grandiflora*, siendo los compuestos mayoritarios germacreno D, desmetilisoencecalina, óxido de cariofileno, D-limoneno,  $\alpha$ -cadineno, y eucaliptol.
- Se estableció la eficacia preclínica antiinflamatoria y antialodínica del aceite esencial de *Zinnia grandiflora* en el modelo del edema de pata carragenina y en el modelo de la ligadura de nervios espinales en ratones.
- Se encontró que uno de los principios activos del aceite esencial y de la infusión de *Z. grandiflora* es la desmetilisoencecalina, y se estableció su potencial antiinflamatorio y antialodínico en el modelo del edema de pata carragenina y en el modelo de la ligadura de nervios espinales en ratones.
- Se realizaron estudios de acoplamiento molecular con lo que se predijo la afinidad de la ZGE por los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1B</sub>, los receptores

opioides  $\kappa$ ,  $\delta$ , y  $\mu$ , y el receptor GABA<sub>A</sub>. Todos relacionados en la modulación del dolor.

- Se estudió el efecto hipoglucemiante agudo y el efecto antihiper glucémico, mediante una curva de tolerancia a la sacarosa, del extracto acuoso de *Z. grandiflora*, con lo que se estableció su eficacia preclínica como agente para tratar la diabetes.
- Se encontró que metabolitos secundarios en el extracto acuoso de *Z. grandiflora* poseen actividad inhibitoria de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas de levadura, entre ellos las zinagrandinólidas E y F. Este efecto explica, la actividad antihiper glucémica del extracto acuoso, observada en la curva de tolerancia a la sacarosa en ratones.
- Se realizaron los estudios de acoplamiento molecular de las zinagrandinólidas D-F y desmetilisoencecalina con la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*, con lo que se estableció que la todos los metabolitos secundarios de *Z. grandiflora* ensayados podría unirse se unen a la enzima en sitios alostéricos.
- Los estudios *in vitro* e *in silico* permitieron indicar que la especie *Z. grandiflora* es una fuente una fuente potencial de metabolitos secundarios con actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas, y por lo tanto una fuente de agentes con potencial antidiabético.
- Se estudiaron *in silico* las propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas, toxicológicas y farmacológicas de los metabolitos de *Z. grandiflora*, zinagrandinólidas D-F y desmetilisoencecalina, con lo que se pudo predecir que todas estas moléculas cumplen parámetros de similitud a fármacos para ser considerados potenciales fármacos orales potenciales.

- Se establecieron pruebas para el control de calidad del preparado tradicional de *Z. grandiflora*, a partir de la validación de un método analítico para la cuantificación de zinagrandinólida E.

## 8. REFERENCIAS

---

- Agarwal, S. K. *et al.* (1999) 'Antifertility chromene from *Blepharispermum subsessile*', *Fitoterapia*. Elsevier, 70(4), 435–437. doi: 10.1016/S0367-326X(99)00064-7.
- Agarwal, S. K. *et al.* (2000) 'Antifeedant and antifungal activity of chromene compounds isolated from *Blepharispermum subsessile*', *Journal of Ethnopharmacology*. Elsevier, 71(1–2), 231–234. doi: 10.1016/S0378-8741(00)00158-6.
- Ahmadi, S. *et al.* (2002) 'PGE2 selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons', *Nature Neuroscience*, 5(1), 34–40. doi: 10.1038/nn778.
- Alles, S. R. A. and Smith, P. A. (2017) 'The Anti-Allodynic Gabapentinoids: Myths, Paradoxes, and Acute Effects', *Neuroscientist*, 23(1), 40–55. doi: 10.1177/1073858416628793.
- Álvarez-Ospina, H. *et al.* (2013) 'HPLC determination of the major active flavonoids and GC-MS analysis of volatile components of *Dysphania graveolens* (Amaranthaceae)', *Phytochemical Analysis*, 24(3), 248–254. doi: 10.1002/pca.2405.
- Ang, S. T., Ariffin, M. Z. and Khanna, S. (2017) 'The forebrain medial septal region and nociception', *Neurobiology of Learning and Memory*, 138, 238–251. doi: 10.1016/j.nlm.2016.07.017.
- Armstead, W. M. (1996) 'Role of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in cGMP-mediated pial artery vasodilation', *American Physiological Society Bethesda, MD*, 270(2 39-2). doi: 10.1152/AJPHEART.1996.270.2.H423.
- Baell, J. B. and Holloway, G. A. (2010) 'New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays', *Journal of medicinal chemistry*, 53(7), 2719–2740. doi: 10.1021/JM901137J.

- Bailey, L. H., Bailey, E. Z. and the Staff of the Liberty Hyde Bailey Hortorium (1976) 'Zinnia', in *Hortus Third - A concise Dictionary of Plants Cultivated in the United States and Canada*. New York: Macmillan, p. 1184.
- Bakkali, F. *et al.* (2008) 'Biological effects of essential oils - A review', *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475. doi: 10.1016/j.fct.2007.09.106.
- Barrot, M. (2012) 'Tests and models of nociception and pain in rodents', *Neuroscience*, 211, 39–50. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.12.041.
- Basbaum, A. I. *et al.* (2009) 'Cellular and Molecular Mechanisms of Pain', *Cell*. Elsevier B.V., 139(2), 267–284. doi: 10.1016/J.CELL.2009.09.028.
- Bashyal, B. P., McLaughlin, S. P. and Gunatilaka, A. A. L. (2006) 'Zinagrandinolides A-C, cytotoxic  $\delta$ -elemanolide-type sesquiterpene lactones from *Zinnia grandiflora*', *Journal of Natural Products*, 69(12), 1820–1822. doi: 10.1021/np0603626.
- Besson, J. M. and Chaouch, A. (1987) 'Peripheral and spinal mechanisms of nociception', *Physiological Reviews*, 67(1), 67–186. doi: 10.1152/physrev.1987.67.1.67.
- Bhagavan, N. V. (2002) 'Enzymes I: General Properties, Kinetics, and Inhibition', in *Medical Biochemistry*, 85–108. doi: 10.1016/b978-012095440-7/50008-1.
- Bingham, S. *et al.* (2001) 'Inhibition of inflammation-induced thermal hypersensitivity by sumatriptan through activation of 5-HT<sub>1B/1D</sub> receptors', *Experimental Neurology*, 167(1), 65–73. doi: 10.1006/exnr.2000.7521.
- Board, E. (2010) 'Diagnosis and Classification of Neuropathic Pain Epidemiology and Impact of Neuropathic Pain', *Pain Medicine*, XVIII(7), 1–6.
- Bohlmann, F. *et al.* (1979) 'Neue Elemanolide und Guajanolide aus *Zinnia*-Arten', *Phytochemistry*, 18, 1343–1348.
- Bohlmann, F. *et al.* (1981) 'Eudesmanolides, Guaianolides, Germacronolides

- and Elemanolides from Zinnia Species', *Phytochemistry*, 20(7), 1623–1630. doi: 10.1016/0031-9422(81)80119-7.
- Brenk, R. *et al.* (2008) 'Lessons learnt from assembling screening libraries for drug discovery for neglected diseases', *ChemMedChem*, 3(3), 435–444. doi: 10.1002/CMDC.200700139.
- Bye, R. and Linares, E. (1986) 'Ethnobotanical notes from the Valley of San Luis, Colorado', *Journal of Ethnobiology*, 6, 289–306.
- Cachofeiro Ramos, V. *et al.* (2004) 'Inflamación, disfunción endotelial e hipertensión arterial', *Hipertensión y Riesgo Vascular*, 21(7), 347–354. doi: 10.1016/s1889-1837(04)71827-9.
- Camazine, S. and Bye, R. (1980) 'Ethnobotanical notes from the Valley of San Luis, Colorado', *Journal of Ethnobiology*, 2, 365–388.
- Carlton, S. M., Zhou, S. and Coggeshall, R. E. (1999) 'Peripheral GABA(A) receptors: evidence for peripheral primary afferent depolarization', *Neuroscience*. *Neuroscience*, 93(2), 713–722. doi: 10.1016/S0306-4522(99)00101-3.
- Carmichael, N. M. E., Charlton, M. P. y Dostrovsky, J. O. (2008) 'Activation of the 5-HT1B/D receptor reduces hindlimb neurogenic inflammation caused by sensory nerve stimulation and capsaicin', *Pain*, 134(1–2), 97–105. doi: 10.1016/j.pain.2007.03.037
- Cervantes-Durán, C. *et al.* (2012) 'Role of peripheral and spinal 5-HT2B receptors in formalin-induced nociception', *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 102(1), 30–35. doi: 10.1016/j.pbb.2012.03.015.
- Chaplan, S. R. *et al.* (1994) 'Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw', *Journal of Neuroscience Methods*, 53(1), 55–63. doi: 10.1016/0165-0270(94)90144-9.
- Che, T. *et al.* (2020) 'Nanobody-enabled monitoring of kappa opioid receptor states', *Nature Communications*, 11(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41467-020-14889-7.
- Chincholkar, M. (2018) 'Analgesic mechanisms of gabapentinoids and effects in

- experimental pain models: a narrative review', *British Journal of Anaesthesia*, 120(6), 1315–1334. doi: 10.1016/j.bja.2018.02.066.
- Claff, T. *et al.* (2019) 'Elucidating the active  $\delta$ -opioid receptor crystal structure with peptide and small-molecule agonists', *Science advances*, 5(11), eaax9115. doi: 10.1126/SCIADV.AAX9115.
- Cook, Frances E.M. (1995) *Economic Botany Data Collection Standard. Prepared for the International working Group on Taxonomic Databases for Plant Sciences (TDWG)*. Richmond, UK.: Royal Botanic Gardens.
- Copeland, R. A. (2000) *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*. 2da ed. Wiley. Available at: <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=jj4HEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR11&dq=copeland+2000+Enzimes+practical+introduction&ots=i0ZCIwU3Dq&sig=fcySfUmI26xcsgNgjgwBxNFhob0#v=onepage&q=copeland+2000+Enzimes+practical+introduction&f=false> (Accessed: 3 June 2022).
- Curtin, L. S. . (1997) *Healing Herbs of the Upper Rio Grande, Traditional Medicine of the Southwest*. Edited by M. Moore. Santa Fe, New Mexico: Western Edge Press.
- Daina, A., Michielin, O. and Zoete, V. (2017) 'SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules', *Scientific Reports*, 7, 42717. doi: 10.1038/srep42717.
- Daina, A. and Zoete, V. (2016) 'A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules', *ChemMedChem*, 11(11), 1117–1121. doi: 10.1002/CMDC.201600182.
- Day, D. F. (1884) 'Zinnia grandiflora - general notes', *Botanical Gazette*, 9, 29.
- De Carvalho Veloso, C. *et al.* (2015) 'Tingenone, a pentacyclic triterpene, induces peripheral antinociception due to NO/cGMP and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels pathway activation in mice', *European Journal of Pharmacology*, 755, 1–5. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.02.038.
- Deuis, J. R., Dvorakova, L. S. and Vetter, I. (2017) 'Methods used to evaluate

- pain behaviors in rodents', *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10(September), 1–17. doi: 10.3389/fnmol.2017.00284.
- Dixon, W. J. (1980) 'Efficient analysis of experimental observations.', *Annual review of pharmacology and toxicology*, 20, 441–62. doi: 10.1146/annurev.pa.20.040180.002301.
- Do Amaral, J. F. *et al.* (2007) 'Antinociceptive effect of the monoterpene R-(+)-limonene in mice', *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 30(7), pp. 1217–1220. doi: 10.1248/BPB.30.1217.
- Duarte, I. D. G., Lorenzetti, B. B. and Ferreira, S. H. (1990) 'Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway', *European Journal of Pharmacology*, 186(2–3), 289–293. doi: 10.1016/0014-2999(90)90446-D.
- Dubin, A. E. and Patapoutian, A. (2010) 'Nociceptors: The sensors of the pain pathway', *Journal of Clinical Investigation*, 120(11), 3760–3772. doi: 10.1172/JCI42843.
- Dubuisson, D. and Dennis, S. G. (1977) 'The formalin test: A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats', *Pain*, 4(C), 161–174. doi: 10.1016/0304-3959(77)90130-0.
- Dumitrascuta, M. *et al.* (2020) 'N-Phenethyl Substitution in 14-Methoxy-N-methylmorphinan-6-ones Turns Selective  $\mu$  Opioid Receptor Ligands into Dual  $\mu/\delta$  Opioid Receptor Agonists', *Scientific Reports*, 10(1). doi: 10.1038/S41598-020-62530-W.
- Eblen-Zajjur, A. (2005) 'Neurofisiología de la nocicepción', *Gaceta Médica de Caracas*, 113(4), 466–473.
- Edwards, G. and Weston, A. H. (2003) 'The Pharmacology of ATP-Sensitive Potassium Channels', *Annual Reviews*, El Camino Way, P.O. Box, CA, USA, 33, pp. 597–637.
- Eleazu, C. O. *et al.* (2013) 'Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use

- and potential risk to humans', *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 12(1), 1–7. doi: 10.1186/2251-6581-12-60.
- Escandón-Rivera, S. *et al.* (2017) 'Anti-hyperglycemic activity of major compounds from *Calea ternifolia*', *Molecules*, 22(2), 1–13. doi: 10.3390/molecules22020289.
- Fehrenbacher, J. C. *et al.* (2009) 'Rapid pain modulation with nuclear receptor ligands', *Brain Research Reviews*, 60(1), 114–124. doi: 10.1016/j.brainresrev.2008.12.019.
- Feyaerts, A. F., Luyten, W. and Van Dijck, P. (2020) 'Striking essential oil: tapping into a largely unexplored source for drug discovery', *Scientific Reports*, 10(1), 1–11. doi: 10.1038/s41598-020-59332-5.
- FHEUM (2013) *Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos*. 2da ed. Ciudad de México: Secretaría de Salud.
- Field, M. J. *et al.* (1997) 'Gabapentin (neurontin) and S-(+)-3-isobutylgaba represent a novel class of selective antihyperalgesic agents', *British Journal of Pharmacology*, 121(8), 1513–1522. doi: 10.1038/sj.bjp.0701320.
- Finnerup, N. B., Sindrup, S. H. and Jensen, T. S. (2010) 'Recent advances in pharmacological treatment of neuropathic pain', *F1000 Medicine Reports*, 2(1), 2–4. doi: 10.3410/M2-52.
- Fischer, M. *et al.* (2014) 'The interphase of the formalin test', *Pain*. International Association for the Study of Pain, 155(3), 511–521. doi: 10.1016/j.pain.2013.11.015.
- Flores-Bocanegra, L. *et al.* (2017) 'α-Glucosidase Inhibitors from *Salvia circinata*', *Journal of Natural Products*, 80(5), 1584–1593. doi: 10.1021/acs.jnatprod.7b00155.
- Ford, K. C. (1975) *Las Yervas de la Gente: A Study of Hispano-American Medicinal Plants*. Museum of Anthropology, University of Michigan.
- Frank, T., Nawroth, P. and Kuner, R. (2019) 'Structure-function relationships in peripheral nerve contributions to diabetic peripheral neuropathy', *Pain*, 160(5), S29–S36. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001530.

- García Barreno, P. (2008) 'Inflamación', *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas Físicas y Naturales*, 102(1), 91–159. doi: 10.2307/j.ctv1xxv3n.7.
- Ghosh, S. and Rangan, L. (2015) 'Molecular Docking and Inhibition Kinetics of  $\alpha$ -glucosidase Activity by Labdane Diterpenes Isolated from Tora Seeds (*Alpinia nigra* B.L. Burtt.)', *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(3), 1477–1489. doi: 10.1007/s12010-014-1366-4.
- Gilron, I. and Flatters, S. J. L. (2006) 'Gabapentin and pregabalin for the treatment of neuropathic pain: A review of laboratory and clinical evidence', *Pain Research and Management*, 11(SUPPL. A). doi: 10.1155/2006/651712.
- Granados-Soto, V. *et al.* (1997) 'Evidence for the involvement of the nitric oxide–cGMP pathway in the antinociception of morphine in the formalin test', *European Journal of Pharmacology*, 340(2–3), 177–180. doi: 10.1016/S0014-2999(97)01399-X.
- Granados-Soto, V. *et al.* (2010) 'The role of peripheral 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT1E and 5-HT1F serotonergic receptors in the reduction of nociception in rats', *Neuroscience*, 165(2), 561–568. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.10.020.
- Harborne, J. B. *et al.* (1983) 'Anthochlor pigments from the petals of *Mussaenda hirsutissima* and *Zinnia linearis*', *Phytochemistry*, 22(12), 2741–2742. doi: 10.1016/S0031-9422(00)97685-4.
- Herz, W. and Govindan, S. V (1981) 'Elemanolides From *Zinnia peruviana*', *Phytochemistry*, 20(9), 2229–2231.
- Herz, W. and Govindan, S. V (1982) 'An Elemanolide from *Zinnia grandiflora*', *Phytochemistry*, 21(3), 787–788.
- Hoeger Bement, M. K. *et al.* (2003) 'Review: Central sensitization and musculoskeletal pain', *Seminars in Pain Medicine*, 1(3), 139–149. doi: 10.1016/S1537-5897(03)00045-4.
- Horst, B. G. *et al.* (2019) 'Allosteric activation of the nitric oxide receptor

- soluble guanylate cyclase mapped by Cryo-electron microscopy', *eLife*, 8. doi: 10.7554/ELIFE.50634.
- Hoyer, D. *et al.* (1994) 'VII. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin)', *Pharmacological Reviews*, 46(2), 157–203.
- Huang, Q. *et al.* (1998) 'Predictive models for GABA(A)/benzodiazepine receptor subtypes: Studies of quantitative structure-activity relationships for imidazobenzodiazepines at five recombinant GABA(A)/benzodiazepine receptor subtypes [ $\alpha\chi\beta\gamma_2$  ( $\chi = 1-3, 5, \text{ and } 6$ )] via comparative molecular field analysis', *Journal of Medicinal Chemistry*, 41(21), 4130–4142.
- Huang, W. *et al.* (2015) 'Structural insights into  $\mu$ -opioid receptor activation', *Nature*, 524(7565), 315–321. doi: 10.1038/nature14886.
- Hüsünü, K. and Buchbauer, G. (2015) *Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. Second. New York: CRC Press.
- Hutapea, A. M. *et al.* (2022) 'Efficacy of herbal medicine for patients with diabetic neuropathies: An updated literature review', *Biomedicine*, 42(2), 209–213.
- Huxley, A., Griffiths, M. and Levy, M. (1999) 'Zinnia', in *The New Royal Horticultural Society Dictionary of Gardening, Vol. 4*. London: Macmillan, pp. 739–740.
- IASP (2022) IASP Terminology. Available at: <https://www.iasp-pain.org/resources/terminology/> (Accessed: 2 April 2022).
- International Conference on Harmonisation (2005) 'Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2 (R1)', in *ICH Harmonised Tripartite Guideline*, pp. 1–13. doi: 10.1002/9781118532331.ch23.
- Jensen, T. S. *et al.* (2011) 'A new definition of neuropathic pain', *Pain*. International Association for the Study of Pain, 152(10), 2204–2205. doi: 10.1016/j.pain.2011.06.017.
- Kane, C. W. (2011) *Medicinal Plants of the American Southwest*. Lincoln Town Press.

- Kay, M. A. (1996) *Healing with Plants in the American and Mexican West*. Tucson, AZ: University of Arizona Press.
- Kim, M. J. *et al.* (1999) ‘Comparative study of the inhibition of  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase, and cyclomaltodextrin glucanosyltransferase by acarbose, isoacarbose, and acarviosine-glucose’, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 371(2), 277–283. doi: 10.1006/abbi.1999.1423.
- Kiso, T. *et al.* (2008) ‘Pharmacological characterization and gene expression profiling of an L5/L6 spinal nerve ligation model for neuropathic pain in mice’, *Neuroscience*, 153(2), 492–500. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.02.031.
- Kondo, T. and Gullan, P. J. (2011) ‘Taxonomic Review of the Genus *Tachardiella* Cockerell (Hemiptera: Kerriidae), with a Key to Species of Lac Insects Recorded from the New World’, *Neotropical Entomology*, 40(1923), 345–367.
- Kusuda, R. *et al.* (2020) ‘Choline attenuates inflammatory hyperalgesia activating nitric oxide/cGMP/ATP-sensitive potassium channels pathway’, *Brain Research*, 1727(November 2019), 146567. doi: 10.1016/j.brainres.2019.146567.
- Lenardão, E. J. *et al.* (2016) ‘Antinociceptive effect of essential oils and their constituents: An update review’, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27(3), 435–474. doi: 10.5935/0103-5053.20150332.
- Leyva-Castañeda, D., Sigala-Rodríguez, J. and Ocampo, G. (2020) ‘Species richness estimation of the asteraceae family in four areas for conservation from central Mexico using non-parametric methods to measure biodiversity’, *Botanical Sciences*, 98(2), 317–327. doi: 10.17129/BOTSCI.2552.
- Martin, Y. C. (2005) ‘A bioavailability score’, *Journal of medicinal chemistry*, 48(9), 3164–3170. doi: 10.1021/JM0492002.
- McCall, W. D., Tanner, K. D. and Levine, J. D. (1996) ‘Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat’, *Neuroscience Letters*, 208(1), 45–

48. doi: 10.1016/0304-3940(96)12552-0.
- Millan, M. J. (1999) 'The induction of pain: An integrative review', *Progress in Neurobiology*, 57(1), 1–164. doi: 10.1016/S0301-0082(98)00048-3.
- Miller, G. O. (2013) *Landscaping with Native Plants of Texas*. 2nd ed. Minneapolis, MN: Voyageur Press.
- Minett, M. S., Eijkelkamp, N. and Wood, J. N. (2014) 'Significant determinants of mouse pain behaviour', *PLoS ONE*, 9(8). doi: 10.1371/journal.pone.0104458.
- Moalem, G. and Tracey, D. J. (2006) 'Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain', *Brain Research Reviews*, 51(2), 240–264. doi: 10.1016/j.brainresrev.2005.11.004.
- Mogil, J. S. *et al.* (1999) 'Heritability of nociception I: Responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception', *Pain*, 80(1–2), pp. 67–82. doi: 10.1016/S0304-3959(98)00197-3.
- Moore, M. (1979) *Medicinal Plants of the Mountain West*. Santa Fe, New Mexico: Museum of New Mexico Press.
- Moro, M. A. *et al.* (1996) 'cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: Confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(4), 1480–1485. doi: 10.1073/PNAS.93.4.1480.
- Morris, C. J. (2003a) 'Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse', *Methods in molecular biology*, 225, 115–121. doi: 10.1385/1-59259-374-7:115.
- Morris, C. J. (2003b) 'Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse.', *Methods in molecular biology*, 115–121. doi: 10.1385/1-59259-374-7:115.
- Motawe, H. M., Wahba, H. E. and Ibrahim, A. Y. (2015) 'Biological Studies of Flavonoids from Flowers and Herb of Zinnia Pauciflora Plant L.' *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3(6): 1076-1082.
- Muñoz-Islas, E. *et al.* (2014) 'Spinal 5-HT<sub>2A</sub> receptors mediate 5-HT-induced antinociception in several pain models in rats', *Pharmacology*,

- biochemistry, and behavior*, 120, 25–32.
- Oki, T., Matsui, T. and Osajima, Y. (1999) 'Inhibitory Effect of  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors Varies According', *Journal of Agriculture, Food and Chemistry*, 550–553.
- OMS (2013) *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional, Organización Mundial de la Salud*. Ginebra.
- Ortega, A. *et al.* (1983) 'New Elemanolides From Zinnia Species: Structural Revision of the Zinnolides', *Chemistry Letters*, 1607–1610.
- Ortega, A. *et al.* (1995) 'An elemandiolide From Zinnia citrea', *Phytochemistry*, 39(6), 1479–1481.
- Ortega, A. and Maldonado, E. (1982) 'A Sesquiterpene d-lactone From *Zinnia juniperifolia*', *Phytochemistry*, 21(3), 785–786.
- Ortega, A. and Maldonado, E. (1985) 'Elemanolides From Zinnia flavicoma', *Phytochemistry*, 24(11), 2635–2639.
- Ortiz, M. I., Granados-Soto, V. and Castañeda-Hernández, G. (2003) 'The NO-cGMP-K<sup>+</sup> channel pathway participates in the antinociceptive effect of diclofenac, but not of indomethacin', *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 76(1), 187–195. doi: 10.1016/S0091-3057(03)00214-4.
- Ossipov, M. H. (2012) 'The Perception and Endogenous Modulation of Pain', *Scientifica*, 1–25. doi: 10.6064/2012/561761.
- Panthong, A. *et al.* (1994) 'Antiinflammatory activity of flavonoids', *Phytomedicine*, 1(2), 141–144. doi: 10.1016/S0944-7113(11)80032-2.
- Paula-Freire, L. I. G. *et al.* (2014) 'The oral administration of trans-caryophyllene attenuates acute and chronic pain in mice', *Phytomedicine*, 21(3), 356–362. doi: 10.1016/J.PHYMED.2013.08.006.
- Piccinelli, A. C. *et al.* (2015) 'Antihyperalgesic and antidepressive actions of (R)-(+)-limonene,  $\alpha$ -phellandrene, and essential oil from *Schinus terebinthifolius* fruits in a neuropathic pain model', *Nutritional neuroscience*, 18(5), 217–224. doi: 10.1179/1476830514Y.0000000119.
- Pitcher, G. M. and Henry, J. L. (2002) 'Second phase of formalin-induced

- excitation of spinal dorsal horn neurons in spinalized rats is reversed by sciatic nerve block', *European Journal of Neuroscience*, 15(9), 1509–1515. doi: 10.1046/j.1460-9568.2002.01984.x.
- Posadas, I. *et al.* (2004) 'Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression', *British Journal of Pharmacology*, 142(2), 331–338. doi: 10.1038/sj.bjp.0705650.
- Radhakrishnan, R., Moore, S. A. and Sluka, K. A. (2003) 'Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats', *Pain*, 104(3), 567–577. doi: 10.1016/S0304-3959(03)00114-3.
- Reyes-Pérez, V. *et al.* (2019) 'Antinociceptive Potential of *Zinnia grandiflora*', *Journal of Natural Products*, 82(3), 456–461. doi: 10.1021/acs.jnatprod.8b00758.
- Reyes-Pérez, V. I. *et al.* (2021) 'Pharmacological Analysis of the Anti-inflammatory and Antiallodynic Effects of Zinagrandinolide e from *Zinnia grandiflora* in Mice', *Journal of Natural Products*, 84(3), 413–423.
- Richter, L. *et al.* (2012) 'Diazepam-bound GABAA receptor models identify new benzodiazepine binding-site ligands', *Nature chemical biology*, 8(5), 455. doi: 10.1038/NCHEMBIO.917.
- Rocha-González, H. I. *et al.* (2005) 'Pronociceptive role of peripheral and spinal 5-HT7 receptors in the formalin test', *Pain*, 117(1–2), 182–192. doi: 10.1016/j.pain.2005.06.011.
- Rocha, A. C. C. *et al.* (2006) 'Relevance of tumour necrosis factor- $\alpha$  for the inflammatory and nociceptive responses evoked by carrageenan in the mouse paw', *British Journal of Pharmacology*, 148(5), 688–695. doi: 10.1038/SJ.BJP.0706775.
- Rodrigues, A. R.A. and Duarte, I. D. G. (2000) 'The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels', *British Journal of Pharmacology*, 129(1), 110–114. doi:

- 10.1038/sj.bjp.0703038.
- Rodrigues, A R A and Duarte, I. D. G. (2000) 'The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels', *British Journal of Pharmacology*, 129(1), 110–114. doi: 10.1038/sj.bjp.0703038.
- Romera, E. *et al.* (2000) 'Neurofisiología del dolor', *Rev Soc Esp Dolor*, 7(Supl. II), 11–17.
- Romero, T. R. L. and Duarte, I. D. G. (2009) 'Involvement of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the peripheral antinociceptive effect induced by the  $\alpha$ -adrenoceptor agonist xylazine', *Journal of Pharmacological Sciences*, 111(4), 323–327. doi: 10.1254/jphs.09103FP.
- Rondón, L. J. *et al.* (2010) 'Magnesium attenuates chronic hypersensitivity and spinal cord NMDA receptor phosphorylation in a rat model of diabetic neuropathic pain', *Journal of Physiology*, 588(21), 4205–4215. doi: 10.1113/jphysiol.2010.197004.
- Rose, J. N. (1899) 'Notes on useful plants of Mexico', *Contributions from the United States National Herbarium*, 5(4), 209–259.
- Salvemini, D. *et al.* (1996) 'Nitric oxide: A key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation', *British Journal of Pharmacology*, 118(4), 829–838. doi: 10.1111/j.1476-5381.1996.tb15475.x.
- Sánchez-López, A. *et al.* (2009) 'Role of serotonin receptors in vascular tone in the pithed rat | Receptores de la serotonina que inhiben el tono simpático vasopresor en la rata descerebrada y desmedulada', *Archivos de Cardiología de Mexico*, 79(SUPPL. 2), 83–94.
- Sandkühler, J. (2009) 'Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia', *Physiological Reviews*, 89(2), 707–758. doi: 10.1152/physrev.00025.2008.
- Santos, F. A. and Rao, V. S. N. (2000) 'Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils', *Phytotherapy Research*, 14(4), 240–244.
- Schrödinger (2018) 'Schrödinger Release 2018-4: Maestro'. New York:

- Schrödinger, LLC.
- Schrödinger, L. (2015) *The PyMOL Molecular Graphics System, Versión 2.1.1*.
- Seeliger, D. and De Groot, B. L. (2010) 'Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina', *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 24(5), 417–422. doi: 10.1007/s10822-010-9352-6.
- Sharma, S. *et al.* (2006) 'Curcumin attenuates thermal hyperalgesia in a diabetic mouse model of neuropathic pain', *European Journal of Pharmacology*, 536(3), 256–261. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.03.006.
- Sluka, K. A. and Westlund, K. N. (1993) 'Spinal cord amino acid release and content in an arthritis model: the effects of pretreatment with non-NMDA, NMDA, and NK1 receptor antagonists', *Brain Research*, 627(1), 89–103. doi: 10.1016/0006-8993(93)90752-9.
- Smith, A. R. (2006) 'Zinnia', in Flora of North American Editorial Committee (ed.) *Flora of North America - Asteraceae, vol. 21*. New York: Oxford University Press, pp. 71–74.
- Souza-Silva, É. A. *et al.* (2015) 'A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices I. Environmental analysis', *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 71, 224–235. doi: 10.1016/j.trac.2015.04.016.
- Stafleu, F. A. and Cowan, R. S. (1988) *Taxonomic literature: a selective guide to botanical publications and collections with dates, commentaries and types*. 2a edn. Utrecht, Bohn, Scheltema & Holkema.
- Stein, C., Schäfer, M. and Machelska, H. (2003) 'Attacking pain at its source: New perspectives on opioids', *Nature Medicine*, 9(8), 1003–1008. doi: 10.1038/nm908.
- Stevenson, M. C. (1915) 'Ethnobotany of the Zuni Indians', in *30th Annual Report of the Bureau of American Ethnology, 1908-1909, U.S.* Washington, DC: Government Printing Office.
- Suzuki, K. *et al.* (2016) 'Postprandial reactive hypoglycemia treated with a low-dose alpha-glucosidase inhibitor: Voglibose may suppress oxidative

- stress and prevent endothelial dysfunction', *Internal Medicine*, 55(8), 949–953. doi: 10.2169/internalmedicine.55.5737.
- Swank, G. R. (1932) *The ethnobotany of the Acoma and Laguna Indians*.
- Szkudelski, T. (2012) 'Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model', *Experimental Biology and Medicine*, 237(5), 481–490. doi: 10.1258/ebm.2012.011372.
- Tassone, D. M. *et al.* (2007) 'Pregabalin: A novel  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Analogue in the Treatment of Neuropathic Pain, Partial-Onset Seizures and Anxiety Disorders', *Clinical Therapeutics*, 29. doi: 10.1016/j.clinthera.2007.1.013.
- Teague, S. J. *et al.* (1999) 'The design of leadlike combinatorial libraries', *Angewandte Chemie - International Edition*, 38(24), 3743–3748.
- Torres, A. M. (1963) 'Taxonomy of Zinnia', 103, pp. 1–2.
- Torrey, J. (1859) 'Botany of the Boundary', in Emory, W. H. (ed.) *Report on the United States and Mexican boundary survey: made under the direction of the Secretary of the Interior*. House Exec. Washington, DC: C. Wendell, pp. 27–270.
- Trott, O. and Olson, A. J. (2010) 'AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading', *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455. doi: 10.1002/JCC.21334.
- Vierck, C. J. (2007) *Capítulo 10 – Modelos animales del dolor*. Quinta Edi, *Wall y Melzack. Tratado del Dolor*. Quinta Edi. Elsevier España, S.L. doi: 10.1016/B978-84-8174-949-6.50010-1.
- Villaseñor, J. L. (2018) 'Diversidad y distribución de la familia Asteraceae en México', *Botanical Sciences*, 96(2), 332–358. doi: 10.17129/botsoci.1872.
- Wang, C. *et al.* (2013) 'Structural basis for molecular recognition at serotonin receptors', *Science (New York, N.Y.)*. Science, 340(6132), 610–614. doi: 10.1126/SCIENCE.1232807.
- Wasielewska, M., Banel, A. and Zygmunt, B. (2013) 'Solid Phase Micro-

- Extraction, a Versatile and Handy Tool in Environmental Trace Organic Analysis, Gets a New Class of Coatings, Polymeric Ionic Liquids', *International Journal of Environmental Science and Development*, 4(2), pp. 221–224. doi: 10.7763/ijesd.2013.v4.339.
- Wattiez, A.-S. and Barrière, D. A. (2012) 'Rodent Models of Painful Diabetic Neuropathy: What Can We Learn from Them?', *Journal of Diabetes & Metabolism*, 01(S5). doi: 10.4172/2155-6156.s5-008.
- Winter, C. A., Risley, E. A. and Nuss, G. W. (1962a) 'Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs', *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 111(3), 544–547. doi: 10.3181/00379727-111-27849.
- Winter, C. A., Risley, E. A. and Nuss, G. W. (1962b) 'Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs', *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 111(3), 544–547. doi: 10.3181/00379727-111-27849.
- Witkin, J. M. *et al.* (2019) 'The  $\alpha 2,3$ -selective potentiator of GABA A receptors, KRM-II-81, reduces nociceptive-associated behaviors induced by formalin and spinal nerve ligation in rats', *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 180, pp. 22–31. doi: 10.1016/J.PBB.2019.02.013.
- Woolf, C. J. (2004) 'Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific Pharmacologic Management', *Annals of Internal Medicine*, 140(6), 441–451. doi: 10.7326/0003-4819-140-8-200404200-00010.
- Woolf, C. J. and Salter, M. W. (2000) 'Neuronal Plasticity: Increasing the Gain in Pain', *Science*, 288, 1765–1769.
- Xu, T. *et al.* (2013) 'Oxysophocarpine induces anti-nociception and increases the expression of GABAA $\alpha 1$  receptors in mice', *Molecular Medicine Reports*, 7(6), 1819–1825. doi: 10.3892/MMR.2013.1414/HTML.
- Yamaguchi, M. A., Terahara, N. and Shizukuishi, K. I. (1990) 'Acetylated anthocyanins in *Zinnia elegans* flowers', *Phytochemistry*, 29(4), 1269–1270. doi: 10.1016/0031-9422(90)85440-Q.

- Ye, G. L. *et al.* (2015) 'Ligation of mouse L4 and L5 spinal nerves produces robust allodynia without major motor function deficit', *Behavioural Brain Research*, 276, 99–110. doi: 10.1016/j.bbr.2014.04.039.
- Zeilhofer, H. U., Möhler, H. y Di Lio, A. (2009) 'GABAergic analgesia: new insights from mutant mice and subtype-selective agonists', *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(8), 397–402. doi: 10.1016/j.tips.2009.05.007.
- Zimmermann, M. (1983) 'Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals', *Pain*, 16(2), 109–110. doi: 10.1016/0304-3959(83)90201-4.
- Zingg, R. M. (1932) 'Mexican folk remedies of Chihuahua', *Journal of the Washington Academy of Sciences*, 22(7), pp. 174–181.
- Zoghbi, M. D. *et al.* (2000) 'Volatile constituents of the flowers of *wulffia baccata* (l. f.) kuntze. and *zinnia elegans* jacq. (asteraceae)', *Journal of Essential Oil Research*, 12(4), 415–417. doi: 10.1080/10412905.2000.9699552.

## ANEXO I

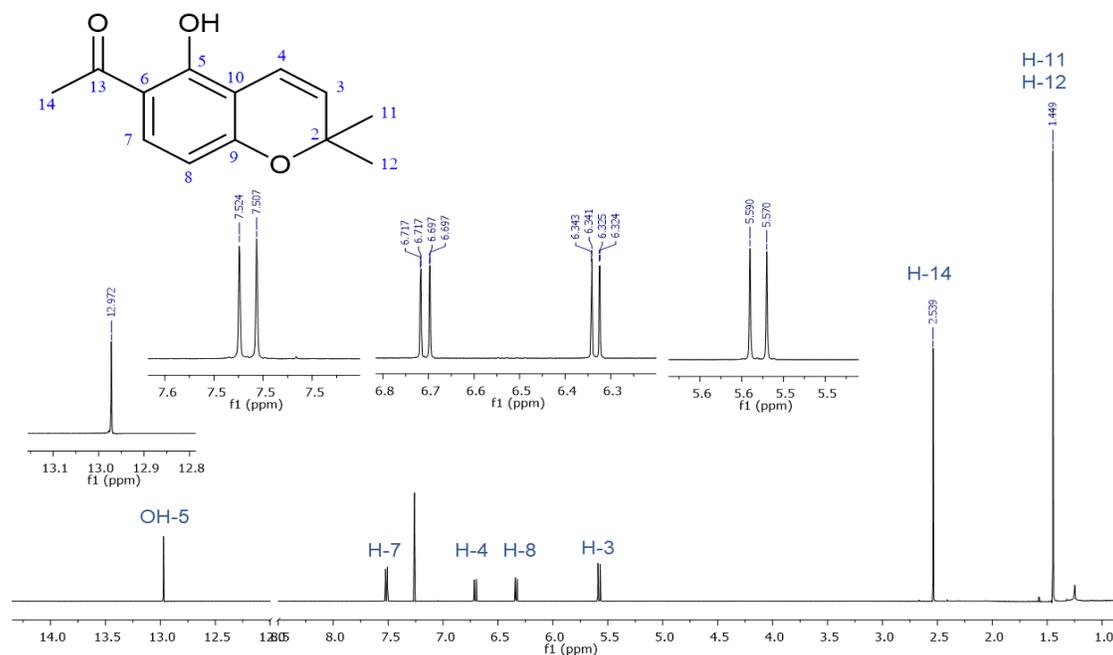


Fig. 1. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la desmetilisoencecalina (DME).

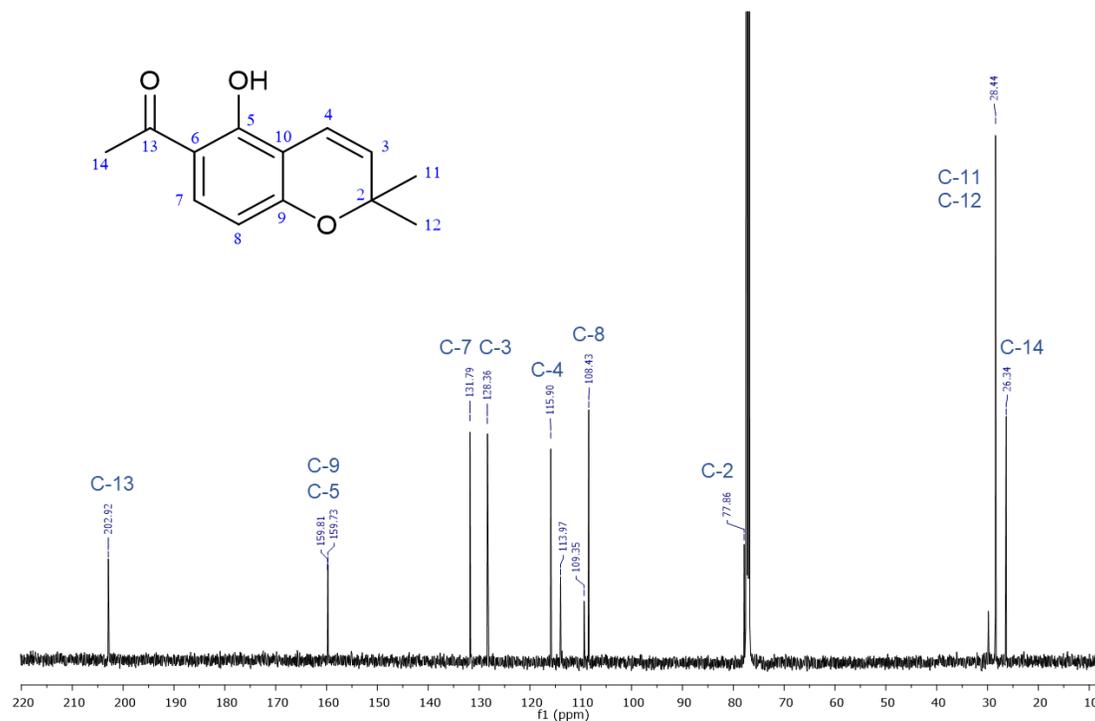
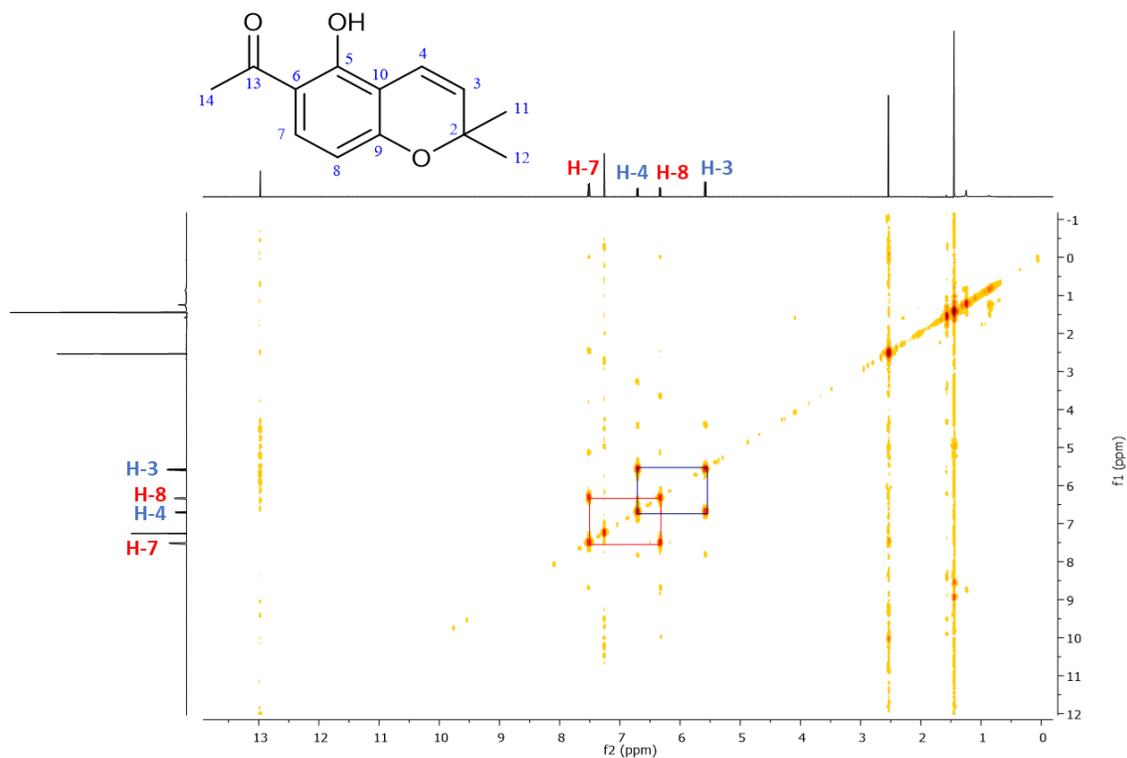
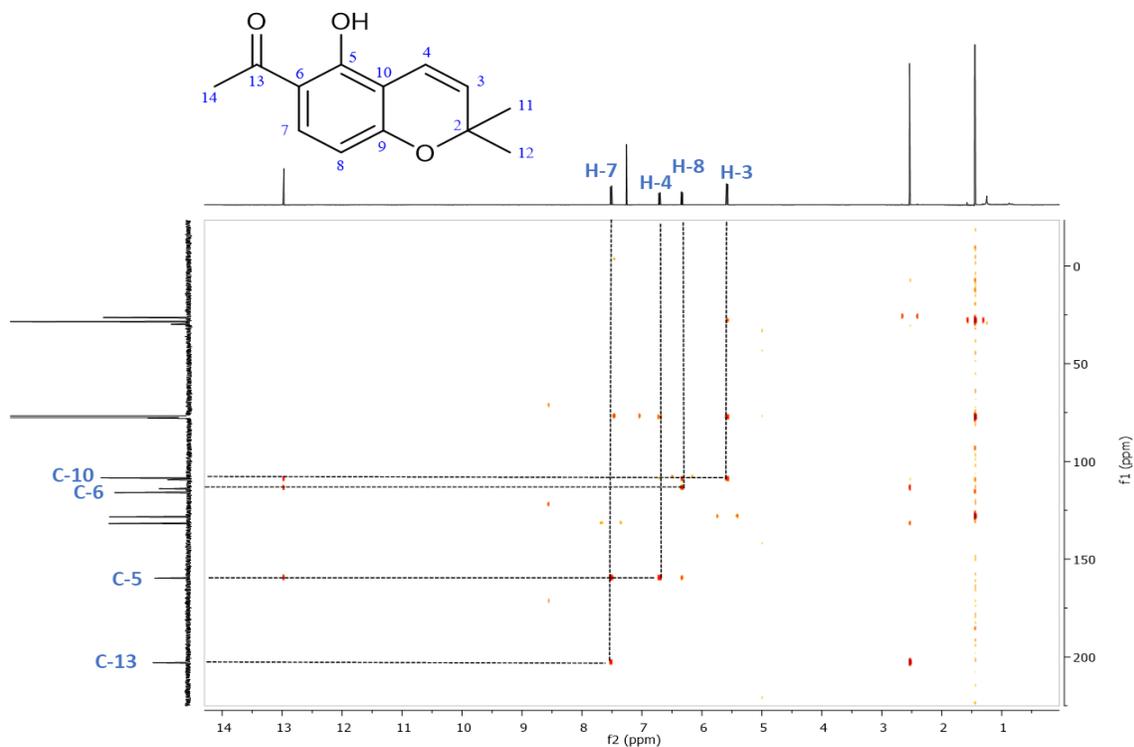


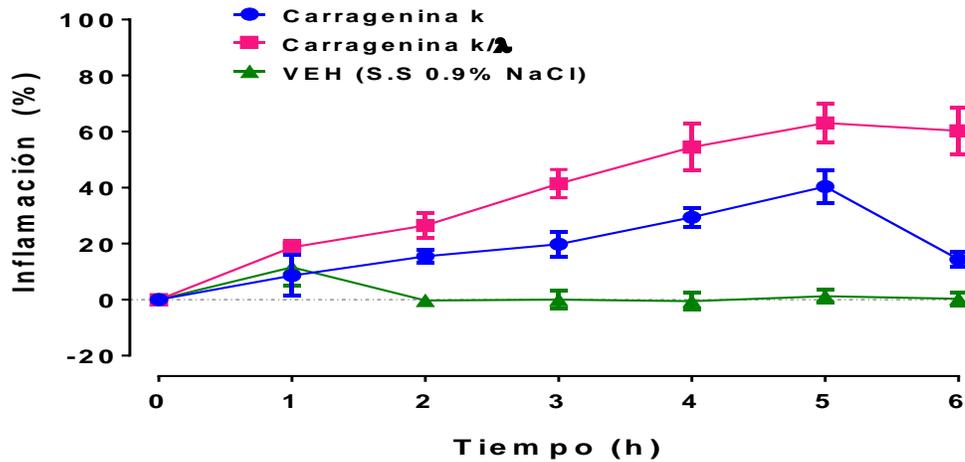
Fig. 2. Espectro de <sup>13</sup>C-RMN (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la desmetilisoencecalina (DME).



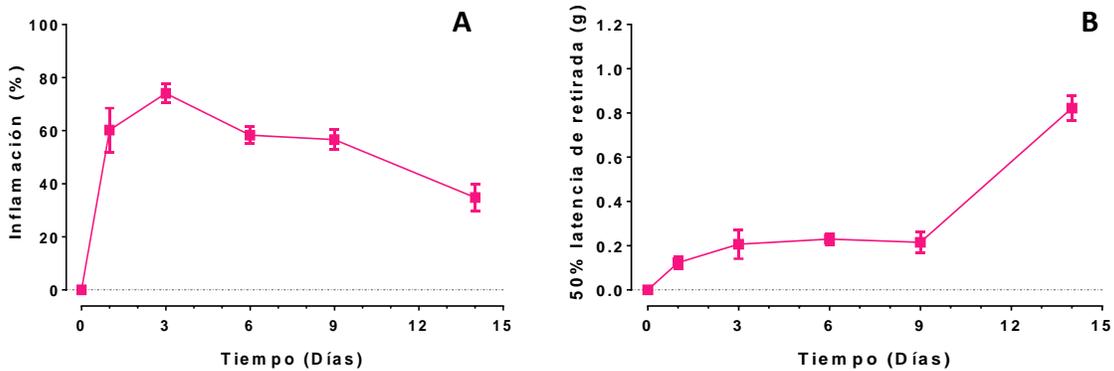
**Fig. 3.** Experimento de COSY de la desmetilisoencecalina (DME).



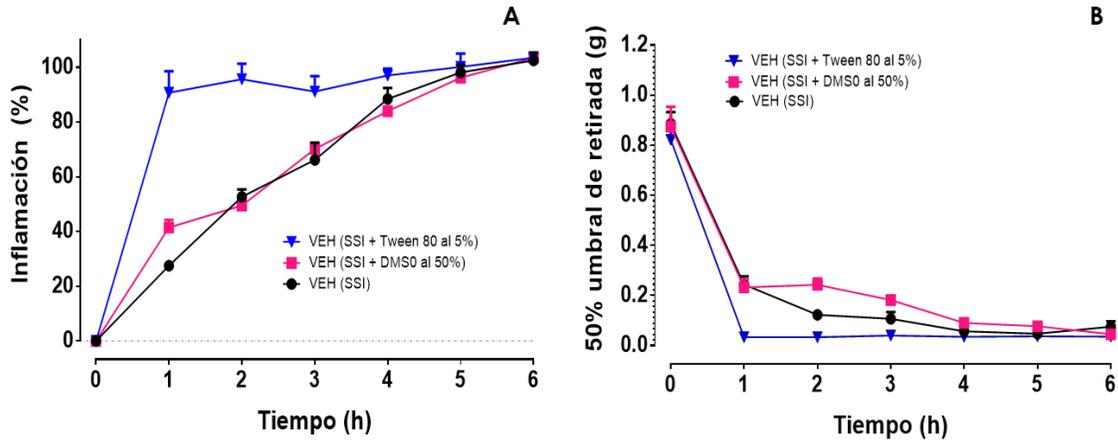
**Fig. 4.** Experimento de HMBC de la desmetilisoencecalina (DME).



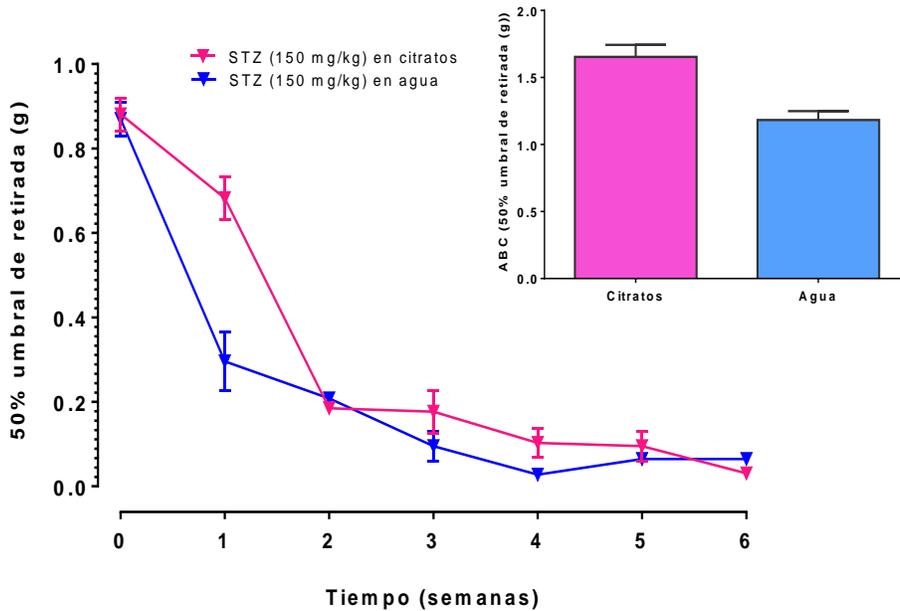
**Fig. 5.** Gráfico del porcentaje de % de inflamación contra tiempo (h) causado por la administración de 30  $\mu$ L/pata al 1% de 1) Carragenina C1013 (predominantemente  $\kappa$ , con una menor cantidad de  $\lambda$  carragenanos), 2) Carragenina C1867 (mezcla de  $\kappa$  y  $\lambda$  carragenanos). VEH: vehículo (solución salina, 0.9% de NaCl).



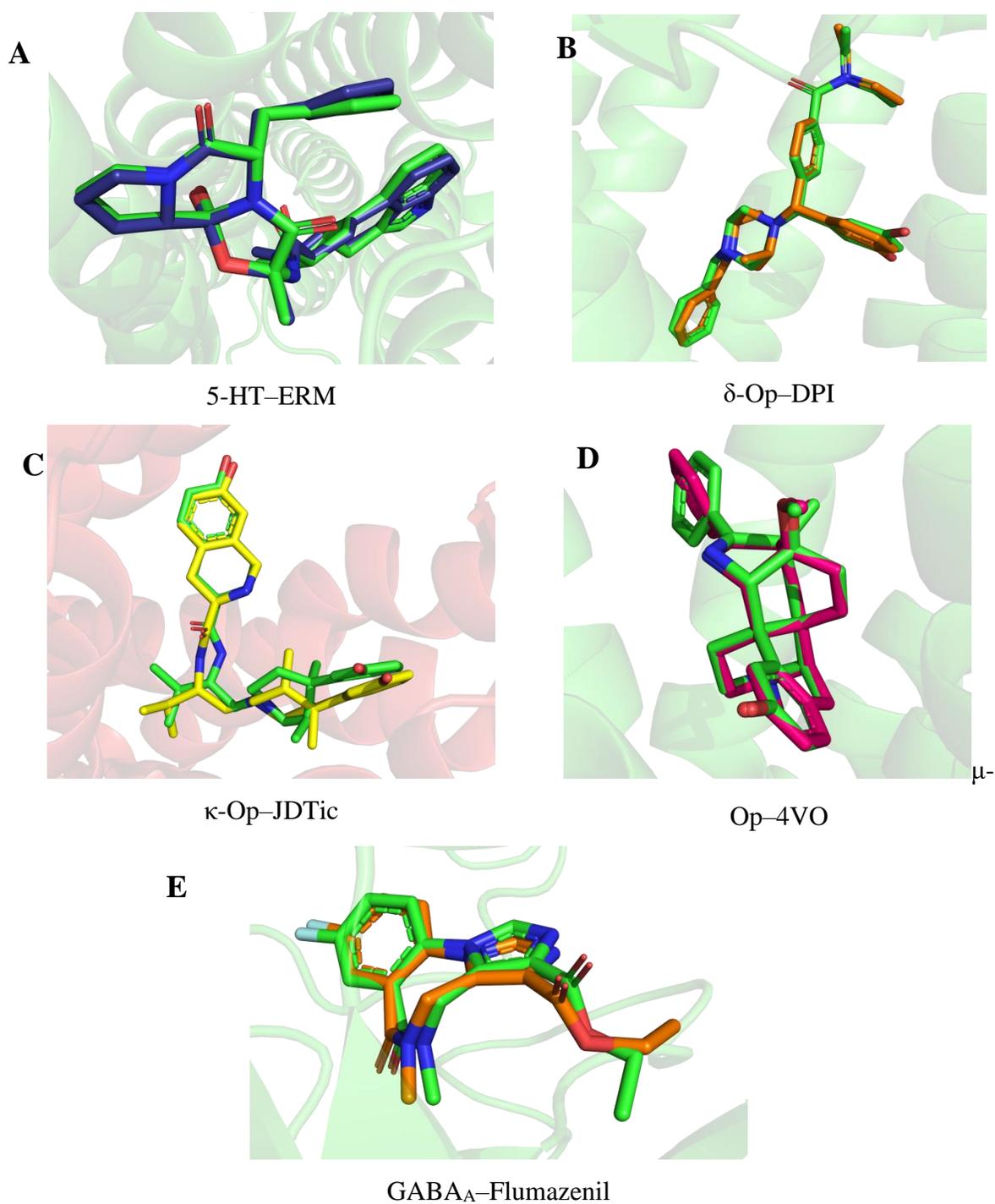
**Fig. 6.** Seguimiento en 14 días del efecto de la administración de 30  $\mu$ L/pata al 1% de Carragenina C1013. Panel A: Gráfico del porcentaje de inflamación contra el tiempo (días). Panel B: Gráfico del 50% de la letancia de retirada (g) contra el tiempo (días).



**Fig. 7.** Efecto de la administración de 20 µL/pata de tres diferentes vehículos: 1) VEH: SSI (0.9% de NaCl), 2) SSI + Tween 80 al 5%, 3) SSI + DMSO al 50%, en el modelo del edema de pata inducido por carragenina. Panel A: Gráfico del porcentaje de inflamación contra el tiempo (h). Panel B: Gráfico del 50% de la latencia de retirada (g) contra el tiempo (h).

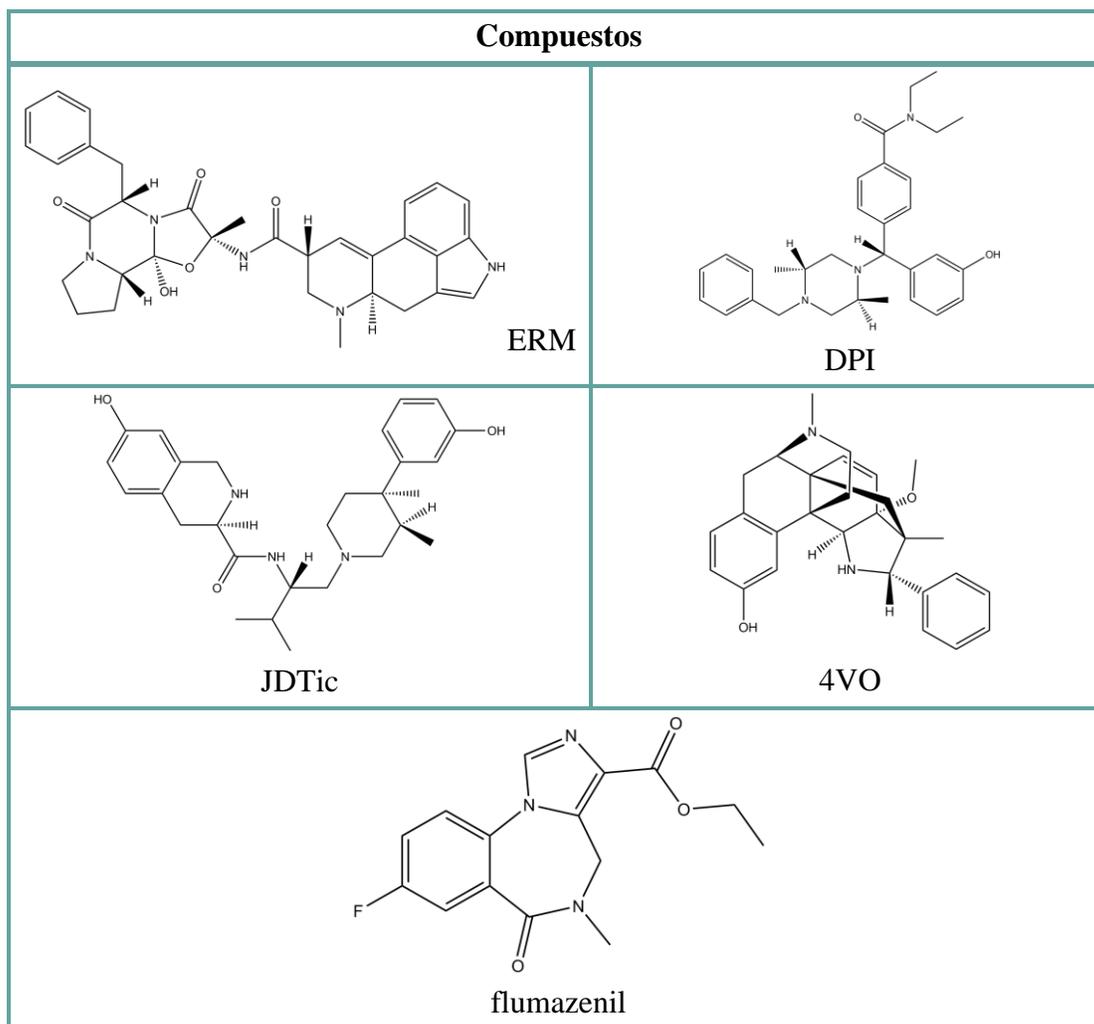


**Fig. 8.** Evaluación de la alodinia táctil durante 6 semanas después de la administración de STZ (150 mg/kg). Cada medición representada como la media ± EEM con seis ratones por grupo (n=6)

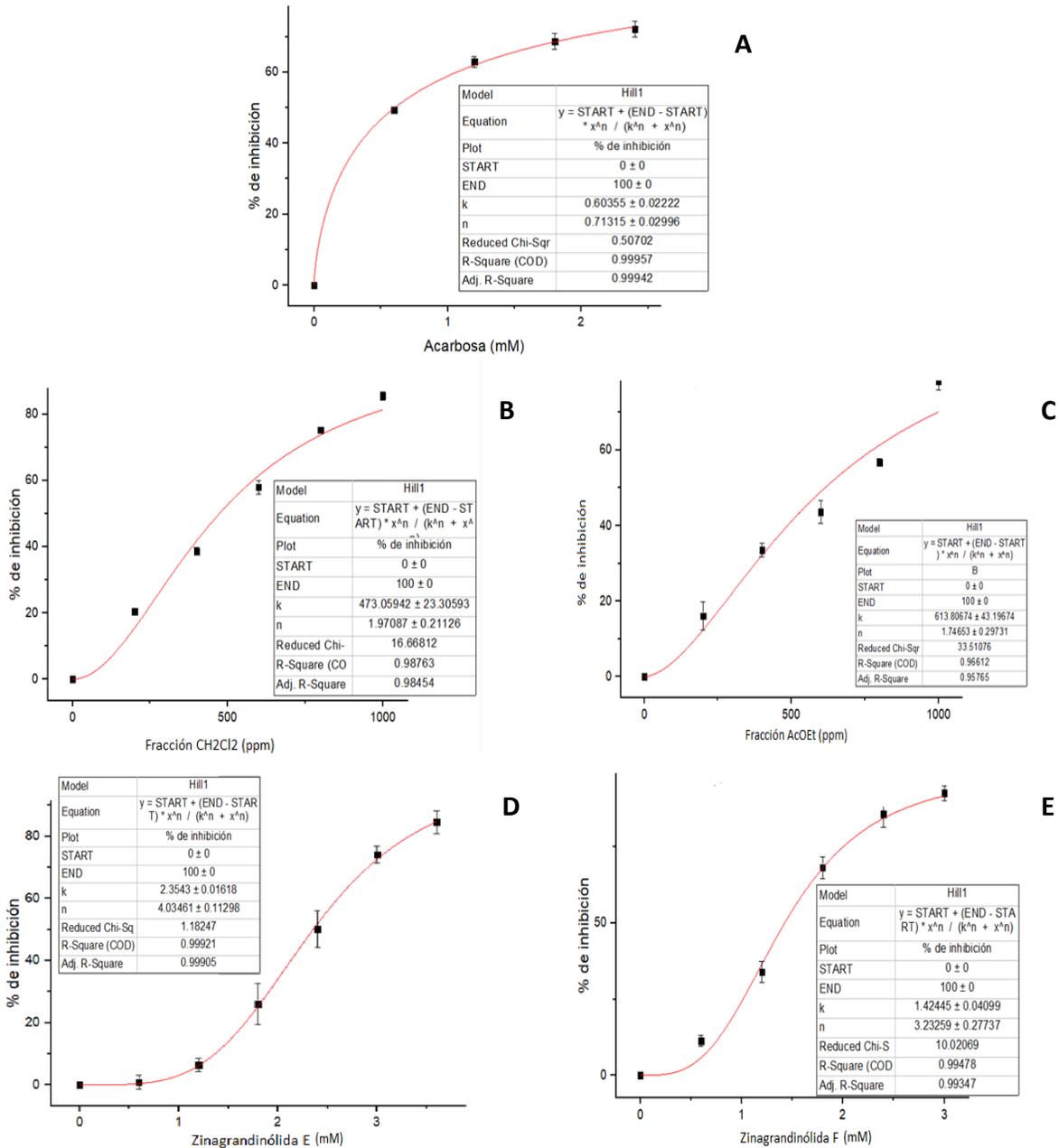


**Fig. 9.** **A)** Comparación de las poses de unión de ERM co-cristalizado (verde) con ERM acoplado (azul) en el receptor 5-HT<sub>1B</sub> (RMSD 0.233 Å). **B)** Comparación de las poses de unión de DPI co-cristalizado (verde) y DPI acoplado (naranja) en el receptor  $\delta$ -Opioide (RMSD 1.124 Å). **C)** Comparación de las poses de unión de JDTic co-cristalizado

(verde) y JDtic acoplado (amarillo) en el receptor  $\kappa$ -Opioide (RMSD 0.979 Å). **D)** Comparación de las poses de unión de 4VO co-cristalizado (verde) y 4VO acoplado (rosa) en el receptor  $\mu$ -Opioide (RMSD 0.816 Å). **E)** Comparación de las poses de unión del flumazenil co-cristalizado (verde) y el flumazenil acoplado (naranja) en el receptor GABA<sub>A</sub> (RMSD 0.992 Å).



**Fig. 10.** Estructuras de los compuestos co-cristalizados con los receptores 5-HT<sub>1B</sub>,  $\delta$ ,  $\kappa$ ,  $\mu$  opioides y GABA<sub>A</sub> utilizados para la validación del protocolo de acoplamiento molecular.



**Fig. 11.** Gráficas del efecto inhibitorio y cálculo de CI<sub>50</sub> de la acarbosa (A), fracciones de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (B) y AcOEt (C) obtenidas por reparto de la infusión, y los metabolitos zinagrandinólida E (D) y zinagrandinólida F (E) de *Z. grandiflora* sobre las α-glucosidasas de *Saccharomyces cerevesiae*.

# CAPÍTULO II

**La goma de Sonora: una  
contribución al estudio de  
su composición química**



## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 1.</b> Especies de <i>Tachardiella</i> .....	171
<b>Tabla 2.</b> $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) y $^{13}\text{H}$ (100 MHz, $\text{C}_3\text{OD}$ ) de la Emodina.....	188
<b>Tabla 3.</b> Compuestos de la goma de Sonora identificados por CG-EM.....	193
<b>Tabla 4.</b> Compuestos volátiles en la goma de Sonora .....	195

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Algunos insectos de laca conocidos en el Nuevo Mundo. ....	170
<b>Figura 2.</b> Hembra adulta de <i>Tachardiella argentina</i> .....	172
<b>Figura 3.</b> <i>Tachardiella argentina</i> sobre una rama de <i>Acacia caven</i> (Fabaceae). .....	173
<b>Figura 4.</b> Exudados (lacas) de insectos .....	174
<b>Figura 5.</b> Espectro FTIR de la (b) laca de <i>Tachardiella fulgens</i> y (a) la laca comercial “shellac”.. ..	177
<b>Figura 6.</b> <i>Coursetia glandulosa</i> .....	178
<b>Figura 7.</b> Fraccionamiento por CCA del extracto acetónico de la goma de Sonora. F: Fracción. ....	186
<b>Figura 8.</b> Estructuras de los compuestos (1) y (2) aislados de la goma de Sonora. .....	187
<b>Figura 9.</b> Sólidos cristalinos puros obtenidos del extracto orgánico total de la Goma de Sonora. ....	187
<b>Figura 10.</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de (1).....	189
<b>Figura 11.</b> Espectro de <sup>13</sup> C-RMN (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de (1).....	189
<b>Figura 12.</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de (2).....	190
<b>Figura 13.</b> Espectro de <sup>13</sup> C-RMN (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de (2).....	190
<b>Figura 14.</b> Cromatogramas de iones totales obtenidos CG-EM de los compuestos volátiles presentes en la goma de Sonora obtenidos por la técnica de MEFS-EC .....	194

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1. Insectos que producen lacas

La familia Kerriidae se conforma por insectos cóccidos, que se caracterizan por la producción de “lacas” (exudados). En la **Figura 1** se muestran algunas fotografías del aspecto de las lacas producidas por diferentes especies de la familia Kerriidae.



**Figura 1.** Algunos insectos de laca conocidos en el Nuevo Mundo. (A) *Kerria laca*. (B) *Paratachardiina pseudolobata*. (C) *Austrotachardiella colombiana*. (D) *Tachardiella ferrisi*. (E) *Tachardiella fulgens*. (F) *Tachardiella glomerella*. (G) *Tachardiella ingae*. (H) *Tachardiella larrae*. (I) *Tachardiella mexicana*. Tomado de (Kondo and Gullan, 2011)

Las especies asiáticas, especialmente del género *Kerria*, son las más estudiadas, debido a que estas generan un exudado que se refina y se vende

comercialmente como esmalte para las uñas o “shellac”. Se ha encontrado que los componentes químicos de estas lacas dependen del taxón y de la planta hospedera. (Mills y White, 2012). La especie *Kerria lacca*, es de especial interés económico en la India, que acapara cerca del 50 % del mercado mundial (aproximadamente 2000 toneladas anuales). Este insecto exuda tres importantes productos: tinte laca, cera laca y goma laca que, a su vez, se refinan para la producción de una variedad de otros productos como lo son tinte para lana, colorante para la industria alimentaria, cera para confitería, lápices de cera, labiales, resina para recubrimiento de frutas y dulces, aditivo para champú, acondicionadores de cabello, aislante, adhesivo, entre otros (Shamim *et al.*, 2016).

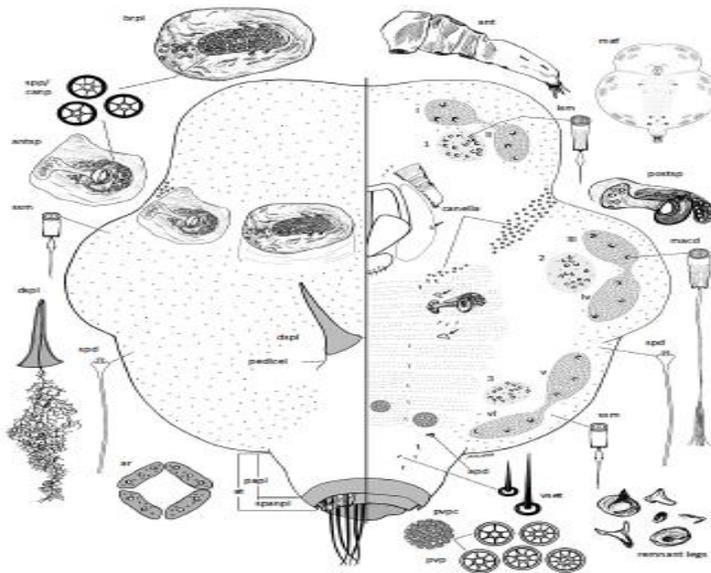
## 1.2. El género *Tachardiella*

El género *Tachardiella* (Kerriidae) se puede encontrar en toda la región neártica y regiones neotropicales, pero de manera más usual es distribuye en las zonas desérticas del suroeste de Estados Unidos (California, Arizona. Nuevo México, Texas) y norte de México; así como en algunas zonas de Argentina y Brazil. El género *Tachardiella*, actualmente, se encuentra conformado por 17 especies (**Tabla 1**). (Kondo y Gullan, 2011).

**Tabla 1.** Especies de *Tachardiella*.

Nombre	
<i>Tachardiella argentina</i>	<i>Tachardiella lycii</i>
<i>Tachardiella artocarpi</i>	<i>Tachardiella mexicana</i>
<i>Tachardiella cordaliae</i>	<i>Tachardiella nigra</i>
<i>Tachardiella ferrisi</i>	<i>Tachardiella ourinhensis</i>
<i>Tachardiella fulgens</i>	<i>Tachardiella palobrea</i>
<i>Tachardiella glomerella</i>	<i>Tachardiella parva</i>
<i>Tachardiella ingae</i>	<i>Tachardiella postulata</i>
<i>Tachardiella larrae</i>	<i>Tachardiella resinatum</i>
<i>Tachardiella cornuta</i>	

Hembras y machos de este género se pueden distinguir fácilmente, ya que son precisamente las hembras quienes producen las lacas de interés. De forma individual, las hembras son insectos ovalados a elípticos, con un margen de seis lóbulos en los especímenes más jóvenes; que se vuelven de tres lóbulos en los especímenes más viejos, adultos, y sin lóbulos y ovoides en los especímenes más viejos. Su cuerpo tiene de 0.9–2.4 mm de largo, y de 0.9–2.5 mm de ancho. En la **Figura 2** se ilustra la apariencia de un hembra adulta joven de la especie *Tachardiella argentina* (Kondo y Gullan, 2011).



**Figura 2.** Hembra adulta de *Tachardiella argentina*. Imagen tomada de Kondo y Gullan, 2011.

Las hembras del género *Tachardiella*, se hospedan en plantas específicas para producir exudados rígidos (lacas) que revisten sus cuerpos y huevos. A medida que se desarrollan, las células de resina se unen gradualmente formando una incrustación gruesa continua sobre la rama de la planta huésped. Inmediatamente antes de poner las larvas, la hembra retira parte de su cuerpo de la cubierta resinosa endurecida para crear un espacio vacío en el que las coloca (Bose, Sankaranarayanan y Sen Gupta, 1963). En general, la

producción de laca para las especies de este género se forma en masas de aspecto resinoso, de color rojo (generalmente), que envuelve una superficie considerable de la rama por completo. La masa resinosa se forma por la fusión de numerosos individuos, y es rugosa, desigual, cubierta de protuberancias (**Figura 3–A**) que corresponden a las células de los insectos que quedan debajo; algunos individuos están en contacto con el exterior durante todo el año a través de pequeños orificios. El material que constituye este producto es inodoro, sin sabor, más denso que el agua, duro y fácilmente rompible, pero difícil de pulverizar. (Kondo y Gullan, 2011)



**Figura 3.** (A) *Tachardiella argentina* sobre una rama de *Acacia caven* (Fabaceae). La flecha apunta a una elevación de tipo “protuberancia”. (B) *Tachardiella palobrea* atendida por *Camponotus* sp. cf. *rosariensis*, sobre *Parkinsonia praecox* (Fabaceae). Imagen tomada de Kondo y Gullan, 2011.

Las especies de *Tachardiella* son capaces de formar asociaciones simbióticas con especies de hormigas para asegurar su supervivencia (**Figura 3–B**). Las hormigas se alimentan del envoltorio que cubre al insecto del género *Tachardiella*, y cargan las larvas en su abdomen, y las esparcen sobre las ramas de la planta hospedera; o bien cuidan las larvas en sus hormigueros cuando las condiciones climáticas son poco favorables como en el invierno.

En la literatura, los reportes sobre los usos de las lacas de este género son limitados, y se centran en su aplicación tradicional en Norteamérica, principalmente como adhesivos orgánicos. En Arizona, las especies más comúnmente asociadas con un uso cultural son *Tachardiella larrae* y *Tachardiella fulgens* (**Figura 4**), aunque existen otras. Los grupos nativos americanos, principalmente los Hohokam, utilizaban estas lacas como un adhesivo, pintura aglutinante, en la elaboración de enseres y construcciones, como agente contra el agua en materiales para cocinar y guardar alimentos o líquidos, para la construcción de flechas, e incluso para la elaboración de pelotas de juego. (Fox, Heron y Sutton, 1995; Bisulca, Pool y Odegaard, 2017). Estas lacas no son solubles en agua, por lo que en el Suroeste prehispánico debieron ser calentadas antes de utilizarse. (Sutton, 1990)



**Figura 4.** Exudados (lacas) de insectos. (A) *Tachardiella larrae*. (B) *Tachardiella fulgens*. (C) *Tachardiella cornuta*. (Bisulca, Pool y Odegaard, 2017)

Las lacas de los cóccidos del género *Tachardiella* no han sido estudiadas como las que producen las especies asiáticas (*Kerria* spp.). El único estudio

químico con el que se cuenta es el del exudado de *T. Larrea*; así, un análisis por CG-EM de un extracto cloroformo-metanol confirmó la presencia en el exudado de ácido tetradecanoico, ácido hexadecanoico, ácido 7-hidroxitetradecanoico y ácido 7-hidroxihexadecanoico. Este estudio también demostró que estos compuestos se encuentran en mayor proporción que en las lacas asiáticas (Fox et al., 1995).

### 1.3. *Tachardiella fulgens*

Se distribuye en la región neártica que comprende México y Estados Unidos, especialmente en el estado de Arizona. Tiene como plantas huéspedes a especies de la familia Fabaceae, *Sebania* sp. (Cockerell 1895), *Mimosa* o *Prosopis* y *Cousetia* spp. (Chamberlin 1923). Cockerell (1985), fue el primero en describir las propiedades medicinales de este insecto de laca, tal como se menciona a continuación:

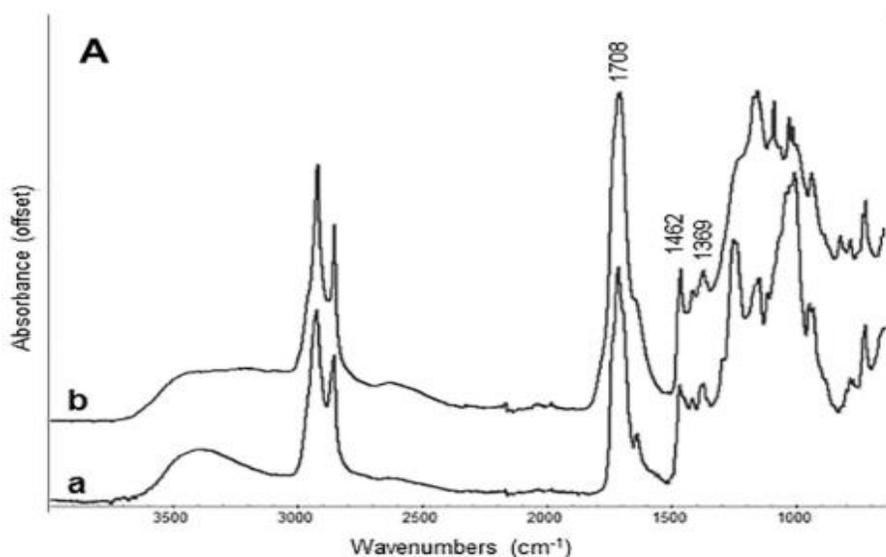
*“Hab. Arizona, received from Prof. J. W. Toumey, who gives the following interesting particulars. He got it from a Mexican and has seen only the stem of the food-plant, but thinks it is a Sesbania. He was told that this lac was used quite extensively by the Mexicans as a medicine for stomach troubles, under the name of “Gomea”. It is kept in the drug shops at Tucson, and meets quite a sale. It is also used to some extent in mending pottery, etc. Finally, he adds, the Mexicans make a marked distinction between this and T. larreae, the latter not being considered to have any medicinal qualities”.* [Hab. Arizona, recibido por el Prof. J. W. Tourney, quien proporciona las siguientes características interesantes. Él lo obtuvo de un mexicano, y ha visto solo el tallo de la planta comestible, pero piensa que es *Sesbania*. Le fue dicho que la laca se utilizaba extensamente por los mexicanos como una medicina para problemas del estómago, bajo el nombre de “Goma” (“Gomea”). Se encuentra en las farmacias de Tucson, y se vende muy bien. También se utiliza, en cierto grado, para arreglar cerámica, etc. Finalmente, agrega, los mexicanos hacen una marcada

distinción entre *T. larreae*, la última no se considera tiene ninguna cualidad medicinal]. (Cockerell, 1985)

Cockerell (1985), también describió la apariencia de los individuos de la especie, tal como se muestra a continuación:

*Female scales “usually massed together, more or less surrounding the twig, forming an irregular nodulose bright reddish-orange coating about 4 mm. thick. A single scale is about 5 mm. long and 4 broad, and presents a conspicuous somewhat curved, blunt, shining, dorsal hump; also a tail-like projection, sometimes directed upwards, and two or three irregular projections on the side.”* [Las cochinillas hembras, generalmente se agrupan, más o menos rodeando la ramita, formando una capa nodulosa irregular de color rojo anaranjado brillante de unos 4 mm de grosor. Una sola cochinilla es de unos 5 mm de largo y 4 de ancho, y presenta una joroba dorsal conspicua algo curvada, roma, brillante; también una proyección en forma de cola, a veces dirigida hacia arriba, y dos o tres proyecciones irregulares en el costado”. (Cockerell, 1985)

La laca que produce *T. fulgens*, no ha sido antes estudiada químicamente, sin embargo, Bisulca y col. (2017), realizaron análisis de espectroscopía de infrarrojo (FTIR) para su reconocimiento en materiales arqueológicos (**Figura 5**). La banda más característica para esta, y otras lacas, es la de los carbonilos, en el rango de  $\sim 1700\text{--}1715\text{ cm}^{-1}$ . Esta región contiene bandas superpuestas de ésteres ( $\sim 1715\text{--}1740\text{ cm}^{-1}$ ) y ácidos carboxílicos ( $\sim 1695\text{ cm}^{-1}$ ). El hombro en la banda de carbonilo en  $1647\text{ cm}^{-1}$  se debe a las insaturaciones (C=C). La laca también muestra las bandas características  $1460\text{ cm}^{-1}$ ,  $1410\text{ cm}^{-1}$ , y  $1370\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a la flexión de metilos y metilenos. Las bandas entre  $\sim 2950\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$  se deben a las vibraciones tensionales de los metinos. Por último, las bandas a  $720\text{ cm}^{-1}$  corresponden a las cadenas largas de alcanos asociadas a el componente ceroso del exudado. (Bisulca, Pool y Odegaard, 2017)



**Figura 5.** Espectro FTIR de la (b) laca de *Tachardiella fulgens* y (a) la laca comercial “shellac”. Imagen tomada de (Bisulca, Pool y Odegaard, 2017).

#### 1.4. *Coursetia glandulosa*

La planta hospedera del cóccido *Tachardiella fulgens* para la producción de la goma de Sonora, es *Coursetia glandulosa* (sin. *Coursetia microphylla*), la cual pertenece a la familia Fabaceae o de las leguminosas. Se distribuye desde el sur de Arizona hasta Oaxaca (esencialmente, a lo largo de la vertiente del Pacífico) y se le conoce comúnmente en México con los nombres de palo dulce, samo prieto, becerrero, cacalahualillo, chipil, frijolillo, guachipil, matarrata, tambacho, vara alcalde y zuzupe, y en Arizona como “Rosary babybonnet”. Es un arbusto o árbol caducifolio de hasta 10 m de alto, de ramillas piloso-vilosas y hojas de hasta 15 cm de largo; sus inflorescencias son en forma de racimos solitarios o fasciculados, de hasta 12 cm de largo; mientras que su fruto es linear (glandular-pubescente), a menudo constreñido entre las semillas, de 2.5 a 11 cm de largo y de 4 a 7 mm de ancho (**Figura 6**) (Rzedowski *et al.*, 2016).



**Figur 6.** *Coursetia glandulosa*. (A) Hojas. (B) Flores. (C) Frutos. (D) Semillas. (E y F) Planta completa. (Felger *et al.*, 2015)

### 1.5. La goma de Sonora

La goma de Sonora o arí es un exudado producido por el insecto cóccido *Tachardiella fulgens*, huésped del árbol *Coursetia glandulosa* (Fabaceae). El arí, es un agente medicinal en los estados de Chihuahua y Sonora, principalmente, como gastroprotector (Cockerell, 1985). De acuerdo con Bye y Linares (2018, comunicación personal) este material se utiliza para el tratamiento de la diabetes también, en el estado de Chihuahua. El arí se consume como un ingrediente la bebida ancestral “tesgüino”, que proviene del vocablo náhuatl *tescuini* que significa latido del corazón. Esta bebida consiste principalmente en la fermentación del maíz a la que se le agregan un conjunto de raíces, hierbas, cortezas y en ocasiones, el arí (Fournier García and Mondragón Barrios, 2012). Otra manera más contemporánea de consumir el arí

es como condimento para la elaboración de aguachile, que es un platillo con camarones que se bañan en una salsa hecha con chile chiltepín, limón y arí, principalmente. También se consume solamente la salsa para el tratamiento de la resaca producida por la ingesta de bebidas alcohólicas y para el tratamiento de la gastritis.

A la fecha no existen datos científicos que respalden su uso medicinal. Los estudios sobre este material se han centrado en la investigación arqueológica de sus usos por los nativos americanos (Fox, Heron y Sutton, 1995). Como ya se mencionó anteriormente, el único estudio químico que existe sobre un exudado similar es el de Fox y col. (1995), donde mencionan algunos de los componentes de *Tachardiella larra*. Mientras que para el exudado de *Tachardiella fulgens*, solo se cuenta con su caracterización mediante espectroscopía de infrarrojo (FTIR) (Bisulca, Pool y Odegaard, 2017). Por lo tanto, el estudio de la composición de estos recursos naturales es un campo virgen y promisorio.

## 2. HIPÓTESIS

---

Los antecedentes etnobotánicos de la goma de Sonora sugieren una composición química que justifique sus propiedades medicinales, mismas que se pueden justificar mediante estudios farmacológicos apropiados.

## 3. OBJETIVOS

---

### 3.1. Objetivo General

Estudiar la composición química de la goma de Sonora con el propósito de establecer una relación con su uso tradicional como agente antidiabético.

### 3.2. Objetivos Específicos

- Realizar la revisión bibliográfica de los antecedentes etnobotánicos de la goma de Sonora.
- Aislar, purificar y caracterizar metabolitos secundarios de la goma de Sonora mediante la aplicación de los métodos apropiados.
- Establecer el volatiloema del exudado mediante estudios de microextracción en fase sólida acoplada a CG-EM.

## 4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

---

### 4.1. Droga cruda

La goma de Sonora fue recolectada en la Barranca de Urique en el estado de Chihuahua, por el Dr. Robert Bye y la Dra. María Edelmira Linares, en el mes de septiembre de 2016; y un ejemplar se depositó en el Herbario Nacional de México (MEXU) (Bye 38403 & Linares).

### 4.2. Preparación del extracto acetónico

Se realizó el extracto orgánico a partir de 458 g de la droga cruda, seca y molida, mediante maceración en 1.5 L de acetona. Pasados 7 días el extracto se filtró y se concentró a vacío. El procedimiento se repitió tres veces. Se obtuvieron 80 g del extracto, el cual presentó una apariencia gomosa y de color naranja rojizo-intenso.

### 4.3. Aislamiento y purificación de metabolitos secundarios

El fraccionamiento primario del extracto de acetona se llevó a cabo mediante cromatografía en columna abierta (CCA) Para ello, se colocaron 75 g del extracto orgánico, en una columna cromatográfica empacada con 800 g de sílice desactivada al 10%, utilizando un gradiente de elución hexano-acetato de etilo, para terminar con una mezcla de acetato de etilo: metanol 80:20. Se obtuvieron 196 fracciones de 200 mL, los cuales se reunieron por su similitud cromatográfica, para hacer un total de 12 fracciones (GS1 – GS12).

Se continuó con el fraccionamiento secundario por CCA, utilizando gel de sílice y/o Sephadex, para la obtención de compuestos puros. Las columnas de gel de sílice se eluyeron con mezclas de hexano-acetato de etilo-metanol o hexano-diclorometano en gradiente de polaridad. Las columnas de Sephadex se eluyeron de manera isocrática, ya sea con metanol 100% o con mezclas de acetona-metanol. De estos fraccionamientos se logró obtener 34.3 mg de ácido 7-hidroxihexadecanoico (**1**) y 439 mg de emodina (**2**). La caracterización de estos productos se llevó a cabo por RMN, IR, y CG-EM.

**Ácido 7-hidroxi-hexadecanoico (1):** Sólido en forma de hojuelas translúcidas;  $^1\text{H}$ -RMN (MeOD, 400 MHz):  $\delta$  3.49 (1H, *m*, H-7), 2.27 (2H, *t*,  $J = 7.4$  Hz, H-2), 1.60 (2H, *d*,  $J = 14.8, 7.4$  Hz, H-3), 0.89 (3H, *t*,  $J = 6.8$  Hz, H-16);  $^{13}\text{C}$ -RMN (MeOD, 100 MHz):  $\delta$  177.7 (C-1), 72.4 (C-7), 38.5 (C-6), 38.3 (C-8), 34.9 (C-2), 33.1 (C-14), 30.9 (C-10), 30.8 (C-13), 30.7 (C-11), 30.5 (C-12), 30.3 (C-4), 26.8 (C-9), 26.5 (C-5), 26.1 (C-3), 23.7 (C-15), 14.4 (C-16).

**Emodina (1,3,8-Tri-hidroxi-6-metil-antra-quinona) (2):** Sólido cristalino en forma de agujas, color naranja;  $^1\text{H}$ -RMN (MeOD, 400 MHz):  $\delta$  7.39 (1H, *d*,  $J = 2.7$  Hz, H-5), 7.01 (1H, *d*,  $J = 2.5$  Hz, H-4), 6.87 (1H, *d*,  $J = 2.3$  Hz, H-7), 6.47 (1H, *d*,  $J = 2.5$  Hz, H-2), 2.67 (3H, *s*, H-11);  $^{13}\text{C}$ -RMN (MeOD, 100 MHz):  $\delta$  189.2 (C-9), 184.2 (C-10), 166.3 (C-3), 165.4 (C-1), 163.1 (C-8), 146.6 (C-6), 138.4 (C-5a), 135.9 (C-4a), 125.6 (C-7), 124.3 (C-8a), 113.3 (C-5), 111.7 (C-9a), 109.3 (C-2), 108.2 (C-4), 24.2 (C-11).

#### 4.4. Análisis de por CG-EM

Los análisis GC-EM se realizaron en un cromatógrafo de gases Agilent serie 6890 N equipado con un detector de espectrómetro de masas de tiempo de vuelo LECO PEGASUS 4D (MS-TOF; Agilent Technology, Palo Alto, California, EE. UU.), utilizando una Columna capilar de 5% difenil-95% dimetilpolisiloxano (DB-5) (20 m  $\times$  0.18 mm  $\times$  0.18  $\mu\text{m}$  de espesor de película) (Agilent J&W Scientific, Palo Alto, California, EE. UU.). Las condiciones de

CG-EM fueron: caudal del gas portador (He): 1,0 mL/min; “splitless”; volumen de inyección: 1,0  $\mu$ L; inyector y temperatura de la línea de transferencia de EM: 300 y 250 °C, respectivamente; rampa de temperatura del horno: 40 °C mantenida durante 3 min, luego elevada a 300 °C a 20 °C/min (mantenida durante 15 min, isotérmicamente); modo de ionización: impacto electrónico a 70 eV; escaneo de rango de masa: 33-500 m/z. La identificación de los componentes se llevó a cabo mediante la inyección conjunta de la muestra con una solución que contiene la serie homóloga de n-alcenos (C8–C20) para establecer los índices de retención (índices de Kovats), y mediante la comparación de los patrones de fragmentación observados en los espectros de masa de los analitos detectados con aquellos de patrones almacenados en la base de datos del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST). En todos los casos, las determinaciones se realizaron por triplicado.

#### 4.5. Análisis de los compuestos volátiles por MEFS

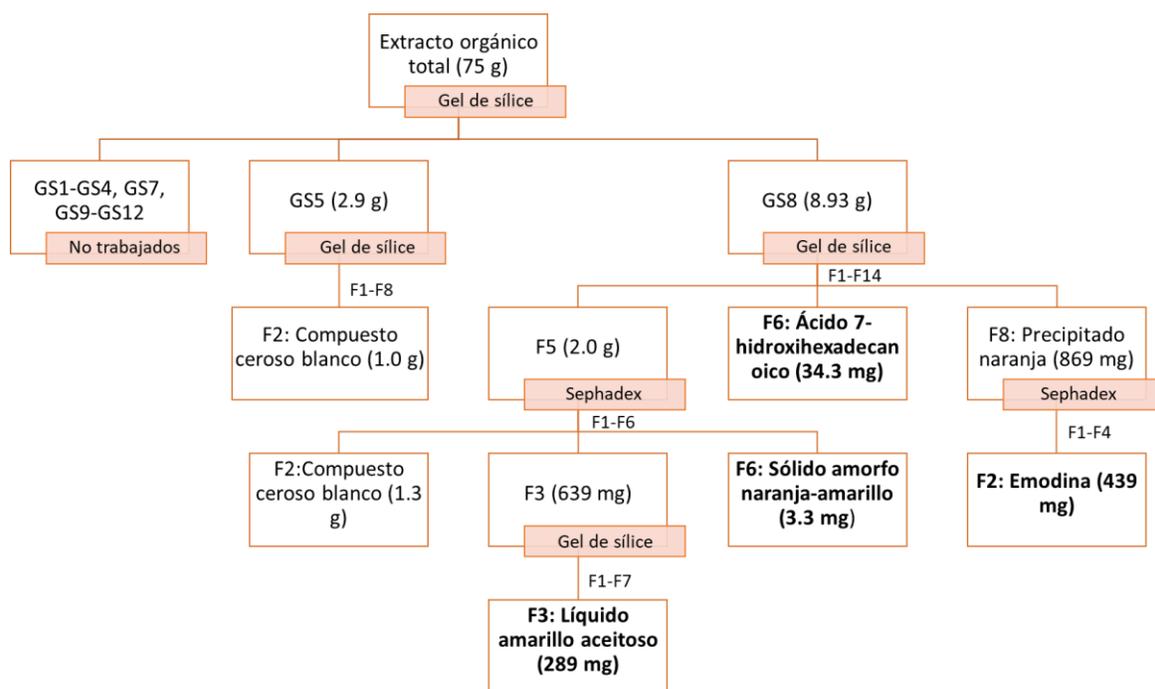
Para la obtención de los compuestos volátiles de la laca, se utilizó la técnica de microextracción en fase sólida en el espacio de cabeza (MEFS-EC). Se colocó una cantidad de la droga cruda (300 mg), cloruro de sodio (300 mg) y agua HPLC (15 mL), simulando la preparación de una infusión, en un vial de 30 mL sellado herméticamente con un tapón de polipropileno PTFE / recubierto con un septo de silicona. Las condiciones experimentales para la extracción fueron: temperatura de extracción: 60 ° C; tiempo de equilibrio: 5 min; tiempo de extracción: 25 min. En el procedimiento se utilizaron cuatro fibras de MEFS (Supelco Technology, St. Louis, Mo., EE. UU.): una fibra revestida con polidimetilsiloxano (PDMS; 100  $\mu$ m), una fibra revestida con polidimetilsiloxano / divinilbenceno (PDMS / DVB; 65  $\mu$ m), una fibra recubierta de divinilbenceno / carboxeno / polidimetilsiloxano (DVB / Carboxen / PDMS; 50/30  $\mu$ m) y una fibra recubierta de carboxeno / polidimetilsiloxano (Carboxen /

PDMS; 75  $\mu\text{m}$ ). Todas las fibras se expusieron al espacio de cabeza (EC) para interaccionar con compuestos volátiles. El acondicionamiento de las fibras antes del análisis de CG-EM se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las proporciones relativas de los componentes individuales adsorbidos en las fibras se calcularon con base en las áreas de los picos del cromatograma de iones totales (CIT) y se reportan como porcentaje de la suma de todas las áreas de pico. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Aislamiento, purificación y caracterización de metabolitos secundarios presentes en la goma de sonora

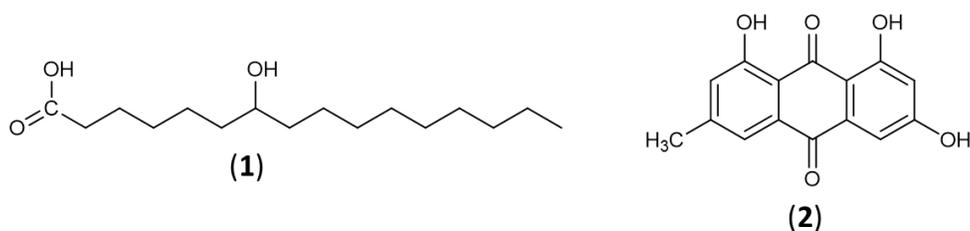
Como se mencionó en la sección experimental, a partir del extracto de acetónico (75 g), se realizaron una serie de fraccionamientos mediante CCA, utilizando gel de sílice o Sephadex, de acuerdo con la **Figura 7**.



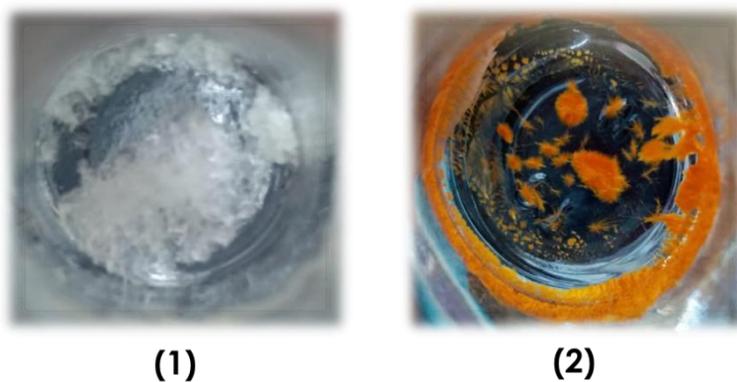
**Figura 7.** Fraccionamiento por CCA del extracto de acetona de la goma de Sonora. F: Fracción.

De este fraccionamiento se lograron aislar y purificar 34.3 mg de ácido 7-hidroxihexadecanoico (1) y 439 mg de emodina (2) (**Figura 8**). El primero con apariencia de escamas sólidas cristalinas, y el segundo con apariencia de

cristales en forma de aguja color naranja, tal como se muestra en la **Figura 9**. Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , para el compuesto (1) se muestran en las **Figuras 10** y **11**. Mientras que los resultados de los experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para el compuesto (2) se muestran en la **Tabla 2**, y **Figuras 12** y **13**. Los experimentos de RMN en dos dimensiones HMBC, HSQC, COSY y NOESY para el compuesto (2), además de los espectros de IR y masas para (1) y (2) se encuentran el Anexo II.



**Figura 8.** Estructuras de los compuestos (1) y (2) aislados de la goma de Sonora.



**Figura 9.** Sólidos cristalinos puros obtenidos del extracto orgánico total de la goma de Sonora.

**Tabla 2.**  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) y  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de la emodina

Posición	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	HMBC
1	165.4	–	
2	109.3	6.47 (d, $J=2.46$ Hz)	4, 9a, 3, 1, 9
3	166.3	–	
4	108.2	7.01 (d, $J=2.46$ Hz)	2, 9a, 10, 1, 4a, 9
4a	135.9	–	
5	113.3	7.39 (d, $J=2.67$ Hz)	8a, 10, 8, 5a
5a	138.4	–	
6	146.6	–	
7	125.6	6.87 (d, $J=2.34$ Hz)	11, 5, 8a, 8
8	163.1	–	
8a	124.3	–	
9	188.6	–	
9a	111.7	–	
10	184.2	–	
11	24.2	2.67 (s)	7, 8a, 6, 5, 5a, 9



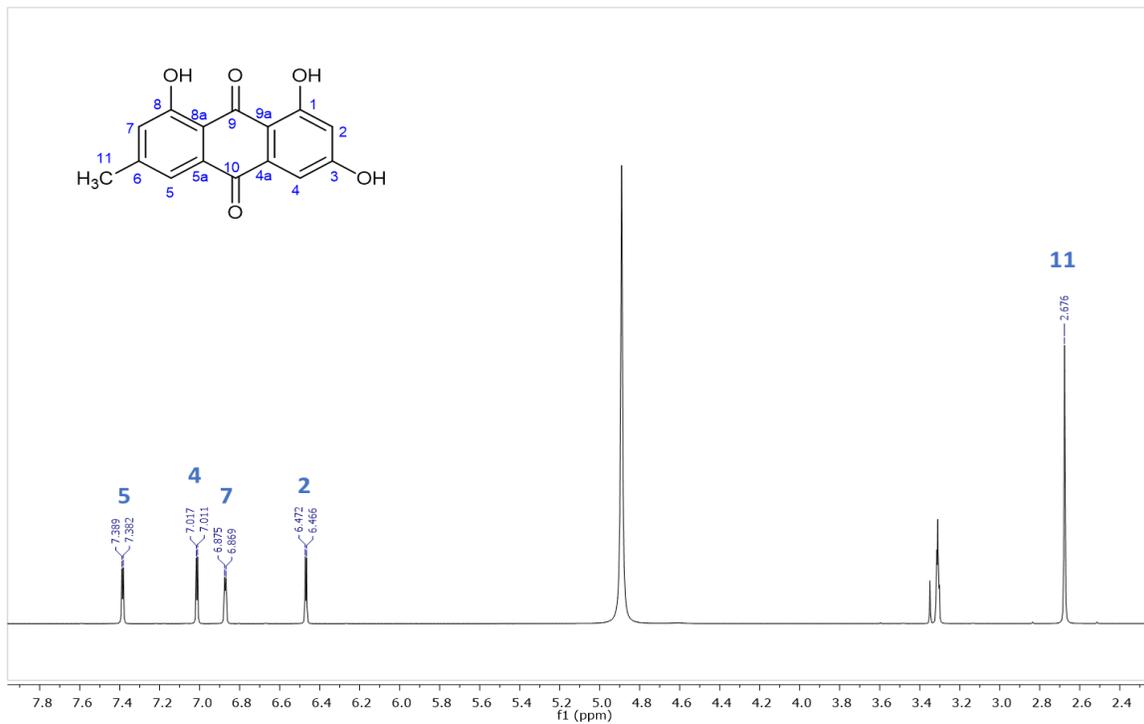


Figura 12. Espectro de  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de (2).

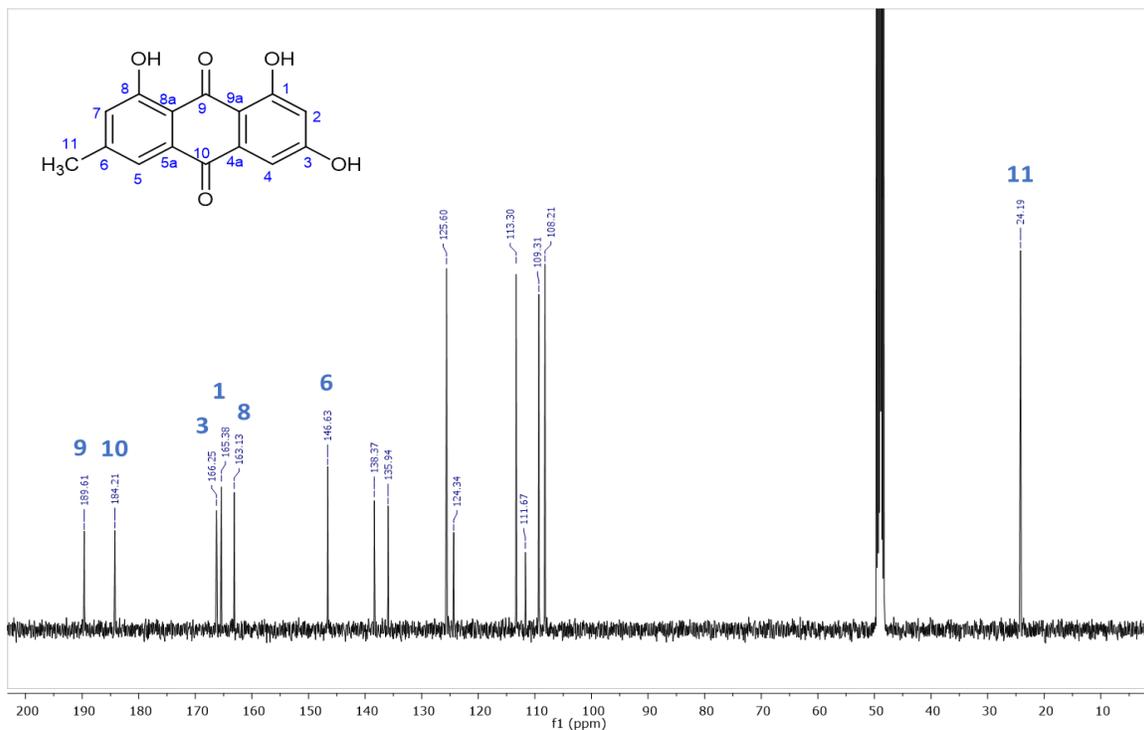


Figura 13. Espectro de  $^{13}\text{C-RMN}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de (2).

Estos dos compuestos son mayoritarios el extracto de acetona de la goma de Sonora. Por su parte el ácido 7-hidroxihexadecanoico (1) ya se había reportado en la especie *Tachardiella larrea*, sin embargo, es la primera vez que se reporta la presencia de emodina (2) en el género *Tachardiella*, y en la especie *T. fulgens*.

De acuerdo con la información disponible en la literatura, hay una cantidad importante de estudios sobre la actividad farmacológica de la emodina, así como de diversos preparados tradicionales que la contienen, sobre todo, de plantas de la medicina tradicional china, como lo son *Rheum palmatum*, *Polygonum cuspidatum*, *Polygonum multiflorum*. La evidencia científica indica que esta antraquinona posee un amplio espectro de propiedades farmacológica, que incluye actividad anticancerígena, hepatoprotectora, neuroprotectora, antioxidante, antimicrobiana, antiviral, antialérgica y antidiabética; e inclusive, se sugirió que la emodina puede ser un valioso agente terapéutico para tratar enfermedades como la constipación, dermatitis, osteoartritis, aterosclerosis y Alzheimer. (Dong *et al.*, 2016)

Debido al enfoque de este trabajo, y a los antecedentes etnobotánicos de la goma de Sonora en el estado de Chihuahua, es destacable la información disponible sobre el efecto de la emodina en el tratamiento de la diabetes. En este sentido, se ha demostrado *in vitro*, que la emodina tiene una alta afinidad por PPAR $\gamma$  induciendo un incremento en la captación de glucosa, y la expresión de mRNA para GLUT1 y GLUT4, en adipocitos diferenciados 3T3-L1 (Yang *et al.*, 2007). Mientras que *in vivo*, se encontró que la emodina disminuye de los síntomas en ratones diabéticos inducidos con STZ, a través de la activación de receptores PPAR $\gamma$  (Xue, Ding y Liu, 2010). Otros autores, han señalado que el efecto de la emodina sobre el metabolismo de la glucosa se debe a la activación de la cinasa activada por AMP (AMPK, por sus siglas en inglés), lo que favorece la glicólisis (Chen *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015). También se ha demostrado que la administración de emodina a largo plazo, aumenta la

tolerancia a la glucosa, disminuye la hiperglicemia y aminora otros desórdenes, como la disfunción renal y la albuminuria, en animales con diabetes inducida por STZ; por lo que este compuesto es tiene un rol potencial en el tratamiento de la neuropatía diabética también. (Wang *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015)

Toda esta información sobre los efectos farmacológicos de la emodina, además de su alto contenido en la goma de Sonora, sugieren que es el principio activo de la laca, y por lo tanto, justifica los efectos gastroprotectores y antidiabéticos señalados por los habitantes originarios y actuales de las zonas desérticas de México. Sin embargo, no se puede descartar que otros metabolitos secundarios puedan contribuir a su actividad farmacológica.

## 5.2. Análisis de la composición de diversas fracciones del extracto de acetona de la goma de Sonora por CG-EM

Para continuar con la caracterización del contenido de la laca, se analizaron las diversas fracciones primarias (GS1-GS5), y secundarias y terciarias obtenidas a partir de los fraccionamientos mediante CCA, descritos en la sección anterior. La identificación se llevó a cabo por comparación de los espectros de masas de los picos de cada fracción con los disponibles en la base de datos del NIST, considerándose solo aquellos que presentaran un valor de similitud mayor a 900. Adicionalmente, se compararon los índices de Kovats obtenidos experimentalmente con los disponibles en la literatura para los compuestos señalados. Derivado de este análisis se logró identificar 19 compuestos (**Tabla 3**), en su mayoría ácidos grasos y aldehídos.

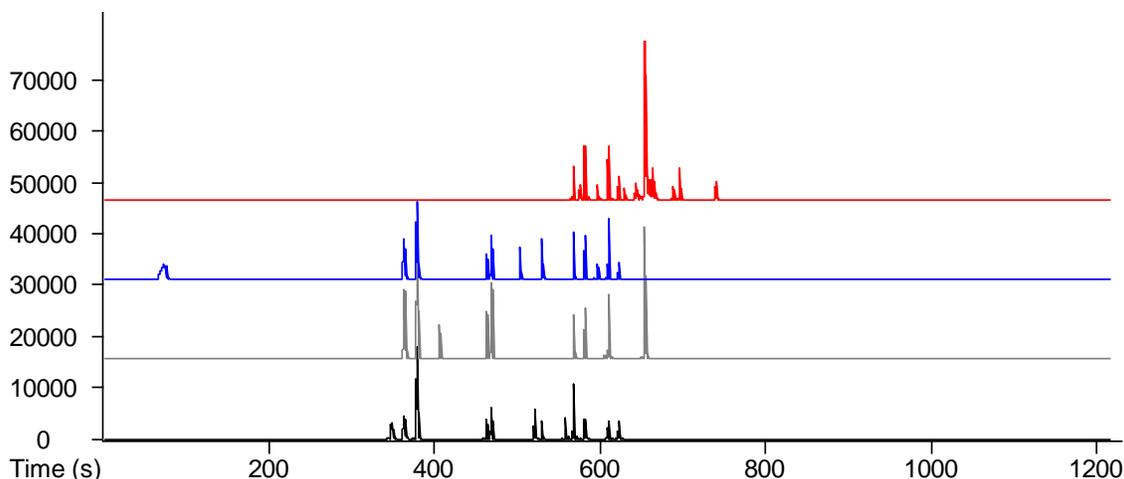
Estos datos concuerdan con las bandas características de IR para los grupos funcionales señalados por Bisulca y colaboradores (2017) en sus análisis de la laca de *T. fulgens*.

**Tabla 3.** Compuestos de la goma de Sonora identificados por CG-EM

No.	Nombre	IR	Similitud
1	Ácido hexanoico	978	947
2	Octanal	985	924
3	Lactona lavanda	1020	931
4	Ácido heptanoico	1073	901
5	Nonanal	1090	952
6	Ácido octanoico	1163	941
7	Decanal	1185	948
8	2-Decenal	1241	947
9	Ácido nonanoico	1254	945
10	2-Undecenal	1342	910
11	Ácido n-decanoico	1345	902
12	Ácido dodecanoico	1537	910
13	Ácido azelaico	1649	948
14	Metil éster del ácido tridecanoico	1693	917
15	Ácido tetradecanoico	1762	902
16	Ácido n-hexadecanoico	1955	924
17	Metil éster del ácido 9-octadecenoico	2065	939
18	Ácido 9-octadecinoico	2185	902
19	Ácido eicosanoico	2327	926

### 5.3. Análisis de los compuestos volátiles de la goma de Sonora

Continuando con la caracterización química de los compuestos en la goma de sonora, se utilizó la técnica de microextracción en fase sólida en el espacio de cabeza (MEFS-EC), con el posterior análisis por CG-EM de los compuestos adsorbidos en cada una de las cuatro fibras utilizadas (**Figura 14**).



**Figura 14.** Cromatogramas de iones totales obtenidos CG-EM de los compuestos volátiles presentes en la goma de Sonora obtenidos por la técnica de MEFS-EC. Cada cromatograma corresponde a una fibra diferente de MEFS: PDMS, 100  $\mu\text{m}$  (rojo); PDMS/DVB, 65  $\mu\text{m}$  (azul); DVB/ Carboxen/PDMS, 50/30  $\mu\text{m}$  (gris); Carboxen/PDMS, 75 $\mu\text{m}$  (negro). Cada análisis se llevó a cabo por triplicado.

Los análisis de los componentes volátiles de la goma de Sonora revelaron un total de 24 compuestos, de los cuales se lograron identificar únicamente 16 (**Tabla 4**). Los metabolitos se identificaron por comparación con el espectro de masas y el índice de retención disponibles en la biblioteca del NIST. Las diferencias en los porcentajes de composición en cada una de las fibras difieren por la afinidad de los compuestos con los diferentes recubrimientos de estas.

Los compuestos volátiles mayoritarios identificados mediante las técnicas de MEFS-EC/CG-EM son la  $\gamma$ -vinil- $\gamma$ -valerolactona, aldehído lila,  $\alpha$ -curcumeno, nerolidol y tridecil acrilato. De los 16 compuestos identificados, únicamente la lactona lavanda se había identificado con los estudios de CG-EM descritos en el inciso anterior.

En resumen, las diferentes técnicas empleadas para la separación, aislamiento, y análisis de la goma de Sonora, permitieron la identificación de un total de 36 compuestos, de los cuales los mayoritarios son el ácido 7-hidroxihexadecanoico y la emodina.

**Tabla 4.** Compuestos volátiles en la goma de Sonora.

No.	Compuestos	IR <sup>a</sup>	Similitud*	Composición (%)			
				PDMS 100 $\mu$ m	PDMS/ DVB 65 $\mu$ m	DVB/Carbox en/PDMS 50/30 $\mu$ m	Carboxen/ PDMS 75 $\mu$ m
1	Desconocido	636	–	–	10.04	–	–
2	Prenilacetona	972	901	–	–	–	8.86
3	m-Diclorobenceno	993	938	–	8.10	7.16	0.74
4	Lactona lavanda	1021	931	–	20.75	30.10	11.56
5	Aldehído lila	1182	714	–	9.02	5.27	3.50
6	Desconocido	1192	–	–	14.82	6.70	10.5
7	Desconocido	1193	–	–	–	–	10.5
8	Safrol	1270	903	–	8.35	4.96	–
9	Desconocido	1312	–	–	–	–	31.45
10	Desconocido	1333	–	–	5.45	5.40	2.51
11	$\alpha$ -Cedreno	1398	893	–	–	–	2.58
12	Desconocido	1425	–	1.96	7.57	13.71	2.90
13	1-Undecanol	1444	927	10.76	–	–	–
14	$\alpha$ -Curcumeno	1460	912	11.78	4.65	11.37	5.37
15	$\beta$ -Sesquifelandreno	1502	895	10.31	2.82	–	–
16	Nerolidol	1536	901	7.66	7.84	5.46	5.11
17	Pentanoic acid, 2,2,4-trimethyl-3-carboxyisopropyl, isobutyl ester	1568	851	2.27	0.58	–	4.42
18	$\beta$ -cedren-9- $\alpha$ -ol	1589	818	13.84	–	–	–
19	Éter caprílico	1629	939	1.86	–	–	–
20	Tridecil acrilato	1660	920	19.92	–	14.83	–
21	Desconocido	1665	--	1.42	–	–	–
22	Metil tridecanoato	1690	928	0.47	–	–	–
23	Desconocido	1764	---	11.42	–	–	–
24	Isopropil miristato	1787	874	2.53	–	–	–
	<b>% Total identificado</b>			<b>81.4</b>	<b>62.1</b>	<b>79.2</b>	<b>45.1</b>

## 6. CONCLUSIONES

---

- Se logró la identificación de un total de 36 compuestos en la goma de Sonora. La mayoría de estos compuestos consisten en ácidos grasos, aldehídos y alcanos de cadena larga.
- Se identificaron 16 compuestos del volatilo de la goma de Sonora, siendo los compuestos más abundantes la  $\gamma$ -vinil- $\gamma$ -valerolactona, aldehído lila,  $\alpha$ -curcumeno, nerolidol y tridecil acrilato.
- Se encontró que los compuestos mayoritarios de la goma de Sonora son el ácido 7-hidroxihexadecanoico y la emodina.
- De acuerdo con los diversos reportes sobre la actividad farmacológica de la emodina, se propone que esta es el principio activo de la goma de Sonora, y responsable de las actividades gastroprotectoras y antidiabéticas atribuidas al exudado.
- Como perspectivas de este trabajo, se sugiere continuar con la caracterización química de sus constituyentes, así como con las pruebas biológicas adecuadas para establecer su eficacia preclínica. En este sentido, la comparación de la composición química de la laca con la de la planta hospedera, *Coursetia glandulosa*, es de interés también para establecer una relación con la producción del insecto de metabolitos secundarios con propiedades medicinales.

## 7. REFERENCIAS

---

- Bisulca, C., Pool, M. and Odegaard, N. (2017) 'A survey of plant and insect exudates in the archaeology of Arizona', *Journal of Archaeological Science*, 15, 272–281. doi: 10.1016/j.jasrep.2017.07.031.
- Bose, P. K., Sankaranarayanan, Y. and Sen Gupta, S. C. (1963) *Chemistry of lac*. Namkum Bihar: Indian Lac Research Institute.
- Chen, T. *et al.* (2015) 'Emodin ameliorates high glucose induced-podocyte epithelial-mesenchymal transition in-vitro and in-vivo', *Cellular Physiology and Biochemistry*, 35(4), 1425–1436. doi: 10.1159/000373963.
- Chen, Z. *et al.* (2012) 'Promotion of adiponectin multimerization by emodin: a novel AMPK activator with PPAR $\gamma$ -agonist activity', *Journal of cellular biochemistry*, 113(11), 3547–3558. doi: 10.1002/JCB.24232.
- Cockerell, T. (1985) 'New North American Coccidae', *Psyche*, (Suppl 7), pp. 1–4.
- Dong, X. *et al.* (2016) 'Emodin: A Review of its Pharmacology, Toxicity and Pharmacokinetics', *Phytotherapy*, 30(8), 1207–1218. doi: 10.1002/PTR.5631.
- Felger, R. S. *et al.* (2015) 'Ajo Peak to Tinajas Altas: a Flora of Southwestern Arizona. Part 16. Eudicots: Malpighiaceae to Moraceae', *Phytoneuron*, 60, 1–54.
- Fournier García, P. and Mondragón Barrios, L. (2012) '*Las bebidas mexicanas. Pulque, mezcal y tesgüino*', *Arqueología Mexicana*, (114), pp. 53–59.
- Fox, A., Heron, C. and Sutton, M. Q. (1995) 'Characterization of Natural Products on Native American Archaeological and Ethnographic Materials From the Great Basin Region, U.S.a.: a Preliminary Study', *Archaeometry*, 37(2), 363–375. doi: 10.1111/j.1475-4754.1995.tb00749.x.

- Kondo, T. and Gullan, P. J. (2011) 'Taxonomic Review of the Genus Tachardiella Cockerell (Hemiptera: Kerriidae), with a Key to Species of Lac Insects Recorded from the New World', *Neotropical Entomology*, 40(1923), 345–367.
- Mills, J. and White, R. (2012) *The Organic Chemistry of Museum Objects*, Organic Chemistry of Museum Objects. Routledge. doi: 10.4324/9780080513355.
- Rzedowski, J. *et al.* (2016) *Flora del Bajío Y de Regiones Adyacentes*. Michoacán, México: Instituto de Ecología A.C. doi: 10.2967/jnumed.114.140343.
- Shamim, G. *et al.* (2016) 'Genes involved in the biosynthesis of Lac Dye constituents in Indian Lac Insect, *Kerria lacca* (Kerr)', *Journal of the Entomological Research Society*, 18(1), 7–17.
- Song, P. *et al.* (2013) 'Emodin regulates glucose utilization by activating AMP-activated protein kinase', *The Journal of biological chemistry*, 288(8), 5732–5742. doi: 10.1074/JBC.M112.441477.
- Sutton, M. Q. (1990) 'Notes on Creosote Lac Scale Insect Resin as a Mastic and Sealant in the Southwestern Great Basin on JSTOR', *Journal of California and Great Basin Anthropology*, 12(2), 262–268.
- Wang, J. *et al.* (2006) 'Inhibition of phosphorylation of p38 MAPK involved in the protection of nephropathy by emodin in diabetic rats', *European journal of pharmacology*, 553(1–3), 297–303. doi: 10.1016/J.EJPHAR.2006.08.087.
- Wu, Z. *et al.* (2014) 'Emodin protects against diabetic cardiomyopathy by regulating the AKT/GSK-3 $\beta$  signaling pathway in the rat model', *Molecules*, 19(9), 14782–14793. doi: 10.3390/MOLECULES190914782.
- Xue, J., Ding, W. and Liu, Y. (2010) 'Anti-diabetic effects of emodin involved in the activation of PPAR $\gamma$  on high-fat diet-fed and low dose of

- streptozotocin-induced diabetic mice', *Fitoterapia*, 81(3), 173–177. doi: 10.1016/J.FITOTE.2009.08.020.
- Yang, Y. et al. (2007) 'Emodin with PPAR $\gamma$  ligand-binding activity promotes adipocyte differentiation and increases glucose uptake in 3T3-L1 cells', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 353(2), 225–230. doi: 10.1016/J.BBRC.2006.11.134.
- Zhang, X. et al. (2015) 'Emodin up-regulates glucose metabolism, decreases lipolysis, and attenuates inflammation in vitro'. *Journal of Diabetes*, 7(3), 360–368. doi: 10.1111/1753-0407.12190.

## ANEXO II

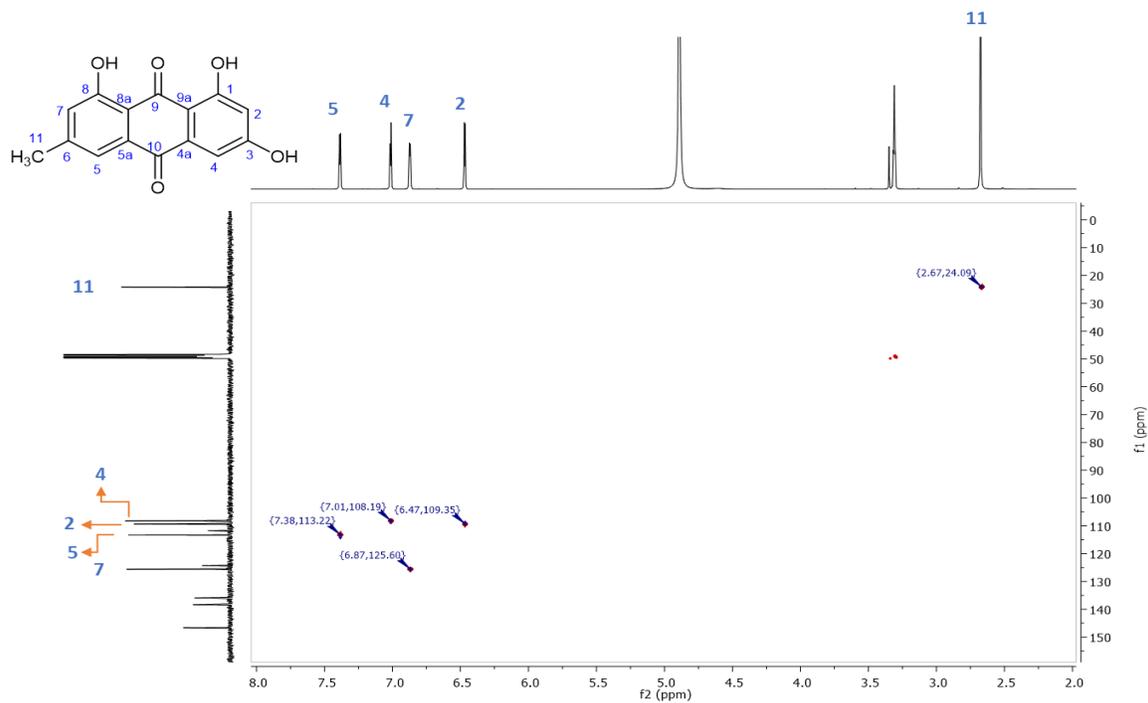


Fig. 1. Experimento de HSQC-del compuesto (2).

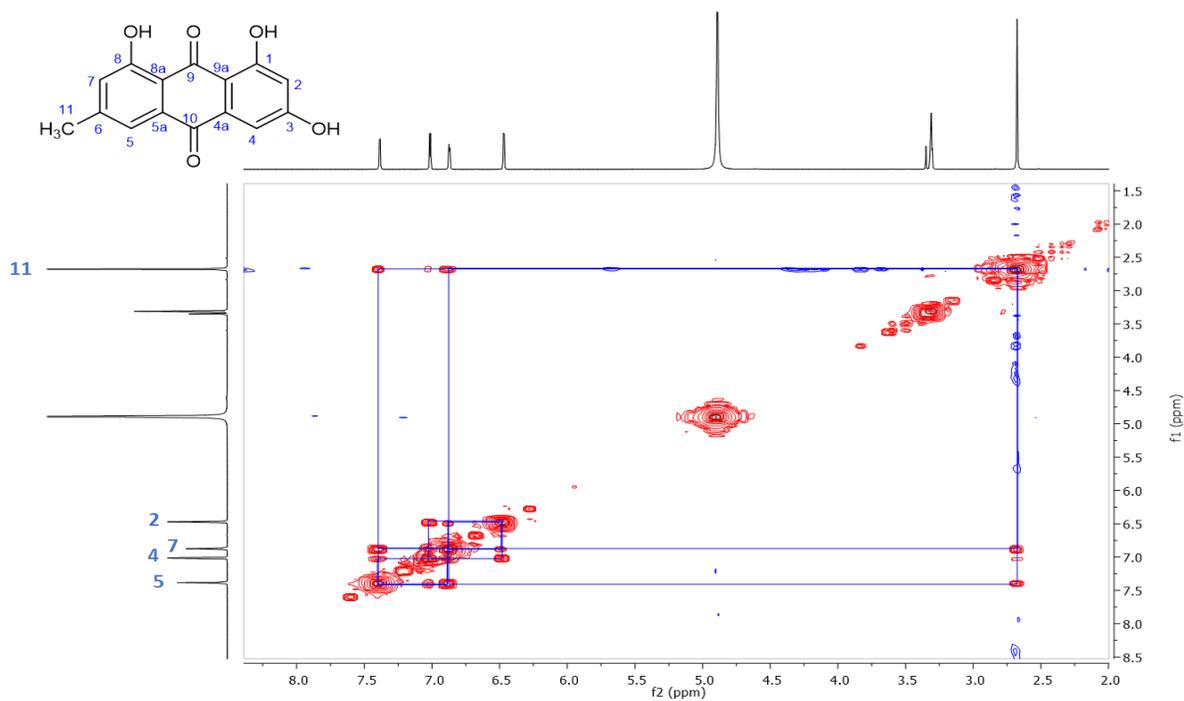


Fig. 2. Experimento COSY-del compuesto (2).

CAPÍTULO II

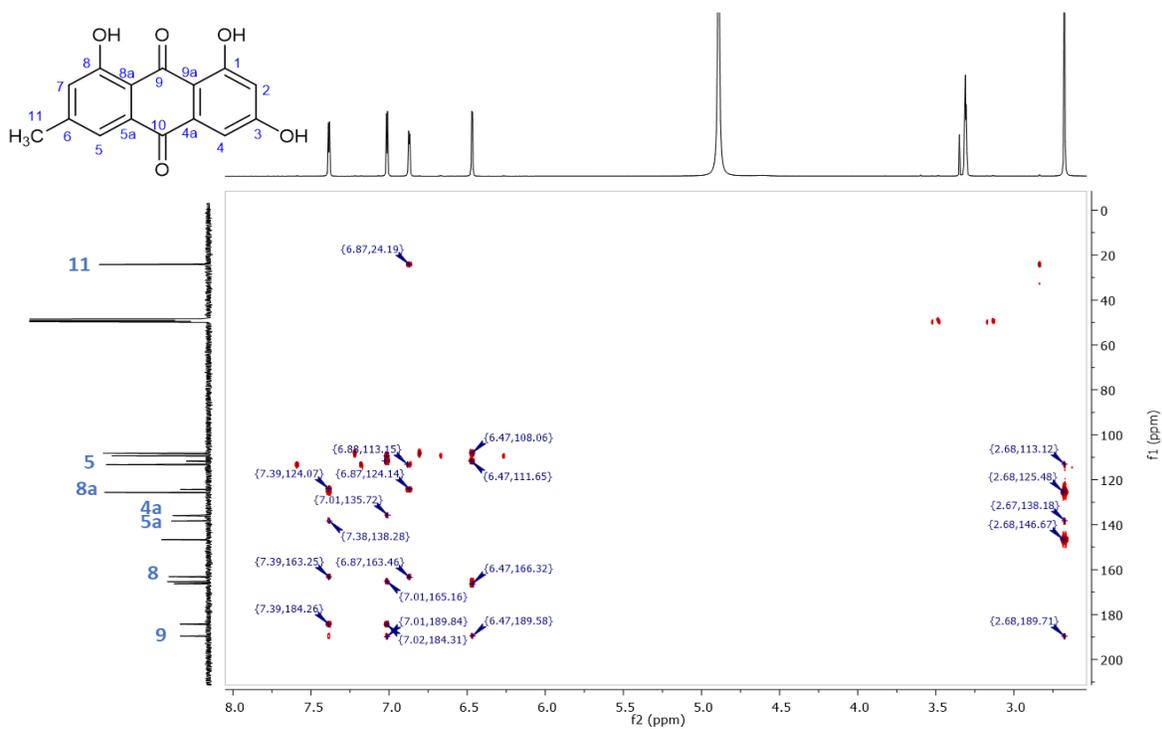


Fig. 3. Experimento HMBC-del compuesto (2).

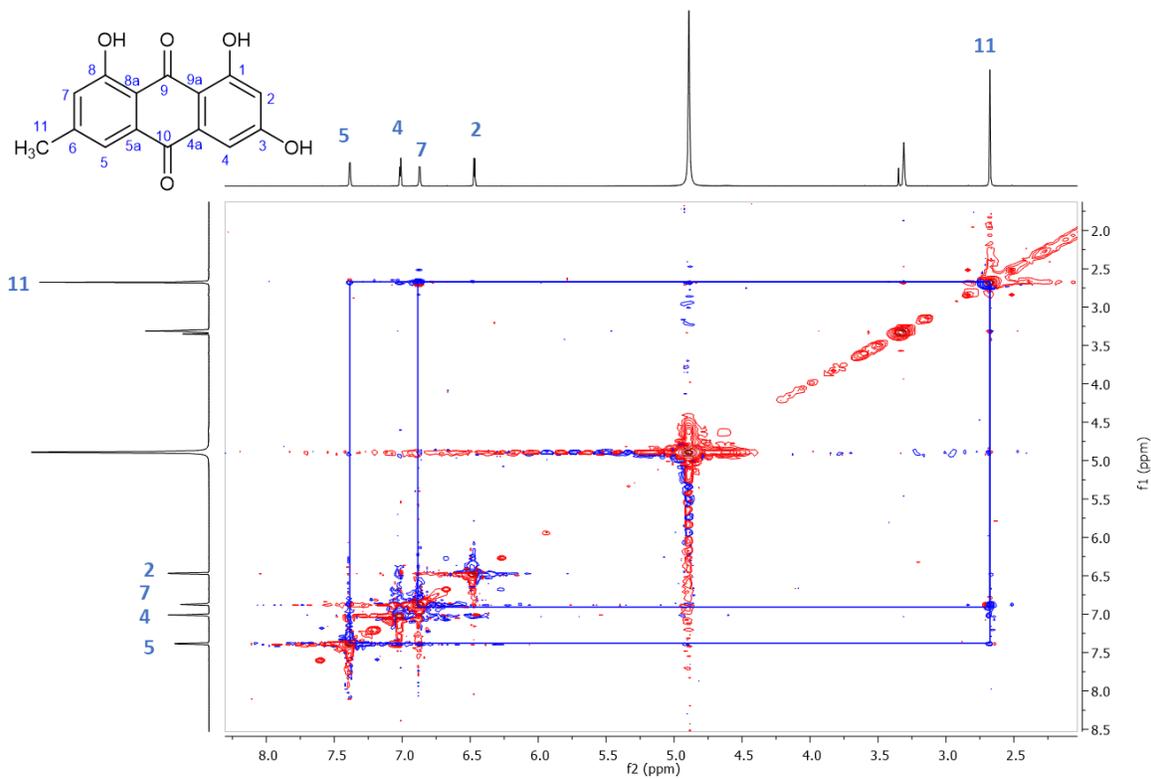


Fig. 4. Experimento NOESY-del compuesto (2).

# Pharmacological Analysis of the Anti-inflammatory and Antiallodynic Effects of Zinagrandinolide E from *Zinnia grandiflora* in Mice

Valeria Itzel Reyes-Pérez, Vinicio Granados-Soto, Manuel Rangel-Grimaldo, Myrna Déciga-Campos,\* and Rachel Mata\*



Cite This: *J. Nat. Prod.* 2021, 84, 713–723

Read Online

ACCESS |



Metrics & More

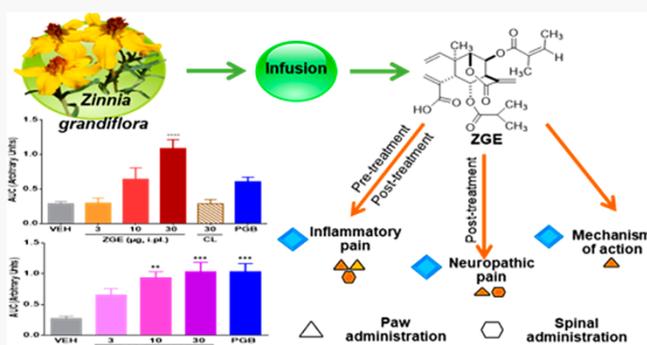


Article Recommendations



Supporting Information

**ABSTRACT:** Zinagrandinolide E (**1**, ZGE) is an elemanolide with antinociceptive action isolated from *Zinnia grandiflora* (Asteraceae), valued in North México and southwestern United States for pain relief. Herein, we report the anti-inflammatory and antiallodynic action of ZGE (**1**) in carrageenan-induced inflammation and tactile allodynia in mice and in a neuropathic pain model in hyperglycemic mice. Local peripheral administration of ZGE (1–30  $\mu\text{g}/\text{paw}$ ) induced dose-dependent acute anti-inflammatory and antiallodynic effects. The anti-inflammatory effect was comparable to diclofenac (30  $\mu\text{g}/\text{paw}$ ). Intrathecal (i.t.) administration of ZGE (30  $\mu\text{g}$ ) in acute experiments did not affect carrageenan-induced inflammation but significantly reduced tactile allodynia in a dose-dependent fashion. In long-term experiments (15 or 6 days), using two different scheme treatments (pretreatment or post-treatment), ZGE (3–30  $\mu\text{g}/\text{paw}$ ) showed antiallodynic but not anti-inflammatory action. Local peripheral (3–30  $\mu\text{g}/\text{paw}$ ) or intrathecal (3–30  $\mu\text{g}$ ) administration of ZGE partially reversed tactile allodynia in hyperglycemic mice, better or comparable, respectively, with those of pregabalin (30  $\mu\text{g}/\text{paw}$  or 30  $\mu\text{g}$  i.t.). The effects were dose-dependent. According to the pharmacological tools employed, the anti-inflammatory and antiallodynic activities of ZGE are multitarget; these involve the opioidergic, serotonergic, and GABAergic systems, as well as the NO-cGMP-ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channel signaling pathway.



*Zinnia grandiflora* Nuttall (Asteraceae), the Rocky Mountains zinnia, is a medicinal plant that grows in northern Mexico and southwestern United States. The Navajo, Ramah Navajo, Zuni, and Acoma and Laguna indigenous groups use infusions of this plant for treating painful conditions. In addition, cataplasms of the plant are useful remedy for strokes and bruises.<sup>1,2</sup> This species biosynthesizes  $\delta$ -elemanolide sesquiterpene lactones, including zinagrandinolides A–F.<sup>3,4</sup> Zinagrandinolides A–C were cytotoxic against several cancer cell lines (NCI-H460, MCF-7, SF-268, and MIA PaCa-2) and a normal human fibroblast cell type (WI-38).<sup>3</sup>

During our studies to establish the preclinical efficacy of an infusion of *Z. grandiflora*, Zinagrandinolide E [ZGE] (**1**) was isolated as the major antinociceptive active principle of the traditional preparation.<sup>4</sup> This compound showed significant antinociceptive action in a formalin test in mice (3.16, 10, and 31.6 mg/kg, p.o.). The best antinociceptive effect was observed in the inflammatory phase.<sup>4</sup>

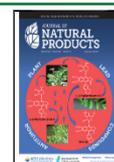
Continuing with our work on the potential anti-inflammatory and antinociceptive effects of ZGE (**1**), this work aimed to (i) establish the anti-inflammatory and antiallodynic action of ZGE (**1**) in carrageenan-induced inflammation and tactile

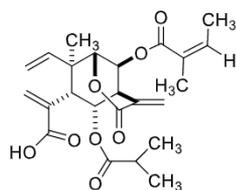
allodynia (pain due to a stimulus that does not normally provoke pain) in mice and in a neuropathic pain model in diabetic mice; (ii) determine the pharmacological mechanism of actions underlying these effects evaluating the participation of several receptors involved in the inflammatory pain induced by carrageenan in mice. This study contributes to a rationale for investigation beyond the ethnopharmacological use of *Z. grandiflora* and provides new lead molecules for pain pharmacotherapy. In this regard, it is important to emphasize that acute and chronic inflammatory pain are health problems around the world and the most common motive people search for medical care. Thus, any research intending to search for new effective analgesic drug leads is justified.<sup>5</sup>

**Special Issue:** Special Issue in Honor of A. Douglas Kinghorn

**Received:** July 16, 2020

**Published:** September 1, 2020





1

## RESULTS AND DISCUSSION

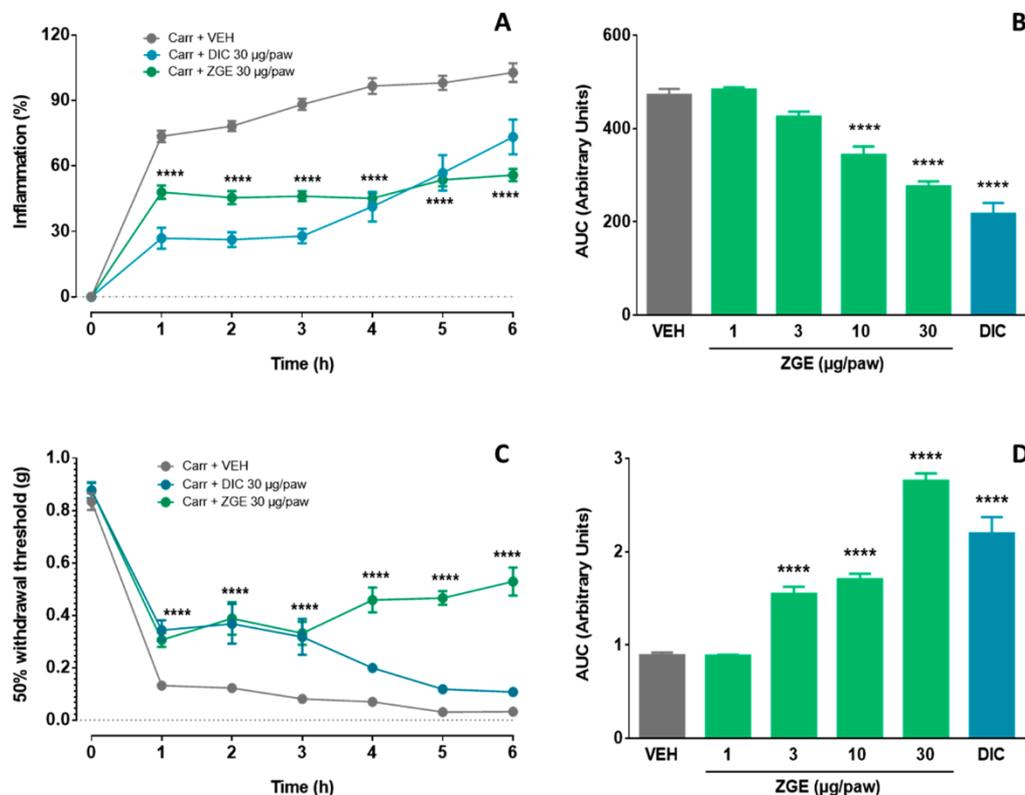
### Anti-inflammatory and Antiallodynic Effect of ZGE.

Carrageenan-induced paw edema in mice is a suitable laboratory model for the study of inflammation and nociception; the latter is detected as hyperalgesia (increased response to noxious stimuli) or allodynia (nociceptive response to normally innocuous stimuli).<sup>6</sup> In our experiments, carrageenan induced a time-dependent edema and tactile allodynia, with a maximal effect at the third hour (Figure 1A and C). Local peripheral pretreatment with ZGE (30  $\mu\text{g}/\text{paw}$ , 15 min) partially prevented carrageenan-induced inflammation ( $F_{5,253} = 203.2$ ,  $P < 0.0001$ , Figure 1A) and tactile allodynia ( $F_{5,248} = 112.5$ ,  $P < 0.0001$ ; Figure 1C). Diclofenac (30  $\mu\text{g}$ , ipl; 15 min), used as a positive control, also partially prevents edema and tactile allodynia in mice injected with carrageenan (Figure 1A and C). Thus, ZGE (1–30  $\mu\text{g}/\text{paw}$ ) induced dose-dependent anti-inflammatory ( $F_{5,33} = 56.20$ ,  $P < 0.0001$ , Figure 1B) and antiallodynic effects ( $F_{5,32} = 72.59$ ,  $P < 0.0001$ , Figure 1D). The maximal anti-inflammatory effect of ZGE (1) was

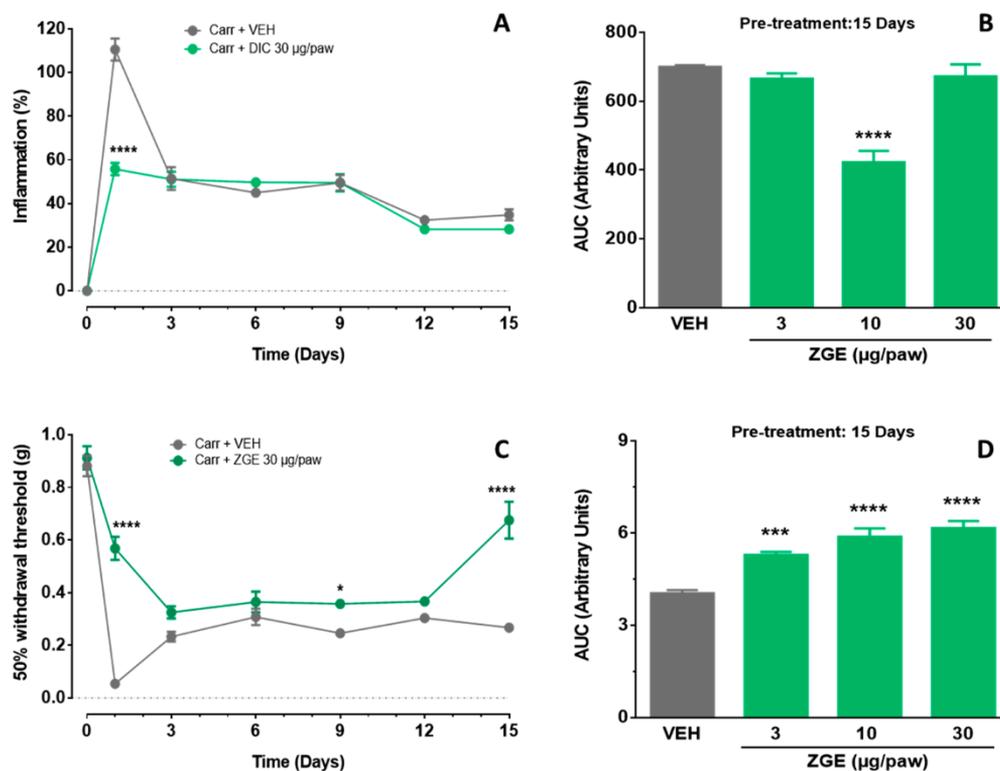
reached between 4 and 6 h. Diclofenac (30  $\mu\text{g}/\text{paw}$ ) provoked a greater anti-inflammatory effect than ZGE (Figure 1B), but its antiallodynic effect was lower (Figure 1D).

Next, we explored the anti-inflammatory and antiallodynic effect of ZGE after intrathecal (30  $\mu\text{g}$ ) administration. In this case, ZGE did not affect carrageenan-induced inflammation (Figure S5A and B, Supporting Information), but significantly reduced tactile allodynia ( $F_{3,175} = 36.93$ ,  $P < 0.0001$ , Figure S5C, Supporting Information). This antiallodynic effect was dose-dependent ( $F_{3,26} = 20.82$ ,  $P < 0.0001$ , Figure S5D, Supporting Information). Thus, ZGE has an antiallodynic effect at the spinal cord (Figure S13, Supporting Information). Interestingly, previous studies have demonstrated a lack of effect of intrathecal or systemic administration of some NSAIDs (ketorolac and ibuprofen) in humans on hyperalgesia and allodynia from topical capsaicin.<sup>7</sup> Therefore, it is important to continue searching for useful molecules that reduce pain produced by central sensitization due to acute inflammatory pain.

Carrageenan injection induces an acute inflammatory response with neutrophilic infiltration during the first week, and then a macrophage-dominated chronic inflammation occurs the following 8 weeks.<sup>6</sup> Therefore, in order to evaluate the effect of ZGE during a longer term, we performed two different sets of experiments. We delivered a single dose of ZGE (3, 10, and 30  $\mu\text{g}/\text{paw}$ ) and monitored the anti-inflammatory and antiallodynic effects during 15 days after carrageenan administration. The results revealed that local



**Figure 1.** Anti-inflammatory and antiallodynic effect of the local peripheral administration of zinagrandinolide E (ZGE) in the carrageenan-induced paw edema test. Panel A: Time course of the inflammation percentage. Panel B: AUC of the time course (inflammation percentage against time curve, AUC). Panel C: Time course of the 50% withdrawal threshold (g). Panel D: AUC of the temporal course (50% withdrawal threshold against time curve, AUC). VEH: DMSO 50% in saline. DIC: Diclofenac (30  $\mu\text{g}/\text{paw}$ ). Data are presented as the mean ( $n = 8$ )  $\pm$  SEM. Significantly different from vehicle values (VEH) (\*\*\*)  $P < 0.0001$ , as determined by two-way ANOVA, followed by the Bonferroni's *post hoc* test (panels A and C) or one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test (panels B and D).



**Figure 2.** Anti-inflammatory and antiallodynic effect during 15 days of the local peripheral pretreatment with zingrandinolide E (ZGE) in the carrageenan-induced paw edema test. Panel A: Time course of the inflammation percentage. Panel B: AUC of the time course (inflammation percentage against time curve, AUC). Panel C: Time course of the 50% withdrawal threshold (g). Panel D: AUC of the time course (50% withdrawal threshold against time curve, AUC). VEH: DMSO 50% in saline. Data are presented as the mean ( $n = 8$ )  $\pm$  SEM. Significantly different from vehicle values (VEH) ( $*P < 0.05$ ,  $***P < 0.001$ ,  $****P < 0.0001$ ), as determined by two-way ANOVA, followed by Bonferroni's *post hoc* test (panels A and C) or one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test (panels B and D).

peripheral pretreatment with ZGE did not affect carrageenan-induced inflammation when tested at 30 and 3  $\mu\text{g/paw}$  (Figure 2A). However, ZGE had a mild effect at 10  $\mu\text{g/paw}$  ( $F_{3,20} = 25.80$ ,  $P < 0.0001$ , Figure 2B). Local peripheral administration of ZGE induced a preventive long-lasting antiallodynic effect in a dose-dependent fashion (Figure 2C and D).

In the second set of experiments, mice were injected with carrageenan, and 6 days later they were treated with vehicle, ZGE (30  $\mu\text{g/paw}$ ), or diclofenac (30  $\mu\text{g/paw}$ ). In this case, local peripheral post-treatment with ZGE showed a trend to reverse carrageenan-induced inflammation, but it did not reach significance (Figure 3A and B). Likewise, diclofenac was not able to reverse inflammation induced by carrageenan (Figure 3A and B). In contrast, ZGE (30  $\mu\text{g/paw}$ ), but not diclofenac, partially reversed established tactile allodynia in mice ( $F_{2,143} = 37.58$ ,  $P < 0.0001$  and  $F_{2,20} = 13.24$ ,  $P < 0.001$ , Figure 3C and D). The differences between ZGE and diclofenac effects could be due to the mechanisms of action triggered by both compounds.

In summary, local peripheral administration of ZGE reduces only carrageenan-induced acute inflammation, as well as acute—also when administered intrathecally—and long-lasting allodynia. This finding is important because more than 50% of patients after surgery or trauma still have severe to intolerable pain. In most cases these post-trauma complaints become the primary need for medical treatment.<sup>5</sup> The antiallodynic effect demonstrated by ZGE in this work is consistent with its antinociceptive effect when tested orally in the formalin model in mice.<sup>4</sup> Altogether, these data suggest that ZGE is effective for treating and preventing inflammatory pain.

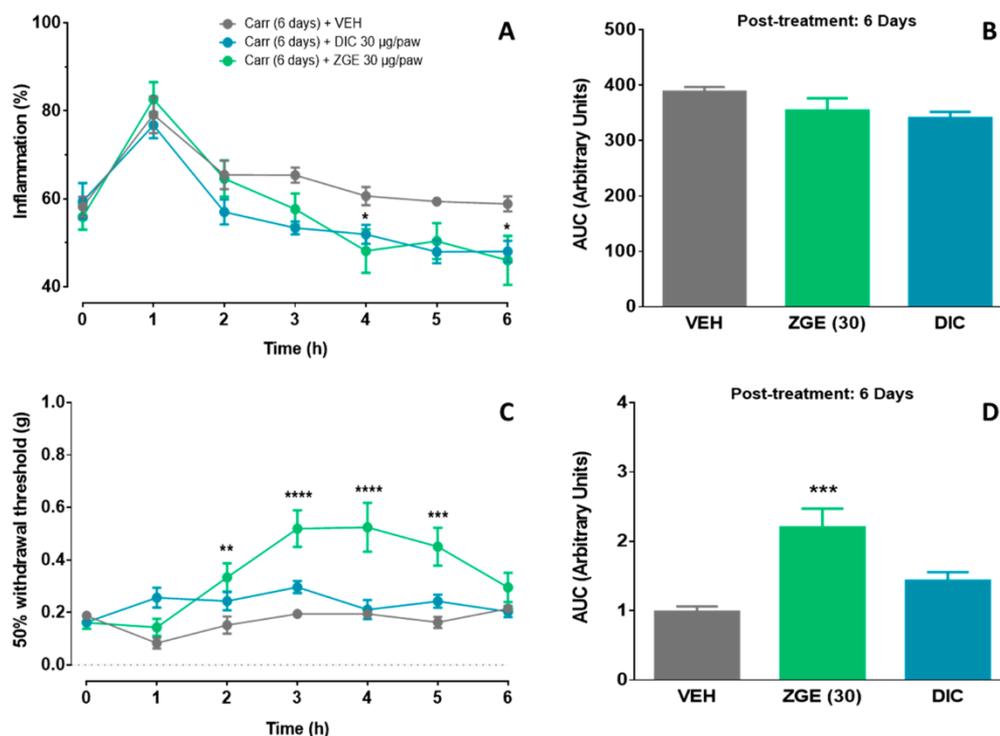
### Antiallodynic Effect of ZGE in Hyperglycemic Mice.

To determine whether ZGE is able to decrease neuropathic pain in hyperglycemic mice (streptozotocin, STZ, i.p., 150 mg/kg), we used two schemes of administration, local peripheral and intrathecal. Under these conditions, local peripheral administration of ZGE (30  $\mu\text{g/paw}$ ) partially reversed tactile allodynia in hyperglycemic mice ( $F_{4,209} = 29.24$ ,  $P < 0.0001$ , Figure 4A). Surprisingly, local peripheral treatment with pregabalin (30  $\mu\text{g/paw}$ ), a positive control for neuropathic pain, induced a lower antiallodynic effect than that of ZGE (Figure 4A). The antiallodynic effect of ZGE (3–30  $\mu\text{g/paw}$ ) was dose dependent ( $F_{4,30} = 10.08$ ,  $P < 0.0001$ , Figure 4B).

Intrathecal administration of ZGE (30  $\mu\text{g}$ ) partially reversed tactile allodynia in hyperglycemic mice ( $F_{4,224} = 15.21$ ,  $P < 0.0001$ , Figure 4C). Spinal treatment with pregabalin (30  $\mu\text{g}$ ) induced a similar antiallodynic effect to that of ZGE (Figure 4C). The antiallodynic effect of spinal ZGE (3–30  $\mu\text{g}$ ) was dose dependent ( $F_{4,31} = 7.096$ ,  $P < 0.001$ , Figure 4D). These data indicate that ZGE is effective to reverse neuropathic pain in hyperglycemic mice and probably in diabetic mice *sensu stricto*.

Based on our observations, ZGE may exert its antiallodynic effect by reducing aberrant activation of peripheral and spinal NMDA receptors,<sup>8</sup> restoring GABAergic spinal disinhibition<sup>9</sup> or by unknown mechanisms.

**Mechanisms of Action of ZGE.** To devise the mechanism of action of ZGE as an inflammatory-pain-reducing agent, we investigated the participation of opioidergic, serotonergic, and GABAergic pathways using the carrageenan-induced inflammatory pain in mice. For that, mice were treated initially



**Figure 3.** Anti-inflammatory and antiallodynic effect of the local peripheral administration of zinagrandinolide E (ZGE) after 6 days of carrageenan injection (post-treatment). Panel A: Temporal course of the inflammation percentage. Panel B: AUC of the time course (inflammation percentage against time curve, AUC). Panel C: Time course of the 50% withdrawal threshold (g). Panel D: AUC of the temporal course (50% withdrawal threshold against time curve, AUC). VEH: DMSO 50% in saline. DIC: Diclofenac (30  $\mu$ g/paw). Each measurement represented as the mean ( $n = 8$ )  $\pm$  SEM. Significantly different from vehicle values (VEH) (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ), as determined by two-way ANOVA, followed by Bonferroni's *post hoc* test (panels A and C) or one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test (panels B and D).

with naloxone (5 and 50  $\mu$ g/paw), methiothepin (0.03 and 0.3  $\mu$ g/paw), or flumazenil (6 and 30  $\mu$ g/paw), respectively. In addition, the NO-cyclic GMP- $K^+$ <sub>ATP</sub> channel cascade was investigated by pretreating animals with NG-L-nitro-arginine methyl ester (L-NAME) (15 and 150  $\mu$ g/paw), 1-*H*-[1,2,4]-oxodiazolo[4,3-*a*]quinoxalin-1-one (ODQ) (7.5 and 75  $\mu$ g/paw), or glibenclamide (10 and 100  $\mu$ g/paw). In all cases, after the administration of the antagonists, the animals received the most active dose of ZGE (30  $\mu$ g/paw) found in this work (Figure 1).

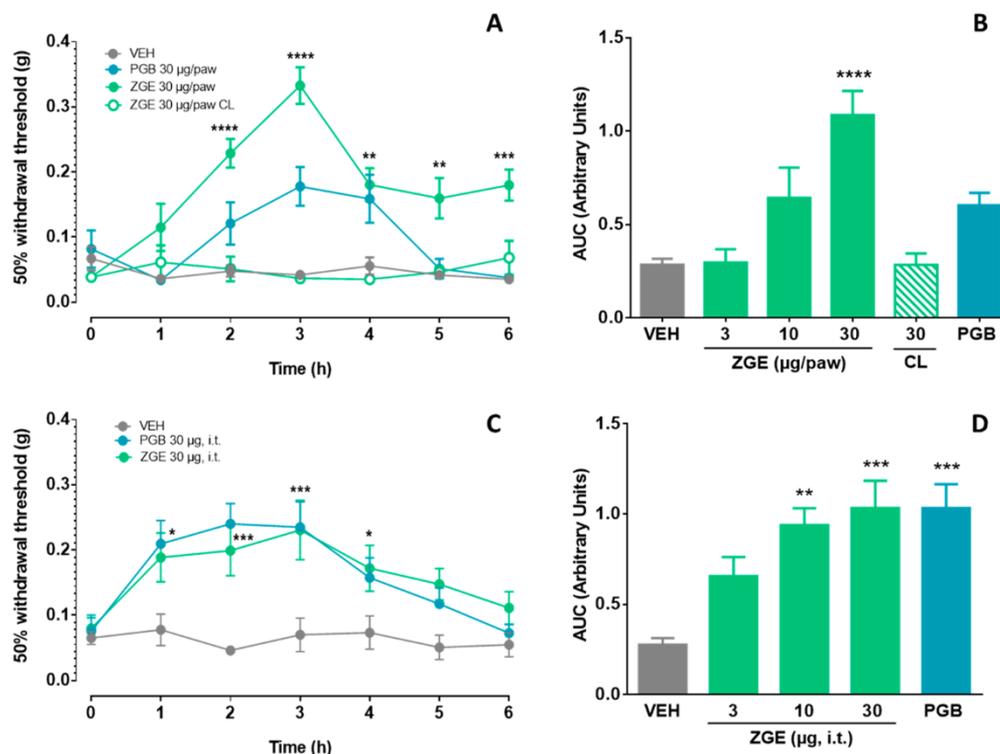
The results revealed that local peripheral administration of naloxone (inflammation:  $F_{4,31} = 80.92$ ,  $P < 0.0001$ , Figure 5A; allodynia:  $F_{4,31} = 329.5$ ,  $P < 0.0001$ , Figure 5B), methiothepin (inflammation:  $F_{4,31} = 62.60$ ,  $P < 0.0001$ , Figure 5C; allodynia:  $F_{4,31} = 143.2$ ,  $P < 0.0001$ , Figure 5D), or flumazenil (inflammation:  $F_{4,30} = 55.85$ ,  $P < 0.0001$ , Figure 5E; allodynia:  $F_{4,30} = 58.92$ ,  $P < 0.0001$ , Figure 5F), prevented the anti-inflammatory and antiallodynic effects of ZGE (30  $\mu$ g/paw) in a dose-dependent fashion, suggesting the participation of the opiodergic, serotonergic, and GABAergic systems, respectively. These receptor antagonists administered alone did not produce any effect on carrageenan-induced inflammation and tactile allodynia (Figure 5).

There is mounting evidence that opiodergic, serotonergic, and GABAergic pathways lead to antinociception in several pain models in rodents.<sup>10</sup> Interestingly, we observed that local peripheral administration of naloxone (a nonselective opioid receptor antagonist), methiothepin (a 5-HT<sub>1/2/5/6/7</sub> receptor antagonist<sup>11</sup>), or flumazenil (a GABA<sub>A</sub> receptor antagonist<sup>12</sup>) dose-dependently prevented the anti-inflammatory and antiallodynic effect of ZGE. These data suggest that ZGE induced

its effect by activating peripheral opioid, 5-HT, and GABA<sub>A</sub> receptors.

Naloxone has affinity for  $\mu$  (pK<sub>i</sub> 9),  $\delta$  (pK<sub>i</sub> 7.8), and  $\kappa$  (pK<sub>i</sub> 7.8–8) receptors.<sup>13</sup> Then, our data suggest that all opioid receptors participate in the peripheral anti-inflammatory and antiallodynic effect of ZGE. Since there are  $\mu$  receptors in the peripheral terminals of nociceptors, which play an important role in antinociception, they could be preferentially involved in the action of ZGE.<sup>14</sup>

In order to predict the selectivity of ZGE on  $\delta$ -,  $\kappa$ -, and  $\mu$ -opioid receptors, we use molecular docking. The computational study was carried out using their crystallized structures with pdb code 6PT3,<sup>15</sup> 6VI4,<sup>16</sup> and 5C1M,<sup>17</sup> respectively. The docking results predicted that ZGE binds to  $\delta$ -,  $\kappa$ -, and  $\mu$ -opioid receptors with a similar binding energy (−7.5, −7.4, and −7.6 kcal/mol, respectively); in comparison, naloxone, used as a control, showed binding energies of −8.4, −8.9, and −7.9 kcal/mol, respectively, for each receptor. The main interactions between ZGE and the  $\delta$ -opioid receptor were with the residues of the active site, which include Gln105, Asp128, Tyr129, Met132, Val281, and Ile304. Other hydrophobic interactions comprised Trp274, Ile277, Phe280, Leu300, Cys303, Gly307, and Tyr308 (Figure 6A).<sup>18</sup> For the  $\kappa$ -opioid receptor, ZGE primarily interacts with hydrophobic residues such as Phe114, Val118, Tyr119, Trp124, Val134, Leu135, Ile137, Tyr139, Cys210, Ile290, Tyr312, Tyr313, Ile316, and Tyr320. The interactions with the conserved residues Gln115, Asp138, and Tyr139 were important for the recognition of substrates (Figure 6B).<sup>19</sup> Finally, the docking study of compound ZGE with  $\mu$  opioid receptor revealed interactions with the major residues in the active site, Asp147, Tyr148, Met151, Val300,



**Figure 4.** Antiallodynic effect of zingrandinoid E (ZGE) in a neuropathic pain model in mice. Panel A: Time course of the local peripheral administration. Panel B: AUC of the time course (50% withdrawal threshold against time curve, AUC). VEH: DMSO 50% in saline. PGB: Pregabalin (30  $\mu\text{g/paw}$ ). Panel C: Time course of the intrathecal administration of ZGE. Panel D: AUC of the time course (50% withdrawal threshold against time curve, AUC). VEH: DMSO 60% in saline. PGB: Pregabalin (30  $\mu\text{g, i.t.}$ ). Data are the mean ( $n = 8$ )  $\pm$  SEM. Significantly different from vehicle values (VEH) (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ), as determined by two-way ANOVA, followed by the Bonferroni's *post hoc* test (panels A and C) or one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test (panels B and D).

Ile322, and Tyr326. Tyr148 is important for small-molecule recognition.<sup>18</sup> Other interactions involved residues Gln124, Val143, Ile144, Lys233, Ile296, Lys303, and Trp318 (Figure 6C). ZGE adopts a similar orientation and shares several essential receptor–ligand interactions as naloxone and some agonists. Thus, ZGE behaved as a nonselective opioid agonist *in silico* (Figure S6 and Table S2, Supporting Information).

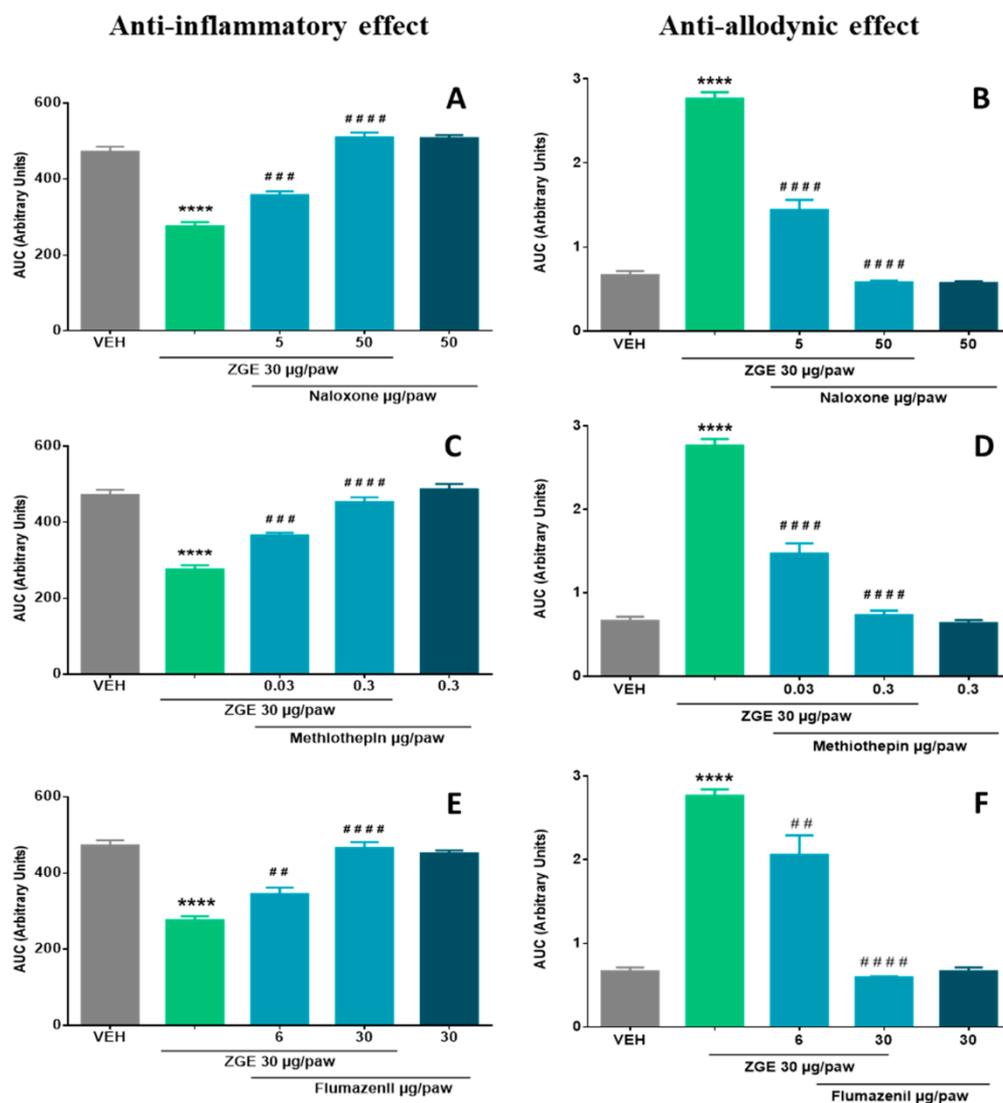
Regarding the serotonergic mode of action, previous studies showed that peripheral 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, and 5-HT<sub>7</sub> receptors have a pronociceptive effect, whereas peripheral 5-HT<sub>1</sub> (methiothepin affinity  $pK_i$  6.2–8.1) and 5-HT<sub>5A</sub> (methiothepin affinity  $pK_i$  7.5) receptors play an antinociceptive role.<sup>20–22</sup> Therefore, ZGE could activate any of the peripheral 5-HT<sub>1</sub> and 5-HT<sub>5A</sub> receptors.

Considering that the 5-HT<sub>1B</sub> (pdb code 4IAR) receptor structure is crystallized,<sup>23</sup> we carried out a docking analysis; the results predicted that ZGE binds to the active site of 5-HT<sub>1B</sub> (−8.2 kcal/mol) with higher affinity than the antagonist methiothepin (−7.7 kcal/mol) (Table S2, Supporting Information). The binding pocket comprises Tyr109, Trp115, Cys122, Trp125, Leu126, Cys199, Val200, Val201, Phe330, Met337, Phe351, Asp352, Phe353, Phe354, Thr355, Trp356, Leu357, and Gly358.<sup>23</sup> ZGE shows a hydrogen bond with Tyr109 (Figure 6D). This result is consistent with fact that sumatriptan, an agonist of the 5HT<sub>1B/1D</sub> receptor, is involved in the reduction of capsaicin-induced vasodilatation and carrageenan-induced thermal hyperalgesia in rodents.<sup>24,25</sup> Moreover, 5-HT<sub>1B</sub> receptors play an inhibitory role of noxious heat- and formalin-induced nociception in 5-HT<sub>1B</sub> knock-out mice.<sup>26</sup>

In the case of the GABAergic system, flumazenil has different affinities for the different subunits of the receptor GABA<sub>A</sub> [ $\alpha_5$  ( $pK_i$  9.2),  $\alpha_1$  ( $pK_i$  9.1),  $\alpha_2$  ( $pK_i$  9.1),  $\alpha_3$  ( $pK_i$  9), and  $\alpha_6$  ( $pK_i$  6.8) subunits].<sup>12</sup> The  $\alpha_5$  subunit promotes nociception;<sup>27</sup> in contrast, activation of GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ , and  $\alpha_6$  subunits has been related with antinociception.<sup>28,29</sup> Our data suggest that interaction of ZGE with any or all of these subunits account for its anti-inflammatory and antiallodynic effects, in particular because GABA<sub>A</sub> receptors are localized in primary afferent neurons.<sup>30</sup>

To have a better insight of the affinity of ZGE by the GABA<sub>A</sub> receptor, next a docking analysis with its subunit  $\alpha 1\gamma 2$ , built by homology was performed.<sup>18,31</sup> So far, the crystalline structure of the receptor has not been reported. The result (Figure 6E) predicts that ZGE (−7.9 kcal/mol) binds to the subunit  $\alpha 1\gamma 2$  of the GABA<sub>A</sub> receptor at a different site than flumazenil (−6.3 kcal/mol).<sup>31</sup> ZGE interacts with the amino acids Arg28, Arg30, Pro31, Gly32, Ile93, Trp94, Thr95, Pro96, and Asp97 of the subunit  $\alpha 1$ . In the  $\gamma 2$  subunit, ZGE interacts with Leu31, Leu34, Leu35, Tyr38, Ser100, Asn101, Met102, Val103, Gly104, Lys105, Asn128, Arg129, and Met130. Thus, ZGE might bind to the GABA<sub>A</sub> receptor with better affinity than flumazenil.

To continue with the study of the mechanism of action of ZGE, we next investigated the participation of the NO-cGMP-ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel signaling pathway. Local peripheral administration of L-NAME (inflammation:  $F_{4,30} = 43.74$ ,  $P < 0.0001$ , Figure 7A; allodynia:  $F_{4,30} = 174.8$ ,  $P < 0.0001$ , Figure 7B), ODQ (inflammation:  $F_{4,30} = 27.84$ ,  $P < 0.0001$ , Figure 7C; allodynia:  $F_{4,28} = 221.8$ ,  $P < 0.0001$ , Figure 7D), or



**Figure 5.** Possible anti-inflammatory and antiallodynic mechanisms of zinagrindinolide E (ZGE) in carrageenan-induced paw edema. Evaluation of the participation of opioid (panels A and B), serotonergic (panels C and D), and GABAergic (panels E and F) receptors. VEH: vehicle (DMSO 50% in saline). Panels A, C, E: Each bar represents the mean area under the curve (AUC, percentage of inflammation against time) ( $n = 8$ )  $\pm$  SEM. Panels B, D, F: Each bar represents the mean area under the curve (AUC, 50% of withdrawal threshold against time) ( $n = 8$ )  $\pm$  SEM. Significantly different from vehicle value (VEH) (\*\*\*\* $P < 0.0001$ ), as determined by one-way ANOVA, followed by Dunnett's *post hoc* test, and significantly different from ZGE values (## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ , and #### $P < 0.0001$ ) was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test.

glibenclamide (inflammation:  $F_{4,31} = 24.54$ ,  $P < 0.0001$ , Figure 7E; allodynia:  $F_{4,31} = 225.2$ ,  $P < 0.0001$ , Figure 7F) prevented in a dose-dependent manner the anti-inflammatory and antiallodynic effects of ZGE (30  $\mu\text{g/paw}$ ). L-NAME, ODQ, and glibenclamide, *per se*, did not produce any effect on carrageenan-induced inflammation and tactile allodynia (Figure 7).

L-NAME, an inhibitor of nitric oxide synthesis, blocked ZGE effects in a dose-dependent manner, which agreed with former evidence about the participation of NO in the antinociceptive effect of several drugs at the peripheral level.<sup>32,33</sup> The anti-inflammatory and antiallodynic effects of ZGE were also blocked by ODQ, an inhibitor of nitric oxide-sensitive soluble guanylyl cyclase,<sup>34</sup> indicating that activation of the NO-cGMP pathway is involved in these effects. Finally, the ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channel blocker glibenclamide<sup>35</sup> prevented also the effects of ZGE. Here it is important to mention that NO can stimulate

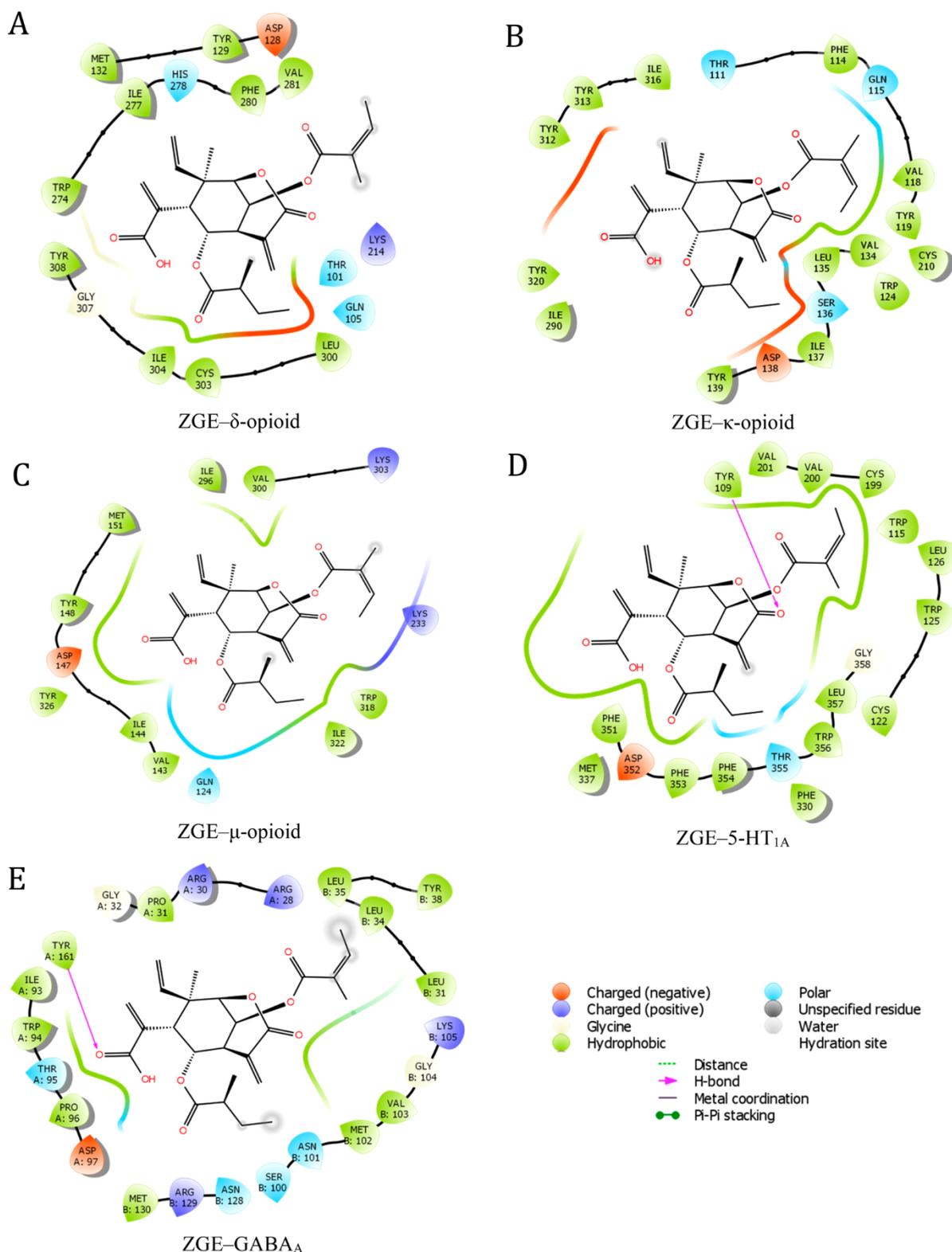
soluble guanylyl cyclase<sup>36</sup> and different types of  $\text{K}^+$  channels in several tissues,<sup>37</sup> including muscular, such as the mouse paw.

The last group of results indicate that ZGE activates the NO-cGMP-ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channel cascade, which is a common mechanism for several drugs, such as NSAIDs, dipyrrone, and morphine.<sup>38</sup> They are also consistent with previous findings showing that peripheral activation of the NO-cGMP-ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channel signaling pathway induces antinociception in rodents.<sup>39</sup>

The anti-inflammatory and antiallodynic activity of ZGE is multitarget, involving opioidergic, serotonergic, and GABAergic mechanisms as well as the NO-cGMP-ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channel cascade. These data provide further support to the traditional use of *Z. grandiflora* to relieve pain.

## EXPERIMENTAL SECTION

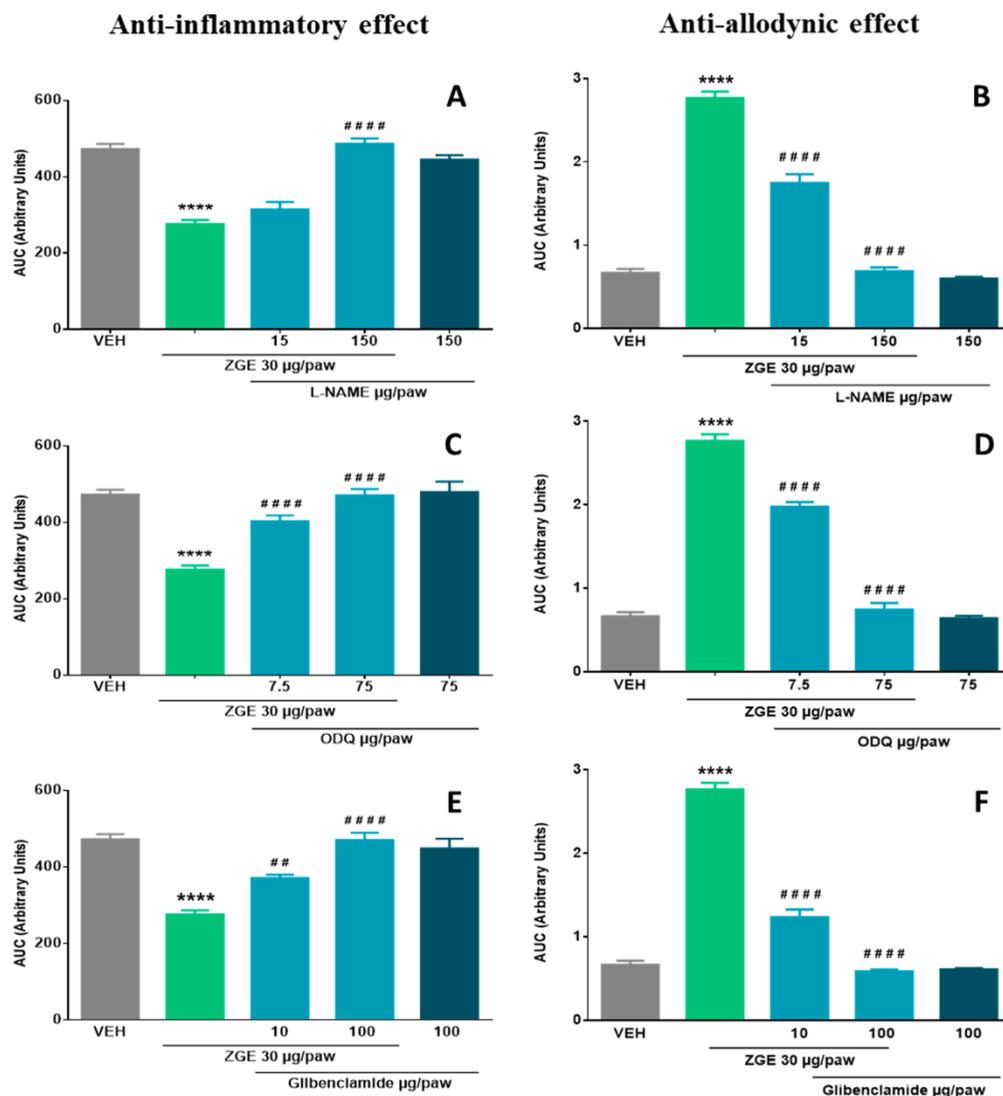
**General Experimental Procedures.** NMR spectra were recorded in  $\text{CDCl}_3$  solution on a Varian VNRMS (Palo Alto, CA,



**Figure 6.** Representation in 2D of the observed interactions between ZGE with the  $\delta$ - (6PT3; panel A),  $\kappa$ - (6IV4; panel B),  $\mu$ -opioid (5C1M; panel C), 5-HT<sub>1B</sub> (4IAR; panel D), and GABA<sub>A</sub> (homology; panel E) receptors created with Maestro software (2018-4).

USA) at 400 MHz (<sup>1</sup>H) or 100 MHz (<sup>13</sup>C), using TMS as an internal standard. Ultra-high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UHPLC-MS) was used to identify ZGE by comparison with a standard;<sup>4</sup> the equipment possessed a quaternary pump, an autosampler, a UV detector with photodiode array (PDA), an electrospray ionization power source, and an SQ2 ELSD detector. For the control of the equipment and the acquisition and processing

of the data, the Acquity program (Waters, Milford, MA, USA) was used. A BEH C<sub>18</sub> column was used with an elution gradient of CH<sub>3</sub>CN and H<sub>2</sub>O:odd (formic acid 0.1%), with a flow rate of 0.3 mL/min. The ionization conditions in the MS studies were as follows: capillary voltage (kV): 3.5 (positive ionization) and 2.5 (negative ionization); cone (V): 45.0; source temperature: 120 °C; desolvation temperature: 360 °C; desolvation gas flow (L/h): 571.



**Figure 7.** Possible anti-inflammatory and antiallodynic mechanism of zinagrindinolide E (ZGE) in carrageenan-induced paw edema. Evaluation of the participation of the nitric oxide-cyclic GMP- $K^+_{ATP}$  channel pathway. VEH: vehicle (DMSO 50% in saline), L-NAME: NG-L-nitro-arginine methyl ester, ODQ: 1-*H*-[1,2,4]oxodiazolo[4,3-*a*]quinoxalin-1-one. Panels A, C, E: Each bar represents the mean area under the curve (AUC, percentage of inflammation against time) ( $n = 8$ )  $\pm$  SEM. Panels B, D, F: Each bar represents the mean area under the curve (AUC, 50% of withdrawal threshold against time) ( $n = 8$ )  $\pm$  SEM. Significantly different from vehicle value (VEH) (\*\*\*\* $P < 0.0001$ ), as determined by one-way ANOVA, followed by the Dunnett's *post hoc* test. Significantly different from ZGE value (## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ , and #### $P < 0.0001$ ), as determined by one-way ANOVA, followed by Tukey's *post hoc* test.

**Chemicals and Reagents.** Dimethyl sulfoxide (DMSO; 679), carrageenan (9064-57-7), diclofenac sodium (5018304), 1-*H*-[1,2,4]-oxodiazolo[4,3-*a*]quinoxalin-1-one (ODQ; 1456), flumazenil (3373), pregabalin (5486971), glibenclamide (3488), naloxone (5284596), methiothepin mesylate (methiothepin; 4106),  $N^G$ -L-nitro-arginine methyl ester (L-NAME; 39836), and streptozotocin (29327) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Methiothepin, naloxone, flumazenil, ODQ, L-NAME, glibenclamide, diclofenac, and pregabalin were dissolved in saline solution. In all experiments, ZGE, diclofenac, and pregabalin were dissolved in 50% DMSO for intraplantar administration and 60% DMSO for intrathecal administration, both in saline solution.

**Experimental Animals.** Female Swiss Webster mice of 25–30 g, from Cinvestav, Sede Sur (Mexico City), were used in this study. The animals had free access to water and food, in a controlled environment at 22 °C with 12 h light/dark cycles. All experiments were conducted according to the ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals.<sup>40</sup> The protocol was approved by the local ethics committee (Cinvestav, protocol 042-13). In addition, it followed the scientific procedures established by the

Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999) and the directive 2010/63/EU for animal experiments. Animals were randomized in each treatment group ( $n = 8$ ). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used. The animals were sacrificed in a CO<sub>2</sub> chamber after each experiment.

**Extraction and Isolation of ZGE (1).** Pure ZGE (254 mg) was obtained according to the procedure previously described, using the same botanical material.<sup>4</sup> The identity of ZGE was confirmed by UHPLC-ESIMS parameters in comparison with a standard<sup>4</sup> and H<sup>1</sup> and C<sup>13</sup> NMR analysis (Figures S1–S3 and Table S1, Supporting Information).

**Carrageenan-Induced Paw Edema and Tactile Allodynia.** Before administration of any treatment, animals were placed in open Plexiglas observation chambers for 40 min at 25 °C for conditioning to their surroundings. The inflammation and mechanical allodynia were determined in the carrageenan-induced edema test.<sup>41</sup> For this, 1% carrageenan in saline was injected into the intraplantar region of the mice's paw. The inflammatory response was measured with a plethysmometer (model 7150, Ugo Basilea, Italy). This equipment

determines the volume of the mouse paw recorded every hour during 6 h after the administration of carrageenan. We determined tactile allodynia with a previously reported method.<sup>42</sup> This method determines the 50% paw withdrawal threshold according to the following equation:

$$50\% \text{Threshold (g)} = (10^{[Xf+k\delta]})/10000$$

where  $Xf$  is the value of the last von Frey filament used (in logarithmic units),  $k$  is the correction factor based on the response patterns of a calibration table and the tabulated value based on the pattern of positive and negative responses, and  $\delta$  indicates the average differences between stimuli in logarithmic units.<sup>42,43</sup>

In normal conditions, a value in the range of 1–1.6 g of the 50% withdrawal threshold of the limb is considered normal for mice, while the presence of allodynia is considered when the value is less than 0.2 g.

**Induction of Hyperglycemia and Assessment of Tactile Allodynia.** Mice were intraperitoneally administrated with a single dose of STZ (150 mg/kg) dissolved in a citrate buffer (pH 4.4, 0.1 M) to induce experimental type 1 diabetes.<sup>44</sup> The dose of STZ was selected according to previous assays in our laboratory. Hyperglycemia was confirmed after 48 h of STZ injection through the measurement of the blood glucose levels with a commercial glucometer (One Touch Ultra 2, Johnson & Johnson, Milpitas, CA, USA). Mice with blood glucose levels  $\geq 200$  g/dL were considered for this study.

The evaluation of ZGE effects was carried out 4 weeks after the injection of STZ. At this time, all hyperglycemic mice have already developed tactile allodynia with values of a 50% paw withdrawal threshold  $\leq 0.2$  g (Figure S4, Supporting Information). Tactile allodynia was determined as previously described.<sup>42</sup> Both conditions (hyperglycemia and tactile allodynia) were essential to evaluate the effects of ZGE and pregabalin in diabetic mice with neuropathic pain.

**Experimental Design.** Figure 8 shows that the experimental design for this research was divided into two treatment schemes, pre-

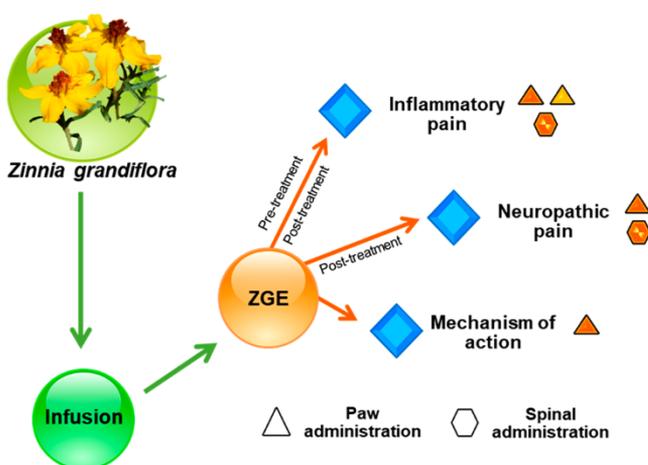


Figure 8. Overall experimental design.

and post-treatment of 1% carrageenan. In the pretreatment scheme, ZGE was administered in a volume of 20  $\mu$ L for the intraplantar route or 5  $\mu$ L for the intrathecal route per mouse 15 min before the injection of 1% carrageenan (30  $\mu$ L). ZGE was administered in doses of 1, 3, 10, and 30  $\mu$ g/paw. Diclofenac (30  $\mu$ g/paw) was used as a reference drug for the anti-inflammatory and antiallodynic effects in carrageenan-induced effects. The percentage of inflammation and 50% withdrawal threshold were measured during the following 6 h. In another set of experiments, animals were also pretreated with ZGE (3, 10, 30  $\mu$ g/paw) as described above, but, in this case, anti-inflammatory and antiallodynic effects were evaluated every third day during 15 days.

In the post-treatment scheme, ZGE (30  $\mu$ g/paw) and diclofenac (30  $\mu$ g/paw) were administered 6 days after 1% carrageenan injection, when the inflammatory process was established; inflammation and withdrawal threshold were measured during the following 6 h after drug administration following the same procedures described above.

In another set of experiments, the effect of ZGE in a model of neuropathic pain in hyperglycemic mice was tested. For this, 4 weeks after the injection of STZ, hyperglycemic mice received increasing doses of ZGE (3–30  $\mu$ g) by local peripheral (20  $\mu$ L/paw) or intrathecal (5  $\mu$ L/mice) administration. Other groups of mice received pregabalin (30  $\mu$ g), as positive control in neuropathic pain. In order to discard a possible systemic effect of the local injection of ZGE, the drug was administered also into the contralateral paw with respect to the carrageenan injection. Tactile allodynia was evaluated for the next 6 h after drug administration.

For the study of the mechanism of action of ZGE, the participation of serotonergic, opioidergic, and GABAergic receptors as well as the NO-cGMP-ATP-sensitive  $K^+$  channel cascade was analyzed. Once more the carrageenan-induced inflammation and tactile allodynia model in mice was used. For this, mice were pretreated (15 min) with naloxone (5 and 50  $\mu$ g/paw), methiothepin (0.03 and 0.3  $\mu$ g/paw), flumazenil (6 and 30  $\mu$ g/paw), L-NAME (15 and 150  $\mu$ g/paw), ODQ (7.5 and 75  $\mu$ g/paw), or glibenclamide (10 and 100  $\mu$ g/paw). Thereafter ZGE (30  $\mu$ g/paw) was administered, and the anti-inflammatory and anti-allodynic responses were assessed for the next 6 h.

**Molecular Docking.** Minimum energy structures were built with Spartan'10 software (Wavefunction Inc., Irvine, CA, USA). The minimized structures for docking simulations were prepared using the Autodock Tools package v1.5.6 (ADT, <http://mglttools.scripps.edu/>). For metabolites, the addition of Gasteiger charges and number of torsions was set, and nonpolar hydrogens were merged. The crystallographic structures of 5-HT<sub>1B</sub> and  $\delta$ -,  $\kappa$ -, and  $\mu$ -opioid receptors were obtained from the Protein Data Bank (pdb codes 4IAR, 6PT3, 6VI4, and 5C1M, respectively). 5-HT<sub>1B</sub> receptor was cocrystallized with ERM;  $\delta$ -OR receptor with DPI-287;  $\kappa$ -OR receptor with JDTic; and  $\mu$ -OR receptor with 4VO. The GABA<sub>A</sub> receptor obtained by homology was retrieved from the Supporting Information of the paper by Richter and collaborators, which also docked the subunit  $\alpha 1\gamma 2$  with flumazenil.<sup>31</sup> For the receptors, polar hydrogens and Kollman charges were added, and solvation parameters were assigned by default. Molecular docking studies were achieved with AutoDock Vina 1.1.2.<sup>45</sup> First, a blind docking was performed in order to establish the common site of interaction of the metabolites with the receptors. The search space for this preliminary docking was defined as a box size of 80  $\times$  80  $\times$  80  $\text{\AA}$  in the  $x$ ,  $y$ , and  $z$  dimensions, and the macromolecule was set as the center of the box. Next, a refined docking was performed with a smaller box of searching space (25  $\times$  25  $\times$  25  $\text{\AA}$ ), setting as the center of the grid box the lower state pose obtained from the blind docking. The conformational states from the docking simulations were analyzed using AutoDock Tools and Maestro 11.8.012 programs, which also identified the H-bonds and van der Waals interactions between receptors and ligands. The predicted docked complexes (protein–ligand) were those conformations showing the lowest binding energy. The docking protocol was validated reproducing the binding mode of each cocrystallized compound with each receptor (Figures S6 and S7 and Table S2, Supporting Information). RMSD values less than 2  $\text{\AA}$  indicate the correct bound structure prediction. Preparation of the figures was accomplished with the PyMOL visualization tool (PyMOL Molecular Graphics System v1.7.4, Schrödinger, New York, NY, USA)<sup>46,47</sup> and Maestro 11.8.012 (Schrödinger).<sup>48</sup>

**Statistical Analysis.** Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of the percentage of inflammation (%) or 50 percent of paw withdrawal threshold (g) in time courses, or as the mean  $\pm$  SEM of the analysis of area under the curve of parameters previously mentioned against time (arbitrary units, AUC). All experiments were performed in groups of eight mice ( $n = 8$ ).

Statistical differences were evaluated in the GraphPad Prism software (version 6.01 for Windows, La Jolla, CA, USA), using either

two-way ANOVA followed by a Bonferroni's test or one-way ANOVA followed by a Dunnett's or a Tukey's test.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### SI Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.0c00793>.

NMR spectra of zinagrandinolide E; measurement of the tactile allodynia in STZ-induced diabetic mice; anti-inflammatory and antiallodynic effect of the intrathecal administration of ZGE in inflammatory pain induced by carrageenan; molecular docking data (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Authors

**Myrna Déciga-Campos** – *Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Mexico City 11340, Mexico*; Phone: +52 55 5729-6300; Email: [myrnadeciga@hotmail.com](mailto:myrnadeciga@hotmail.com), [mdeciga@ipn.mx](mailto:mdeciga@ipn.mx)

**Rachel Mata** – *Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico*; [orcid.org/0000-0002-2861-2768](https://orcid.org/0000-0002-2861-2768); Phone: +52-555-622-5289; Email: [rachel@unam.mx](mailto:rachel@unam.mx)

### Authors

**Valeria Itzel Reyes-Pérez** – *Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico*

**Vinicio Granados-Soto** – *Neurobiology of Pain Laboratory, Departamento de Farmacobiología, Cinvestav, Mexico City 14330, Mexico*

**Manuel Rangel-Grimaldo** – *Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico*

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.0c00793>

### Author Contributions

V. R.-Pe.: methodology, data curation, and draft preparation. V.G.-S.: conceptualization, supervision, and writing/editing. M.D.-C.: conceptualization, visualization, investigation, and writing-reviewing. R.M.: conceptualization, visualization, investigation, and writing-reviewing. M.R.-G.: contributed to the docking analyses.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

This study is part of the Ph.D. dissertation of V.R.-P., who acknowledges the fellowship from CONACYT (289212) to pursue graduate studies. This work was supported by grants from CONACyT CB A1-S-11226 and DGAPA IN 217320. We recognize the support of Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC), UNAM, for the resources to carry out computational calculations through the Miztli supercomputing system (LANCAD-UNAM-DGTIC-313). The authors acknowledge the valuable technical support of Araceli Pérez-Vásquez and Isabel Rivero Cruz, from Facultad de Química-UNAM, and Guadalupe C. Vidal-Cantu from Cinvestav.

## ■ DEDICATION

Dedicated to Professor Douglas Kinghorn, College of Pharmacy, The Ohio State University, Columbus, OH, for his pioneering outstanding work on bioactive natural products.

## ■ REFERENCES

- (1) Stevenson, M. C. In *Thirtieth Annual Report of the Bureau of American Ethnology to the Secretary of the Smithsonian Institution 1908–1909. Ethnobotany of the Zuni Indians*; Holmes, W. H., Ed.; Government Printing Office: Washington, DC, 1915; pp 31–102.
- (2) Vestal, P. A. *Peabody Mus. Am. Arch. Ethnol. Papers* **1952**, *40*, 1–94.
- (3) Bashyal, B. P.; McLaughlin, S. P.; Gunatilaka, A. A. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1820–1822.
- (4) Reyes-Pérez, V.; Vásquez, A. P.; Déciga-Campos, M.; Bye, R.; Linares, E.; Mata, R. *J. Nat. Prod.* **2019**, *82*, 456–461.
- (5) International Association for the Study of Pain. Fact Sheet: Unrelieved pain is a major global healthcare problem, 2004–2005. <https://www.iasppain.org/GlobalYear/RighttoPainRelief> (accessed June 24, 2020).
- (6) Radhakrishnan, R.; Moore, S. A.; Sluka, K. A. *Pain* **2003**, *104*, 567–577.
- (7) Einsenach, J. C.; Curry, R.; Tong, C.; Houle, T. T.; Yaksh, T. L. *Anesthesiology* **2010**, *112*, 1216–1224.
- (8) Rondón, L. J.; Privat, A. M.; Daulhac, L.; Davin, N.; Mazur, A.; Fialip, J.; Eschaliere, A.; Courteix, C. *J. Physiol.* **2010**, *588*, 4205–4215.
- (9) Marshall, A. G.; Lee-Kubli, C.; Azmi, S.; Zhang, M.; Ferdousi, M.; Mixcoatl-Zecuatl, T.; Petropoulos, I. N.; Ponirakis, G.; Fineman, M. S.; Fadavi, H.; Frizzi, K.; Tavakoli, M.; Jeziorska, M.; Jolival, C. G.; Boulton, A. J. M.; Efron, N.; Calcutt, N. A.; Malik, R. A. *Diabetes* **2017**, *66*, 1380–1390.
- (10) Millan, M. J. *Prog. Neurobiol.* **1999**, *57*, 1–164.
- (11) Villalón, C. M.; Centurión, D.; Valdivia, L. F.; de Vries, P.; Saxena, P. R. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **2003**, *1*, 71–84.
- (12) Huang, Q.; Liu, R.; Zhang, P.; He, X.; McKernan, R.; Gan, T.; Bennett, D. W.; Cook, J. M. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4130–42.
- (13) Meng, F.; Xie, G. X.; Thompson, R. C.; Mansour, A.; Goldstein, A.; Watson, S. J.; Akil, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 9954–9958.
- (14) Stein, C.; Schäfer, M.; Machelska, H. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 1003–1008.
- (15) Claff, T.; Yu, J.; Blais, V.; Patel, N.; Martin, C.; Wu, L.; Han, G. W.; Holleran, B. J.; Van Der Poorten, O.; White, K. L.; Hanson, M. A.; Sarret, P.; Gendron, L.; Cherezov, V.; Katritch, V.; Ballet, S.; Liu, Z. J.; Müller, C. E.; Stevens, R. C. *Sci. Adv.* **2019**, *5*, eaax9115.
- (16) Che, T.; English, J.; Krumm, B. E.; Kim, K.; Pardon, E.; Olsen, R. H. J.; Wang, S.; Zhang, S.; Diberto, J. F.; Sciaky, N.; Carroll, F. I.; Steyaert, J.; Wacker, D.; Roth, B. L. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1145.
- (17) Huang, W.; Manglik, A.; Venkatakrishnan, A.; Laeremans, T.; Feinberg, E. N.; Sanborn, A. L.; Kato, H. E.; Livingston, K. E.; Thorsen, T. H.; Kling, R. C.; Granier, S.; Gmeiner, P.; Husbands, S. M.; Traynor, J. R.; Weis, W. I.; Steyaert, J.; Dror, R. O.; Kobilka, B. K. *Nature* **2015**, *524*, 315–321.
- (18) Dumitrascuta, M.; Bermudez, M.; Haddou, T. B.; Guerrieri, E.; Schläfer, L.; Ritsch, A.; Hosztal, S.; Lantero, A.; Kreutz, C.; Massotte, D.; Schmidhammer, H.; Wolber, G.; Spetea, M. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 5653.
- (19) Keasling, A. W.; Pandey, P.; Doerksen, R. J.; Pedrino, G. R.; Costa, E. A.; Da Cunha, L. C.; Zjawiony, J. K.; Fajemiroye, J. O. *J. Psychopharmacol.* **2019**, *33*, 865–881.
- (20) Hoyer, D.; Clarke, D. E.; Fozard, J. R.; Hartig, P. R.; Martin, G. R.; Mylecharane, E. J.; Saxena, P. R.; Humphrey, P. P. *Pharmacol. Rev.* **1994**, *46*, 157–203.
- (21) Cervantes-Durán, C.; Vidal-Cantú, G. C.; Godínez-Chaparro, B.; Granados-Soto, V. *Pharmacol. Rep.* **2016**, *68*, 434–442.
- (22) Muñoz-Islas, E.; Vidal-Cantú, G. C.; Bravo-Hernández, M.; Cervantes-Durán, C.; Quiñonez-Bastidas, G. N.; Pineda-Farías, J. B.;

Barragán-Iglesias, P.; Granados-Soto, V. *Pharmacol., Biochem. Behav.* **2014**, *120*, 25–32.

(23) Wang, C.; Jiang, Y.; Ma, J.; Wu, H.; Wacker, D.; Katritch, V.; Han, G. W.; Liu, W.; Huang, X. P.; Vardy, E.; Mccorvy, J. D.; Gao, X.; Zhou, X. E.; Melcher, K.; Zhang, C.; Bai, F.; Yang, H.; Yang, L.; Jiang, H.; Roth, B. L.; Cherezov, V.; Stevens, R. C.; Xu, H. E. *Science* **2013**, *340*, 610–614.

(24) Carmichael, N. M.; Charlton, M. P.; Dostrovsky, J. O. *Pain* **2008**, *134*, 97–105.

(25) Bingham, S.; Davey, P. T.; Sammons, M.; Raval, P.; Overend, P.; Parsons, A. A. *Exp. Neurol.* **2001**, *167*, 65–73.

(26) Kayser, V.; Elfassi, I. E.; Aubel, B.; Melfort, M.; Julius, D.; Gingrich, J. A.; Hamon, M.; Bourgoin, S. *Pain* **2007**, *130*, 235–248.

(27) Bravo-Hernández, M.; Feria-Morales, L. A.; Torres-López, J. E.; Cervantes-Durán, C.; Delgado-Lezama, R.; Granados-Soto, V.; Rocha-González, H. I. *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, *734*, 91–97.

(28) Xu, T.; Li, Y.; Wang, H.; Xu, Y.; Ma, L.; Sun, T.; Ma, H.; Yu, J. *Mol. Med. Rep.* **2013**, *7*, 1819–1825.

(29) Witkin, J. M.; Cerne, R.; Davis, P. G.; Freeman, K. B.; do Carmo, J. M.; Rowlett, J. K.; Methuku, K. R.; Okun, A.; Gleason, S. D.; Li, X.; Krambis, M. J.; Poe, M.; Li, G.; Schkeryantz, J. M.; Jahan, R.; Yang, L.; Guo, W.; Golani, L. K.; Anderson, W. H.; Catlow, J. T.; Jones, T. M.; Porreca, F.; Smith, J. L.; Knopp, K. L.; Cook, J. M. *Pharmacol., Biochem. Behav.* **2019**, *180*, 22–31.

(30) Carlton, S. M.; Zhou, S.; Coggeshall, R. E. *Neuroscience* **1999**, *93*, 713–722.

(31) Richter, L.; De Graaf, C.; Sieghart, W.; Varagic, Z.; Mörzinger, M.; De Esch, I. J. P.; Ecker, G. F.; Ernst, M. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 455–464.

(32) Durate, I. D.; Lorenzetti, B. B.; Ferreira, S. H. *Eur. J. Pharmacol.* **1990**, *186*, 289–293.

(33) Granados-Soto, V.; Rufino, M. O.; Gomes Lopes, L. D.; Ferreira, S. H. *Eur. J. Pharmacol.* **1997**, *340*, 177–180.

(34) Moro, M. A.; Russel, R. J.; Cellek, S.; Lizasoain, I.; Su, Y.; Darley-Usmar, V. M.; Radomski, M. W.; Moncada, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 1480–1485.

(35) Edwards, G.; Weston, A. H. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1993**, *33*, 597–637.

(36) Horst, B. G.; Yokom, A. L.; Rosenberg, D. J.; Morris, K. L.; Hammel, M.; Hurley, J. H.; Marletta, M. A. *eLife* **2019**, *8*, e50634.

(37) Armstead, W. M. *Am. J. Physiol.* **1996**, *270*, H423–H426.

(38) Kusuda, R.; Carreira, E. U.; Ulloa, L.; Cunha, F. Q.; Kanashiro, A.; Cunha, T. M. *Brain Res.* **2020**, *1727*, 146567.

(39) Rodrigues, A. R.; Duarte, I. D. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *129*, 110–104.

(40) Zimmermann, M. *Pain* **1983**, *16*, 109–110.

(41) Winter, C. A.; Risley, E. A.; Nuss, G. W. *Exp. Biol. Med.* **1962**, *111*, 544–547.

(42) Chaplan, S. R.; Bach, F. W.; Pogrel, J. W.; Chung, J. M.; Yaksh, T. L. *J. Neurosci. Methods* **1994**, *53*, 55–63.

(43) Dixon, W. J. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1980**, *20*, 441–462.

(44) Sharma, S.; Kulkarni, S. K.; Agrewala, J. N.; Chopra, K. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, *536*, 256–261.

(45) Trott, O.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **2009**, *31*, 455–461.

(46) Schrödinger, L. *The PyMOL Molecular Graphics System*, Version 2.1.1; 2015.

(47) Seeliger, D.; De Groot, B. L. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2010**, *24*, 417–422.

(48) *Maestro*, Schrödinger Release 2018-4; Schrödinger, LLC: New York, NY, 2018.

