



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias de la Salud
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Instituto de Ciencias Agropecuarias

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y SALUD HUMANA

TESIS DOCTORAL

**EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE Y ANTINOCICEPTIVA DEL EXTRACTO
ETANÓLICO DEL PEMUCHE (*Erythrina americana*)**

**Para obtener el grado de
Doctora en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana**

P R E S E N T A

M. en B.R. Tania Jiménez Cabrera
415666

Directora:
Dra. Mirandeli Bautista Ávila

Codirectora:
Dra. Minarda De la O Arciniega

San Agustín, Tlaxiaca, Hgo., a 7 de diciembre 2022



ICSa-DCASH-noviembre 2022
Asunto: Autorización de impresión

Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado
Directora de Administración Escolar

Por este medio se informa que el comité tutorial asignado a la MBRA. TANIA JIMÉNEZ CABRERA con número de cuenta 415666, estudiante del Doctorado en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana dio terminación al trabajo de tesis titulado “Evaluación farmacológica de la capacidad antioxidante y antinociceptiva del extracto etanólico del pemuche (*Erythrina americana*)”, y por lo tanto se autoriza la impresión del documento de tesis en extenso propuesto por la estudiante.
Lo anterior, en función de que, la estudiante realizó todas las correcciones, adiciones y/o modificaciones sugeridas por el comité en la revisión previa con fecha 15 de noviembre 2022.
Por tal motivo, solicito a usted tenga a bien permitir al doctorando dar continuidad al proceso necesario que conlleve a la obtención del grado de Doctor en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana.

DRA. MIRANDELI BAUTISTA ÁVILA
Director de tesis
DRA. MINARDA DE LA O ARCINIEGA
DRA. ESTHER RAMÍREZ MORENO
DRA. DEYANIRA OJEDA RAMÍREZ

ATENTAMENTE

Pachuca, Hidalgo, 7 de diciembre del 2022
“Amor, Orden y Progreso”

Dra. Rebeca Ma. Elena Guzmán Saldaña
Director del Instituto de Ciencias de la Salud
Dean

Dra. Guadalupe López Rodríguez
Jefa del Área Académica de Nutrición
Chair of Academic Area of Nutrition

Dra. Lydia López Pontigo
Coordinadora de Posgrado del ICSa
Director of Graduate Studies of ICSa

Dra. Teresita de Jesús Saucedo Molina
Representante del Programa Educativo ICSa
Director of Graduate Studies



La parte experimental de esta tesis se realizó en el Laboratorio de Investigación del Área Académica de Farmacia y el Área Académica de Química, así como en área de investigación del Bioterio de la UAEH.

Durante el desarrollo de los estudios del Doctorado en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana se contó con una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de beca 733007.

Dedicatorias

A mi madre, María Emma Pueblito Cabrera Reséndiz:

Por ser una guerrera incansable que me inspira a seguir adelante, por haber compartido conmigo toda una vida llena de retos y llena de amor.

A tí mi querido niño, que me has dado la oportunidad de sentir un amor desconocido pero que es tan fuerte que me ha permitido mantenerme en pie.

A Julio Valle Hernández, porque hemos superado muchas tormentas juntos y lo seguiremos haciendo.

Agradecimientos

Gracias a las Dras. Mirandeli Bautista Ávila y Minarda De la O Arciniega, por ser un ejemplo, por su apoyo incondicional y su paciencia durante todo el desarrollo de esta tesis.

Gracias a la Dra. Claudia Velázquez González, por todos sus consejos, enseñanzas y palabras de aliento.

A las Dras. Deyanira Ojeda Ramírez y Esther Rámirez Moreno, por el apoyo otorgado en el desarrollo de la tesis.

Un especial agradecimiento a la Dra. Maricruz Sánchez Zavala, por todo su apoyo en las técnicas de cromatograficas, por sus consejos y palabras de aliento.

Al Dr. José Antonio Guerrero Solano, por su apoyo en los experminentos de laboratorio y su amistad.

Al Dr. Osmar Antonio Jaramillo Morales, por todos sus consejos y aportaciones.

Gracias a Christian Alfredo Pensamiento Niño, por el especial apoyo y amistad durante todo el doctorado.

A la Dra. Rosa María Viguera Villaseñor, quien siempre se ha mantenido al pendiente de mi crecimiento profesional y personal.

ÍNDICE GENERAL

Índice de Figuras.....	iii
Índice de Gráficos.....	iv
Índice de Tablas	v
Resumen	vi
Abstract	viii
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1 Flores comestibles con propiedades medicinales.....	3
2.2 El género <i>Erythrina</i> y su uso en la etnomedicina	6
2.3 Estrés oxidativo en la salud humana.....	8
2.4 Fisiopatología del estrés oxidativo.....	10
2.5 Estrés oxidativo y su papel en el dolor y la inflamación	12
2.6 Dolor e inflamación	13
2.7 Antioxidantes naturales y su papel en el alivio del dolor	19
2.8 Estudios preclínicos de dolor e inflamación del género <i>Erythrina</i>	20
2.9 Actividad antioxidante del género <i>Erythrina</i> en modelos <i>in vitro</i>	23
3. Justificación.....	26
4. Objetivos.....	27
4.1 Objetivo general	27
4.2 Objetivos específicos	27
5. Material y métodos	28
5.1 Obtención del extracto	28
5.1.1 Material vegetal	28
5.1.2 Extracción.....	28
5.2 Determinación de contenido fenólico total y capacidad antioxidante	29
5.2.1 Prueba para determinar contenido fenólico total	29
5.2.2 Prueba para determinar capacidad antioxidante con DPPH.....	30
5.2.3 Prueba para determinar capacidad antioxidante con ABTS	30
5.2.4 Prueba para determinar capacidad antioxidante con FRAP	31
5.3 Consideraciones éticas para el uso de animales de experimentación.....	32
5.4 Determinación de Dosis Letal Media (DL ₅₀).....	32
5.5 Evaluación de la actividad antinociceptiva.....	33
5.5.1 Modelo de <i>Writhing</i> para evaluar analgesia periférica	33

5.5.2	Modelo de Hot-plate para evaluar analgesia a nivel central	34
5.5.3	Modelo de Formalina para evaluar analgesia en dolor nociceptivo e inflamatorio.	35
5.6	Análisis del posible mecanismo de acción.....	37
5.7	Identificación de metabolitos secundarios.....	38
5.7.1	Perfil fitoquímico	38
5.7.2	Estudios espectroscópicos de los metabolitos secundarios mayoritarios.	38
5.8	Análisis estadístico.....	39
6.	Resultados	40
6.1	Rendimiento del extracto.....	40
6.2	Contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante.....	40
6.2.1	Contenido fenólico total.....	40
6.2.2	Capacidad antioxidante	40
6.3	Dosis Letal Media (DL ₅₀).....	43
6.4	Actividad antinociceptiva.....	43
6.4.1	Analgesia periférica (<i>Writhing</i>).....	43
6.4.2	Analgesia a nivel central (<i>Hot plate</i>)	46
6.4.3	Analgesia en dolor nociceptivo e inflamatorio (Formalina)	48
6.5	Implicación de la vía L-Arginina/ON/cGMP en el efecto antinociceptivo.....	53
6.6	Perfil fitoquímico de las flores de <i>E. americana</i>	56
7.	Discusión	59
7.1	Rendimiento del extracto.....	59
7.2	Capacidad antioxidante.....	60
7.3	DL ₅₀	63
7.4	Actividad antinociceptiva.....	64
7.5	Mecanismos de acción.....	67
7.6	Metabolitos secundarios identificados en las flores de <i>E. americana</i>	68
8.	Conclusiones	69
9.	Referencias	70
10.	Anexos	79
10.1	Constancias de participación en Congresos	79
10.2	Memorias de Congresos.....	82
10.3	Publicación de artículo.....	84
10.4	Espectros de los metabolitos aislados.....	86

Índice de Figuras

Fig. 1. Mecanismos de protección contra radicales libres.....	10
Fig. 2. Proceso de nocicepción	16
Fig. 3. Mecanismos moleculares del dolor	17
Fig. 4. Proceso de extracción etanólica de flores de <i>E. americana</i>	28
Fig. 5. Diseño metodológico del modelo <i>Writhing</i> para evaluar la analgesia periférica....	34
Fig. 6. Diseño metodológico del modelo <i>Hot plate</i> para evaluar dolor a nivel central.....	35
Fig. 7. Diseño metodológico del modelo de Formalina para evaluar dolor nociceptivo e inflamatorio.....	36
Fig. 8. Evaluación antinociceptiva en el modelo de Formalina	37
Fig. 9. Identificación fitoquímica en cromato-placas.....	57

Índice de Gráficos

Gráfica 1. Porcentaje de inhibición en los ensayos DPPH y ABTS	41
Gráfica 2. Concentración inhibitoria 50 en el ensayo DPPH.....	42
Gráfica 3. Concentración inhibitoria 50 en el ensayo ABTS.....	42
Gráfica 4. Curso temporal del efecto antinociceptivo del EEa en la prueba de <i>Writhing</i>	44
Gráfica 5. Efecto antinociceptivo del EEa en la prueba de <i>Writhing</i>	45
Gráfica 6. Curva dosis respuesta de Indometacina y el EEa	46
Gráfica 7. Efecto antinociceptivo del EEa en <i>Hot-plate</i>	47
Gráfica 8. Curso temporal de antinocicepción bifásico de diclofenaco.....	48
Gráfica 9. Porcentaje de antinocicepción de diclofenaco en la prueba de Formalina.....	49
Gráfica 10. Curso temporal de antinocicepción en el modelo de Formalina.....	50
Gráfica 11. Porcentaje de antinocicepción del EEa en la primera fase en el modelo de Formalina.....	51
Gráfica 12. Porcentaje de antinocicepción del EEa en la segunda fase en el modelo de Formalina.. ..	52
Gráfica 13. Porcentaje de antinocicepción bifásico del EEa en el modelo de Formalina .	53
Gráfica 14. Curso temporal del efecto antinociceptivo para determinar el posible mecanismo de acción en el modelo de Formalina	54
Gráfica 15. Porcentaje de antinocicepción del efecto global de DE ₅₀ EEa, L-NAME, L-Arginina y su combinación.	56

Índice de Tablas

Tabla 1. Flores comestibles con propiedades medicinales.....	4
Tabla 2. Especies del género <i>Erythrina</i> para el alivio del dolor y la inflamación	8
Tabla 3. Nociceptores periféricos.....	15
Tabla 4. Estudios preclínicos sobre el efecto analgésico y antiinflamatorio de especies del género <i>Erythrina</i>	22

Resumen

Introducción. Las flores de *Erythrina americana* tienen un valor muy apreciado como alimento en diversas comunidades del estado de Hidalgo. Así mismo, las partes aéreas del árbol (hojas, corteza y fruto) se han utilizado empíricamente en la medicina tradicional para tratar diversos padecimientos, entre los que se destacan el dolor, procesos inflamatorios y ansiedad. Sin embargo, respecto a las flores comestibles de *E. americana*, no existen estudios que comprueben su actividad farmacológica. **Objetivo.** Evaluar el efecto del extracto etanólico de las flores de *E. americana* (EEa) sobre la actividad antioxidante *in vitro* y su actividad antinociceptiva *in vivo*, para contribuir con evidencia científica sobre su uso en el tratamiento del dolor en la medicina tradicional. **Métodos.** Las flores fueron colectadas en Huejutla, Hidalgo. Se obtuvo el extracto etanólico por maceración. Se determinó el contenido de fenoles total mediante *Folin-Ciocalteu*. La capacidad antioxidante se midió *in vitro* mediante las técnicas DPPH, ABTS y FRAP. Se determinó la dosis letal media (DL₅₀) de acuerdo con la guía de la OECD en ratones. El efecto antinociceptivo se evaluó *in vivo* en los modelos experimentales *writhing*, *hot plate* y formalina, probando dosis de 100-562 mg/Kg en ratones y ratas, siguiendo los lineamientos éticos, de acuerdo con lo descrito en el protocolo aprobado por el CIEQUAL. Así mismo, se analizó la implicación de la vía L-Arginina/NO/GMPc/ATP/K⁺ en el efecto antinociceptivo. Además, se identificaron los metabolitos secundarios mayoritarios, mediante métodos cromatográficos y espectroscópicos. **Resultados.** Se obtuvo un rendimiento del extracto de 2.7%. Se determinó un contenido de fenoles total de 43.862±1.16 mg EAG/mg. Así mismo, el EEa demostró capacidad de eliminación de radicales libres con un porcentaje de inhibición de 66.48±1.51% para DPPH y 79.04±0.35% para ABTS a una concentración de 12 mg/mL y presentó poder reductor en la técnica de FRAP (119±4.83 μM. FeSO₄). En las pruebas *in vivo* se determinó una DL₅₀>5000mg/Kg del EEa. Además, se evidenció una actividad antinociceptiva dependiente de la dosis (p<0.05) en los tres modelos

de dolor comparado con el vehículo y con un efecto similar al de los fármacos de referencia indometacina y diclofenaco. La participación de la vía L-Arginina/NO/GMPc/ATP/K⁺, no se evidenció de forma concluyente, no obstante, no se descarta este mecanismo de acción. El análisis fitoquímico, reveló la presencia de alcaloides y flavonoides. **Conclusiones.** Se demostró la capacidad antioxidante del extracto de flores de *E. americana* y un efecto antinociceptivo significativo, lo cual sugiere que tiene potencial para tratar el dolor, contribuyendo en la comprobación del uso de esta especie en la medicina tradicional. La naturaleza antioxidante de los flavonoides y la actividad captadora de radicales libres de los alcaloides sugiere que este grupo de compuestos identificados en el EEA, pudieran ser los responsables del efecto antinociceptivo.

Abstract

Introduction. *Erythrina americana* flowers have a highly appreciated value as food in various communities in the state of Hidalgo. Likewise, the aerial parts of the tree (leaves, bark and fruit) have been used empirically in traditional medicine to treat various ailments, among which pain, inflammatory processes and anxiety. However, regarding the edible flowers of *E. americana*, there are no studies that prove their pharmacological activity. **Objective.** To evaluate the effect of the ethanolic extract of the flowers of *E. americana* (EEa) on the antioxidant activity *in vitro* and its antinociceptive activity *in vivo*, to contribute with scientific evidence on its use in the treatment of pain in traditional medicine. **Methods.** The flowers were collected in Huejutla, Hidalgo. The ethanolic extract was obtained by maceration. The total phenol content was determined by Folin–Ciocalteu. The antioxidant capacity was measured *in vitro* using the DPPH, ABTS and FRAP techniques. The median lethal dose (LD50) was determined according to the OECD guideline in mice. The antinociceptive effect was evaluated *in vivo* in writhing, hot plate and formalin experimental models, testing doses of 100-562 mg/Kg in mice and rats, following ethical guidelines, as described in the protocol approved by CIECUAL. Likewise, the involvement of the L-Arginine/NO/cGMP/ATP/K⁺ pathway in the antinociceptive effect was analyzed. In addition, the major secondary metabolites were identified by chromatographic and spectroscopic methods. **Results.** An extract yield of 2.7% was obtained. A total phenol content of 43.862 ± 1.16 mg EAG/mg was determined. Likewise, EEa demonstrated the ability to eliminate free radicals with an inhibition percentage of $66.48 \pm 1.51\%$ for DPPH and $79.04 \pm 0.35\%$ for ABTS at a concentration of 12 mg/mL and presented reducing power in the FRAP technique (119 ± 4.83 μ M FeSO₄). In the *in vivo* tests, an LD50 > 5000 mg/Kg of the EEa was determined. In addition, a dose-dependent antinociceptive activity ($p < 0.05$) was evidenced in all three pain models compared to vehicle and with an effect similar to that of the reference drugs indomethacin and diclofenac. The participation of the L-Arginine/NO/cGMP/ATP/K⁺ pathway was not conclusively evidenced;

however, this mechanism of action is not ruled out. The phytochemical analysis revealed the presence of alkaloids and flavonoids. **Conclusions.** The antioxidant capacity of the *E. americana* flower extract and a significant antinociceptive effect were demonstrated, which suggests that it has the potential to treat pain, contributing to the verification of the use of this species in traditional medicine. The antioxidant nature of the flavonoids and the free radical scavenging activity of the alkaloids suggest that this group of compounds identified in the EEa, could be responsible for the antinociceptive effect.

1. Introducción

Las plantas medicinales han jugado un papel muy importante en el cuidado de la salud, son la base de la medicina tradicional desde tiempos inmemoriales (Zhang *et al.*, 2018). Éstas han sido una valiosa fuente de agentes terapéuticos, ya que se estima que al menos el 25% de los medicamentos usados actualmente, se han obtenido directa o indirectamente de plantas medicinales (Robinson & Zhang, 2011; UNEP *et al.*, 2015). Además, existe una importante variedad de especies vegetales poco conocidas, tales como hortalizas, frutas y flores que se cosechan en una amplia gama de entornos antropogénicos utilizadas por las comunidades autóctonas (Lim, 2016). Muchos de estos cultivos a menudo, son consumidos por motivos de salud, lo que implica que estas especies vegetales puedan poseer características ventajosas como ser ricas en micronutrientes, además de, sustancias bioactivas o fitoquímicos con posibles beneficios terapéuticos. Poco a poco, se ha ido acumulando evidencia científica que ha demostrado los beneficios medicinales, nutracéuticos y farmacéuticos que tienen diversas plantas alimenticias, tanto silvestres como cultivadas.

En este contexto, las flores del árbol de coral (*Erythrina americana*) conocido como *pemuche*, una especie muy apreciada por sus usos ornamentales; es también empleada en una variedad de platillos regionales en diversas comunidades de México (Mulík & Ozuna, 2020a; Pinedo-Espinoza *et al.*, 2020). Igualmente, existen algunos reportes que indican posibles propiedades medicinales (de Arajo-Jnior *et al.*, 2012). Además, estas flores también se han utilizado tradicionalmente para tratar la inflamación de extremidades y ojos, picaduras de insectos, úlceras, abscesos, paludismo, así como dolor de espalda y dolor de muelas (Bernardino-Nicanor *et al.*, 2016; de Arajo-Jnior *et al.*, 2012; García-Mateos *et al.*, 2001; Merlugo *et al.*, 2015).

Por otro lado, el dolor es un problema muy común, que tiene un profundo impacto en los individuos y la sociedad, frecuentemente se presenta como

resultado de una enfermedad o lesión (Mills *et al.*, 2019). El dolor crónico es considerado un grave problema de salud pública que comúnmente se acompaña de procesos inflamatorios (Singh *et al.*, 2017). Si bien, la inflamación aguda es una respuesta fisiológica natural a una lesión o infección tisular, la inflamación crónica es una mala adaptación que genera una cantidad considerable de dolor (Muley *et al.*, 2016). Así mismo, se ha demostrado que el estrés oxidativo, contribuye gravemente a la progresión de enfermedades inflamatorias y esta inflamación persistente es la que conduce a estados crónicos de dolor. Para contrarrestar esto, la capacidad antioxidante de diversos compuestos puede eliminar las especies libres de oxígeno y nitrógeno producidas en el estrés oxidativo, mitigando la promoción enzimática de la actividad proinflamatoria (Swamy, 2020).

En ese sentido, diferentes investigaciones han demostrado que las flores comestibles, son excelentes fuentes de compuestos con actividad antioxidante y que, a su vez, estos compuestos juegan un papel importante en los procesos que estimulan el sistema inmunológico y la prevención de enfermedades. Teniendo en cuenta que, estudios científicos han logrado comprobar actividad analgésica en plantas con actividad antioxidante (San Mauro Martin *et al.*, 2019), se puede inferir que el efecto inhibidor de plantas y productos naturales sobre la inflamación, puede ser resultado de una efectiva actividad antioxidante (Nunes *et al.*, 2020; Pan *et al.*, 2013). En este contexto, a pesar de que existen algunas publicaciones sobre flores mexicanas, que incluyen recetas culinarias y/o sus usos medicinales (Mulik & Ozuna, 2020b), éstos suelen ser bastante anecdóticos y carecen de datos científicos sobre las propiedades medicinales para la salud humana.

Es por ello en este estudio se realizó la evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro* y del efecto antinociceptivo *in vivo* del extracto etanólico de las flores comestibles de *E. americana* (*pemuche*), con la finalidad de identificar su uso potencial en el tratamiento del dolor.

2. Antecedentes

2.1 Flores comestibles con propiedades medicinales

Las flores son parte integral de nuestra cultura desde la antigüedad (Kumari *et al.*, 2021). A lo largo de la historia, según estimaciones, se han utilizado alrededor de 7,000 tipos de plantas como alimento; entre los que predominan el trigo, el centeno, el maíz y alrededor de una docena de otras especies altamente domesticadas. Sin embargo, existen al menos 75,000 plantas comestibles, muchas de ellas superiores a las plantas de cultivo más utilizadas, que aún no han sido estudiadas (Lim, 2012). Además, muchos de estos cultivos comestibles son poco conocidos, especialmente las especies que se cosechan de la naturaleza en la maleza, en bosques o en una amplia gama de entornos antropogénicos como tierras baldías, campos en barbecho, bordes de caminos, orillas de ríos, bordes de arroyos y barrancos, así como los que se cultivan en el traspatio. Debido a ello, se han realizado pocas investigaciones que exploren los usos potenciales de estas especies. De la misma forma, este tipo de plantas se ven amenazadas por la pérdida del conocimiento indígena de las generaciones mayores, sobre los beneficios nutritivos, los atributos medicinales, la aplicación, la preservación y utilización tradicional. Situación causada en gran medida porque este tipo de conocimiento se percibe como no científico, primitivo e intuitivo, y a menudo es ignorado (Lim, 2012).

El conocimiento tradicional de la variedad de usos que pueden recibir las flores comestibles no está ampliamente difundido, a pesar que éstas ya se consumían en la antigua Roma y Grecia y también en China, como medicinas alternativas o como parte de la culinaria tradicional (Takahashi *et al.*, 2020). Las plantas cuyas partes florales, incluido el tallo y el néctar de la flor, que se consumen como alimento convencional o funcional y como especia, pueden ser fuentes potenciales de nutraceuticos y farmaceuticos (Wilson, 2013). Las flores pueden consumirse frescas (ej. flores de caléndula en ensaladas), así como en platos salados que contengan carnes y pescados, en sopas y bebidas,

en postres, dulces, jaleas, así como especias y colorantes. Pueden ser consumidas en forma seca, en infusiones, en polvo, cristalizadas o en forma de espumas (gastronomía molecular). En este escenario, las flores representan un segmento importante para expandir el mercado de alimentos, por sus adecuadas características sensoriales y nutricionales, así como por la presencia de compuestos bioactivos benéficos para la salud humana (Takahashi *et al.*, 2020).

Algunos estudios han revelado que las flores comestibles poseen propiedades medicinales tales como antidiabéticas, anticancerígenas, ansiolíticas, antiinflamatorias, antimicrobianas, diuréticas entre otras, como se puede ver en la **Tabla 1**, además de ser una rica fuente de antioxidantes que pueden reducir los efectos nocivos de los radicales libres (Kumari *et al.*, 2021). Los antioxidantes, como la vitamina C, los carotenoides, las antocianinas y los polifenoles, a menudo aparecen en las flores en concentraciones más altas en comparación con las frutas o verduras comunes (Sharma *et al.*, 2020).

Tabla 1. Flores comestibles con propiedades medicinales

Lugar	Especie	Sabor	Uso medicinal	Referencia
Asia	<i>Chrysanthemum</i>	Ligeramente dulce	Antibacterial y antioxidante	(Lawal <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Hemerocallis lilioasphodelus</i>	Agrio	Depresión, inflamación e insomnio	(Fernandes <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Moringa oleifera</i>	Poco amarga	Inflamación	(Patriota <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Musa × paradisiaca</i>	Un poco dulce	Urolitiasis, úlcera, trastornos gastrointestinales e hipoglucemiante	(Shanmuga & Subramanian, 2012)
	<i>Tulipa spp</i>	Dulce, similar al pepino	Antipirético y expectorante	(Fernandes <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Cucurbita maxima</i>	Agrio	Antidiabético	(Mulík & Ozuna, 2020)
África	<i>Pelargonium endlicherianum</i>	Dulce	Antihelmíntico	(Saraswathi <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Pelargonium tomentosum</i>	Menta	Antimicrobiano	(Lalli <i>et al.</i> , 2008)
	<i>Oxalis pes-caprae</i>	Sabor fuerte	Inflamación, diurético, teniasis	(Ondua <i>et al.</i> , 2018)
	<i>Artemisiaafra</i>	Sabor fuerte	Antiviral, antibacteriana y antiinflamatoria	(Liu <i>et al.</i> , 2009)
Australia	<i>Tropaeolum majus</i>	Ligeramente agrio	Antibacterianas y antifúngicas	(Valsalam <i>et al.</i> , 2019)

	<i>Viola sp.</i>	Vainilla dulce	Complicaciones de la diabetes	(Koike <i>et al.</i> , 2015)
	<i>Portulaca oleracea</i>	Ácido y salado	Eccema, herpes zóster, verruga plana, metrorragia y diarrea	(Chen <i>et al.</i> , 2018)
	<i>Tagetes patula</i>	Especia	Antihiperlipidémico	(Nawale <i>et al.</i> , 2018)
Europa	<i>Allium schoenoprasum</i>	Cebolla suave	Infecciones de vejiga y riñón, antibiótico	(Fernandes <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Borago officinal</i>	Sabor a miel	Antiespasmódico, antihipertensivo y antipirético	(Asadi Samani <i>et al.</i> , 2014)
	<i>Calendula officinalis</i>	Amargo	Calmantes y antimicrobianas	(Bokelman 2022)
	<i>Centaurea cyanus</i>	Dulce a picante	Inflamación ocular	(Garbacki, <i>et al.</i> , 1999)
	<i>Syringa vulgaris</i>	Limón, ligeramente picante	Control de fiebre y parasitosis	(Fernandes <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Matricaria chamomila</i>	Dulce	Antiinflamatorio	(dos Santos <i>et al.</i> , 2019)
Norteamérica	<i>Monarda didyma</i>	Dulce y aromática	Antimicrobiana	(Wróblewska <i>et al.</i> , 2019)
	<i>Trifolium pratense</i>	Dulce	Control de diabetes e hipertensión	(Akbaribazm <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Althaea officinalis</i>	Dulce	Inflamaciones de las mucosas, especialmente digestivas y respiratorias	(Ciobanu <i>et al.</i> , 2018)
	<i>Agastach foeniculum</i>	Dulce agrio	Control de fiebre y alivio de dolores	(Duda <i>et al.</i> , 2015)
	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Dulce	Antiviral	(Guo <i>et al.</i> , 2019)
Sudamérica	<i>Begonia x tuberhybrida</i>	Ligeramente amargo	Antiespasmódico y problemas gástricos	(Fernandes <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Viola x wittrockiana</i>	Dulce	Analgésico y antitusígeno.	(Moliner <i>et al.</i> , 2019)

Históricamente las flores comestibles se han utilizado principalmente debido a su olor y atractivo visual, pero actualmente el mundo está descubriendo el valor de las flores como alimento en la medida en que los consumidores buscan fuentes naturales innovadoras de compuestos bioactivos (Takahashi *et al.*, 2020).

Del 70 al 95 % de la composición de las flores comestibles está representada por agua. Además, la materia seca de estas flores comestibles es fuente de constituyentes importantes como carbohidratos, proteínas y lípidos, así como de vitaminas, minerales y fitoquímicos de bajo peso molecular. El polen es una

fuentes de carbohidratos, proteínas, lípidos, carotenoides y flavonoides. El néctar contiene azúcares, proteínas y lípidos, pero también es abundante en ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, alcaloides y terpenoides. Así mismo, los pétalos son ricos en vitaminas, minerales y antioxidantes (Skrajda-Brdak et al., 2020). Este potencial antioxidante puede ser explorado como aditivo alimentario, conservador natural, antioxidante alimentario, y principalmente para producir nutraceuticos que promuevan la prevención de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo como el dolor inflamatorio (Takahashi et al., 2020).

2.2 El género *Erythrina* y su uso en la etnomedicina

Este género pertenece a la familia de las leguminosas (*Fabaceae*), subfamilia *Papilionoideae*. Comprende al menos 120 especies, la mayoría de las cuales son árboles y algunas plantas perennes con grandes raíces leñosas (De Luca et al., 2018). Estas especies se denominan colectivamente "árboles de coral", en alusión a las flores, características del género, que comúnmente son de color rojo brillante (Kumar et al., 2010). El lugar de origen del género *Erythrina* no se conoce con exactitud, pero se sugiere que probablemente fue en América del Sur, ya que allí se encuentran la mayoría de los supuestos grupos "primitivos" dentro del género. Se reconocen 70 especies en el Neotrópico, 38 en África y Madagascar y 12 en Asia y Australia (De Luca et al., 2018).

Al género *Erythrina* se le atribuyen múltiples propiedades benéficas que han llevado a su uso popular en la terapéutica de la medicina tradicional, donde hojas, corteza y semillas, son comúnmente utilizadas para aliviar trastornos de la salud relacionados con dolor, inflamación y ansiedad (Bernardino-Nicanor et al. 2016). Las diferentes partes de las plantas del género *Erythrina* han sido utilizadas en diferentes ámbitos, desde estudios químicos o farmacológicos, hasta usos culinarios u ornamentales (da Silva et al. 2013).

Sin embargo, las flores rara vez se han estudiado y el potencial efecto biológico sigue siendo desconocido.

Las semillas, hojas y flores de algunas especies género *Erythrina* se usan como alimento en África, México y América Central (Pires *et al.*, 2019; Sotelo, López-García, y Basurto-Peña 2007; Takahashi *et al.* 2020). Particularmente en varias comunidades del Estado de Hidalgo, las inflorescencias de *E. americana* conocida como “pemuche o colorín” se comen hervidas o capeadas y en infusión se emplean como sedantes o hipnóticos (García-Mateos *et al.* 2001). En este escenario, las flores representan un segmento importante de estudio debido a la composición química y presencia de compuestos bioactivos que puedan brindar beneficios farmacológicos (Takahashi *et al.*, 2020).

Aunque existen datos etnobotánicos locales sobre el uso del género *Erythrina* para aliviar el dolor y la inflamación, se han publicado pocos estudios preclínicos para evaluar el efecto farmacológico. Una cantidad aún menor describe la actividad biológica y el potencial terapéutico del género para este propósito. Además, no se ha analizado la relación entre las propiedades antioxidantes y el efecto antiinflamatorio. Existen algunos trabajos que documentan el uso etnomedicinal de diferentes especies del género *Erythrina* en el tratamiento del dolor y/o inflamación, tales como: *E. abyssinica*, *E. caffra* y *E. arborences* son las especies más utilizada en la medicina tradicional. En la **Tabla 2** se muestra un resumen de las especies del género *Erythrina* usadas en la medicina tradicional para el alivio del dolor o la inflamación, se indica la parte del árbol utilizada, el método de preparación y su uso etnomedicinal. La corteza y las hojas son las partes de la planta que comúnmente se utilizan con fines medicinales. La decocción es la forma habitual de preparación, el líquido obtenido se ingiere o se aplica externamente sobre la zona afectada.

Tabla 2. Especies del género *Erythrina* para el alivio del dolor y la inflamación.

<i>Especie</i>	<i>Parte usada</i>	<i>Padecimiento</i>	<i>Administración</i>	<i>Referencia</i>
<i>E. abyssinica</i>	Corteza	Inflamación, dolor de espalda, dolor y calambres en la parte baja del abdomen.	Decocción, uso externo, extracto bebido y hervido en leche.	(Pompermaier <i>et al.</i> , 2018; Maroyi, 2011; Schlage <i>et al.</i> , 2000).
<i>E. arborences</i>	Rama, semilla y hojas	Fractura de hueso y dolor de espalda.	Fomento, decocción oral, jugo de hojas	(Lee <i>et al.</i> , 2008; Wangchuk <i>et al.</i> , 2017)
<i>E. caffra</i>	Corteza, hojas y raíces	Esguinces, dolores	Decocción oral, gotas para los oídos y emplastos	(El-Masry <i>et al.</i> , 2010; Corrigan <i>et al.</i> , 2011; Dzoyem <i>et al.</i> , 2014)
<i>E. caffra</i> <i>E. lysistemon</i>	Corteza de tallo y hojas	Dolor de muelas y dolor de oídos	Infusión oral	(Mhlongo and Van Wyk, 2019)
<i>E. edulis</i>	Corteza	Dolor de cabeza	Bebida de infusión acuosa	(Tene <i>et al.</i> , 2007)
<i>E. humeana</i>	Corteza	Esguinces	Decocción, uso externo	(Corrigan <i>et al.</i> , 2011)
<i>E. senegalensis</i>	Corteza	Inflamación y dolor de espalda	Decocción, uso externo, masaje con ungüento.	(Togola <i>et al.</i> , 2008)
<i>E. variegata</i>	Hojas y corteza	Fiebre, dolor de cuerpo, bronquitis crónica y otalgia.	Decocción, oral	(Kamble <i>et al.</i> , 2018)
<i>E. americana</i>	Flores y frutos	Dolor de muelas, inflamación de brazos, piernas, cabeza y ojos	No especificado, oral y externo	(de Arajo-Junior <i>et al.</i> , 2012)

2.3 Estrés oxidativo en la salud humana

El estrés oxidativo (EO) es un fenómeno causado por un desequilibrio en la producción de radicales libres (RL) y los antioxidantes (Pizzino *et al.*, 2017), lo que conduce a diversas alteraciones en biomoléculas de importancia (lípidos, ácidos nucleicos y proteínas), que finalmente definen una condición patológica (Pisoschi *et al.*, 2021).

Durante las funciones metabólicas normales, se generan estos compuestos altamente reactivos llamados RL (Liguori *et al.*, 2018; Pizzino *et al.*, 2017). La cadena respiratoria en las mitocondrias, es el principal sitio de producción de RL derivados del oxígeno (Gagné, 2014). Además de las mitocondrias, los RL son producidos por una variedad de enzimas como las NADPH oxidasas (NOX),

la xantina oxidasa, la óxido nítrico sintasa y los componentes peroxisomales (Juan *et al.*, 2021).

En química, un RL es una molécula relativamente inestable que contiene uno o más electrones desapareados, por lo que puede reaccionar con otras moléculas, ya sea donando su electrón desapareado o quitándoselo a otra molécula para aumentar su estabilidad (Gagné, 2014; Juan *et al.*, 2021). De esta forma convierte la molécula con la que reacciona en otro RL, por lo que las reacciones entre RL se convierten en un proceso en cadena: un radical da lugar a otro radical. Este proceso solo cesa cuando dos RL reaccionan entre sí (Juan *et al.*, 2021). Estas moléculas incluyen principalmente RL típicos que contienen al menos un electrón desapareado (superóxido $O_2^{\cdot-}$, radical hidroxilo $\cdot OH$) y peróxidos de hidrógeno (H_2O_2) (Luo *et al.*, 2020). El óxido nítrico (ON), un gas inorgánico de corta duración (unos pocos segundos) pero de alta solubilidad, difunde libremente a través de las membranas biológicas y en concentraciones altas, puede interactuar con el $O_2^{\cdot-}$ lo que lleva a la formación del potente $OONO^{\cdot-}$ que causa severo daño celular (Liguori *et al.*, 2018; Yarube *et al.*, 2019).

En condiciones fisiológicas normales el cuerpo humano está en un estado equilibrado, con RL continuamente generados y degradados. Estos procesos están regulados por un conjunto de compuestos antioxidantes (tioles reducidos, vitaminas C y E y catecolaminas) y sistemas enzimáticos (superóxido dismutasa, peroxidasa, catalasa y glutatión reductasa) con la finalidad de proteger la integridad de células o tejidos (Gagné, 2014), como se puede ver en la **Figura 1**.

El delicado equilibrio entre los antioxidantes y la producción de RL puede verse comprometido cuando la producción de estas moléculas sobrepasa la actividad de las defensas (Liguori *et al.*, 2018). La producción excesiva de especies reactivas de oxígeno y/o nitrógeno (EROs, ERNs) juega un papel muy importante en muchas patologías, debido a que son factores de riesgo para

muchas enfermedades, por lo que se dedica mucho esfuerzo (y dinero) al diagnóstico y tratamiento tempranos del mismo (Pinchuk *et al.*, 2021).

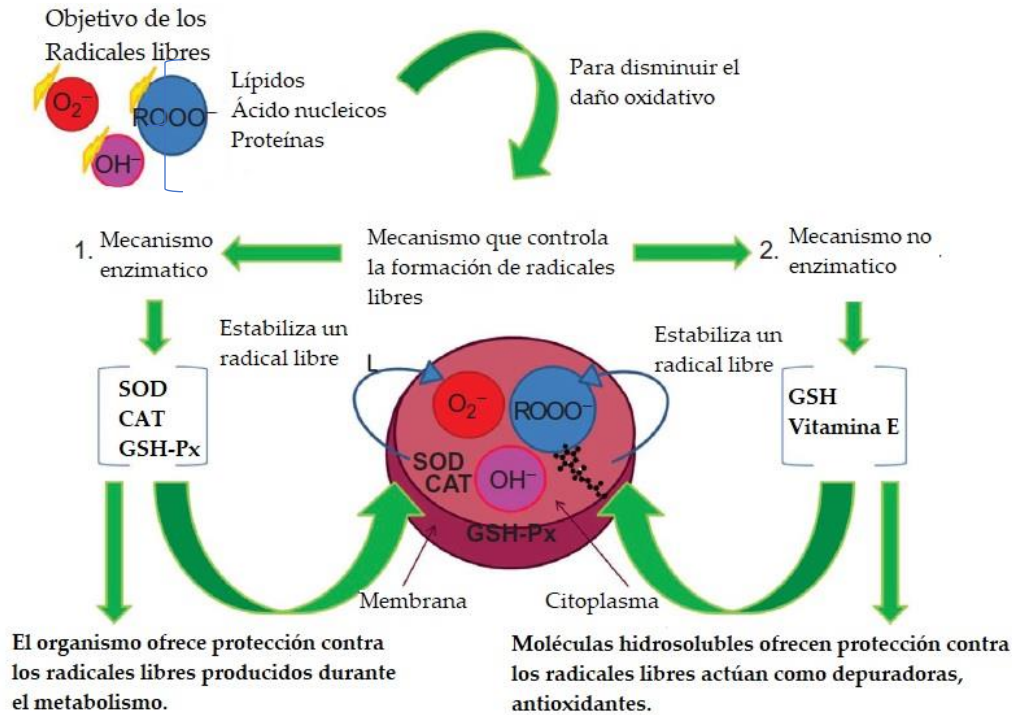


Fig. 1. Mecanismos de protección contra radicales libres. (1) El mecanismo enzimático controla la formación y el destino de los radicales o sustancias tóxicas generadas por la misma célula; este mecanismo está constituido principalmente por superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH-Px). (2) Mecanismo no enzimático. Los componentes más importantes son el glutatión (GSH) y la vitamina E. Las características más importantes son que actúan como "captador" de radicales libres y antioxidante. (Tomado y modificado de (Ortiz *et al.*, 2017).

2.4 Fisiopatología del estrés oxidativo

El estrés oxidativo podría resultar de lo siguiente: (1) la presencia de xenobióticos, (2) la activación del sistema inmunitario en respuesta a los microorganismos invasores (inflamación) y (3) radiación, que hace del estrés oxidativo un denominador común de toxicidad o estrés (Juan *et al.*, 2021). Se ha observado que los trastornos metabólicos, la inflamación y el estrés oxidante son los procesos más importantes involucrados en la progresión de diversas enfermedades no transmisibles (Seyedsadjadi & Grant, 2021).

Actualmente se sabe que el papel del estrés oxidativo en la progresión de las enfermedades, no solo radica en la oxidación de biomoléculas de importancia, sino que es cada vez más evidente el papel de las EROs en las vías de señalización celular (Bjørklund & Chirumbolo, 2017; Russell & Cotter, 2015). Pueden desempeñar una función de señalización, al igual que otras moléculas como las hormonas o las citoquinas (Bjørklund & Chirumbolo, 2017). Las EROs actúan como un componente de señalización intracelular y se asocian con diversas respuestas inflamatorias (Madkour, 2020).

Así mismo, se sabe que los receptores de potencial transitorio subfamilia M miembro 2 (TRPM2) se activa mediante ADPR intracelular, estrés oxidativo y calor moderado en varios tipos de células (Jang *et al.*, 2018). Además, informes recientes han demostrado, canales catiónicos permeables al Ca^{2+} son activados de manera potente por EROs. Este pertenece a una familia o superfamilia (por la cantidad de subtipos) de canales iónicos regulados por ligandos, denominados TRP (del inglés Transient Receptor Potencial). El papel de los canales de TRPM2 se destaca en los trastornos neurológicos, especialmente en la isquemia transitoria, aunque su papel y significado se encontró particularmente en la inmunidad innata y la inflamación (Bjørklund & Chirumbolo, 2017).

Otros estudios exploran la relación del estrés oxidante sobre los procesos de dolor. Donde se ha demostrado que las EROs facilitan el procesamiento nociceptivo en la amígdala y contribuyen a mejorar el comportamiento del dolor. De igual forma, las EROs son importantes agonistas endógenos del potencial transitorio ankyrin 1 (TRPA1), un canal catiónico no selectivo permeable al calcio expresado en una subpoblación de nociceptores aferentes primarios en astrocitos y oligodendrocitos. Lo que sugiere que el EO mediante TRPA1 promueve el comportamiento del dolor neuropático (Sagalajev *et al.*, 2018a).

2.5 Estrés oxidativo y su papel en el dolor y la inflamación

Existe evidencia que demuestra la actividad de los RL en el proceso inflamatorio, un proceso complejo que se presenta en muchas enfermedades humanas (Biswas *et al.*, 2017). Actualmente, se acepta que el $O_2^{\cdot-}$ es un mediador importante en el dolor y la inflamación. Su papel se ha determinado principalmente de forma indirecta modulando su producción e inactivación en modelos de dolor (Maioli *et al.*, 2015). Antioxidantes como la quercetina, inhiben el comportamiento de dolor, en la hiperalgesia mecánica inducida por carragenina al disminuir la producción de interleucina- 1β y reducir la depleción de GSH (Maioli *et al.*, 2015). Asimismo, se ha descubierto que las EROs facilitan el procesamiento nociceptivo en la amígdala y contribuyen a inducir el comportamiento del dolor (Sagalajev *et al.*, 2018b). Estudios dedicados a los mecanismos moleculares implicados en la aparición y el progreso de la caries articular en la artritis reumatoide, han concluido que el EO puede resultar en un aumento de la inflamación y viceversa. Una gran cantidad de factores de transcripción se activan a través del estrés oxidativo, dichos factores se asocian con la expresión de proteínas involucradas en las vías inflamatorias (Swamy, 2020). La capacidad antioxidante de diversos compuestos demuestra el poder para eliminar las especies libres de oxígeno y nitrógeno, producidas en el estrés oxidativo, mitigando la promoción enzimática de la actividad proinflamatoria. Modulando la expresión de ciclooxigenasa (COX), lipoxigenasa (LOX) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Swamy, 2020). Donde el EO es tanto la causa como la consecuencia de la inflamación. Se considera que principalmente el H_2O_2 puede activar la vía NF- κ B, por lo que el EO participa en la desregulación a nivel de señalización molecular que se observa en la artritis reumatoide, incluso desde fases tempranas (Pisoschi *et al.*, 2021).

Se ha visto que las EROs también pueden tener efectos pronociceptivos en modelos de dolor animal. Dado que, se han detectado marcadores de estrés oxidativo elevados en la médula espinal en el modelo de ratón con dolor

inducido por capsaicina, en el músculo de la pata trasera del modelo CRPS de dolor posisquémico crónico (CPIP) y en modelos de dolor crónico por inmovilización con yeso. Así también, la administración de los captadores de radicales libres N-acetilcisteína (NAC) y 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxilo (TEMPOL) y Vitamina C, reducen la alodinia mecánica en el modelo CPIP (Guo et al., 2018). No obstante, el dolor y la inflamación son procesos complejos que aún siguen siendo estudiados (Tompkins *et al.*, 2017).

2.6 Dolor e inflamación

El dolor se define tradicionalmente como una experiencia sensorial y emocional compleja asociada con daño tisular real o potencial o descrito en términos de dicho daño (Hudspith, 2016; Lee & Neumeister, 2020). Es un proceso complejo que involucra vías neuronales de señalización entre el sistema nervioso periférico (SNP) y el sistema nervioso central (SNC). La transducción de estímulos nocivos (aquellos que dañan real o potencialmente al tejido) se lleva a cabo por un nociceptor, creando una señal electrofisiológica codificada en forma de potencial de acción que se transmite al SNC. La lesión aguda se asocia con una primera sensación de dolor bien localizada, transducida y transmitida por nociceptores (Lee & Neumeister, 2020). Aunque el dolor es una de las adaptaciones y protección más importantes del cuerpo, el grado de daño tisular promueve la afluencia de células activadas como macrófagos, linfocitos y mastocitos que liberan mediadores inflamatorios como bradicinina, iones H^+ , ATP, purinas, prostaglandinas E_2 , leucotrienos, citocinas, factor de crecimiento nervioso (NGF, por sus siglas en inglés), aminas simpáticas y productos de estrés oxidativo, presentes en la membrana de los nociceptores. Estas sustancias se unen a sus receptores, desencadenando una cascada enzimática, que genera el dolor inflamatorio (Tompkins *et al.*, 2017).

La inflamación es una respuesta inmune compleja a los estímulos nocivos, como una infección, lesión o irritación (Hudspith 2016). La respuesta inflamatoria representa una serie de procesos fisiológicos bien orquestados que ocurren después de una lesión o infección en un intento de combatir y resolver dicha patología. Ésta se caracteriza por cinco síntomas clásicos: rubor (enrojecimiento), calor (aumento de temperatura), tumor (hinchazón), dolor y pérdida de función (Ronchetti *et al.* 2017). Se caracteriza por la infiltración y activación de las células inmunes y la posterior producción de citocinas proinflamatorias. El sistema inmune innato, juega un papel importante en la generación de esta respuesta. Sin embargo, aunque inicialmente la activación del sistema inmune es un mecanismo adaptativo que promueve la supervivencia del organismo, la inflamación crónica es un importante factor etiopatogénico en muchos trastornos metabólicos y enfermedades asociadas a la edad (Fernández-Viadero *et al.* 2016).

En condiciones normales, la inflamación es un importante mecanismo de protección esencial para la cicatrización de heridas (Kidd & Urban, 2001). A pesar de esto, la inflamación aguda produce dolor manifiesto a través de la activación directa de neuronas sensoriales que conducen la señal de dolor (Chen *et al.*, 2013) Las citocinas IL-1 β , TNF α e IL-6, producidas por neutrófilos, mastocitos y macrófagos, son mediadores críticos en casos agudos y respuestas inflamatorias crónicas (Lee & Neumeister, 2020). Muchos modelos de dolor persistente se basan en la inflamación para producir respuestas de dolor sólidas y fiables (Muley *et al.*, 2016).

La activación de un subconjunto de neuronas sensoriales, de diámetro pequeño, tales como las fibras A δ finamente mielinizadas o fibras C amielínicas, llamados nociceptores (ver **Tabla 3**), conducen la información del estímulo nocivo desde la periferia hasta el asta dorsal de la médula espinal.

Tabla 3. Nociceptores periféricos

Tipo	Característica	Función
Fibras A δ	Diámetro medio, mielinizado Diámetro largo, mielinizado Conducción rápida	Detectar estímulos nocivos. (primer dolor) Detectar estímulos inocuos.
Fibras C peptidérgicas	Diámetro pequeño, sin mielinizar Conducción lenta	Neuropéptido de liberación, SP, CGRP, etc. (segundo dolor)
Fibras C no peptidérgicas	Diámetro pequeño, sin mielinizar Conducción lenta	Expresar los receptores c-ret, Mediar los estímulos nocivos junto con fibras C peptidérgicas

*SP: sustancia P; CGRP: péptido relacionado con el gen de la calcitonina

Estas neuronas sensoriales especializadas tienen velocidades de conducción lentas y generalmente se activan por estímulos térmicos y/o mecánicos de umbral alto o por estímulos químicos. Aunque las neuronas sensoriales inervan los tejidos cutáneos, musculares, articulares y viscerales de todo el cuerpo, tienen un solo axón que atraviesa desde los tejidos periféricos hasta el asta dorsal de la médula espinal (**Figura 2**) (Chen *et al.*, 2013; Kidd & Urban, 2001). Los cuerpos celulares de estas neuronas se localizan en los ganglios de la raíz dorsal, en los ganglios del trigémino para las neuronas sensoriales que inervan la cabeza y el cuello, y en el ganglio nudoso para las neuronas sensoriales que inervan gran parte de las vísceras. Dada su función, estas neuronas también se denominan neuronas aferentes primarias. Las neuronas sensoriales nociceptivas forman conexiones sinápticas en neuronas nociceptivas específicas o de amplio rango dinámico del asta dorsal en las láminas I, II y V de la médula espinal, que luego conducen la señal nociceptiva a los sitios supraespinales, incluidos los núcleos del tronco encefálico, el tálamo, el hipotálamo, etc.(Chen *et al.*, 2013; Kidd & Urban, 2001).

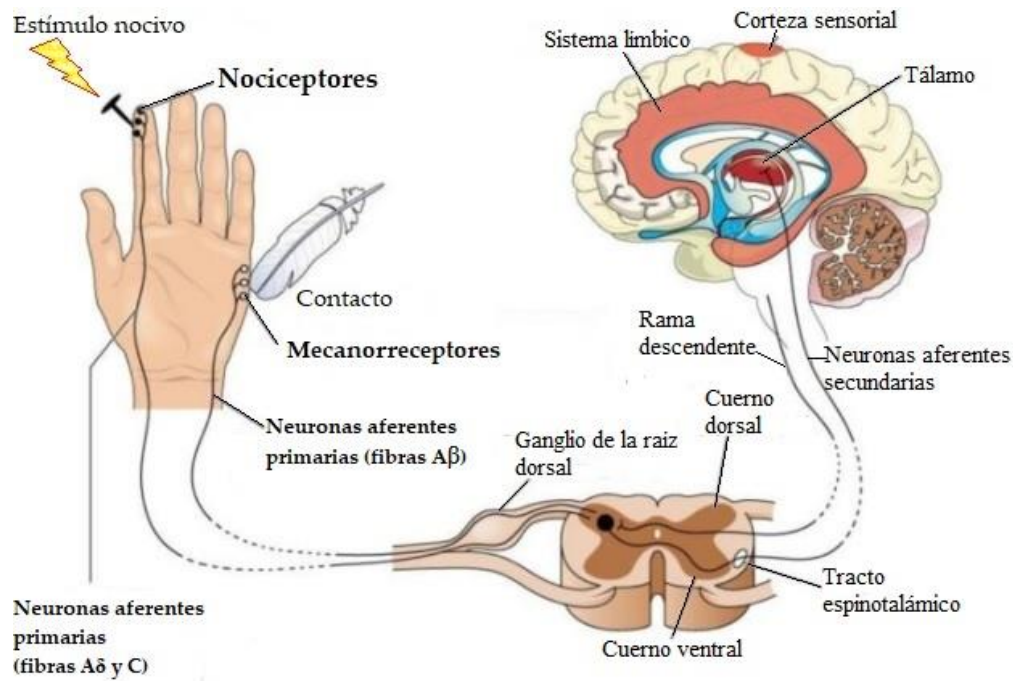


Fig. 2. Proceso de nocicepción. Nociceptores aferentes peptidérgicos y no peptidérgicos A δ y nociceptores C, aferentes mecanorreceptivos de bajo umbral A β , proveen señales de entrada a neuronas de proyección e interneuronas en diferentes láminas del asta dorsal. Los aferentes peptidérgicos transmiten estímulos calóricos dolorosos, los aferentes no peptidérgicos transmiten dolor mecánico inducido. Los mecanorreceptores A β transmiten impulsos no dolorosos de bajo umbral mecanotáctil involucrados en el tacto discriminatorio. (Obtenido y modificado de Liferder.com)

Los estímulos que activan directamente los nociceptores incluyen temperaturas superiores a 42 ° C o inferiores a 17 ° C, estímulos mecánicos de alta presión y un aumento en la concentración de protones. La activación se produce cuando la estimulación térmica, mecánica o química provoca una despolarización suficiente como para inducir la activación de un potencial de acción. El resultado de la activación de distintos receptores aumenta su permeabilidad a los cationes y por tanto, generan corrientes hacia el interior. Los receptores prominentes incluyen canales de potencial receptor transitorio (TRP) como TRPV1 (activado por capsaicina, calor, protones) y TRPA1 (activado por frío) (Lee & Neumeister, 2020) (**Figura 3**).

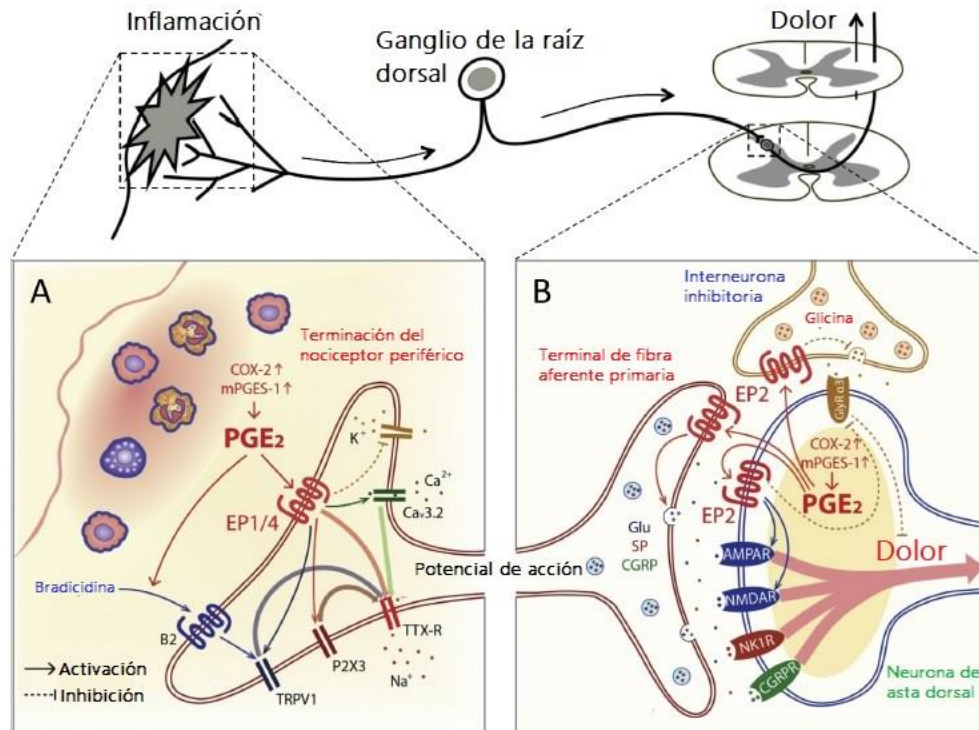


Fig. 3. Mecanismos moleculares del dolor. Son mediados por la PGE₂ que inducen hipersensibilidad al dolor en la inflamación. (A) COX-2 y mPGES-1 se regulan positivamente, tanto en las células lesionadas como en las células inmunes infiltrantes en los tejidos inflamados, aumentando las concentraciones de PGE₂ en las terminales de los nociceptores periféricos. PGE₂ también ejerce efectos indirectos, mejorando la sensibilidad de las neuronas sensoriales a la bradicinina. (B) La inflamación regula positivamente la expresión de COX-2 y mPGES-1 en la médula espinal y aumenta la producción de PGE₂ que actúa principalmente sobre el receptor EP2. A nivel presináptico, PGE₂ facilita la liberación espinal del neurotransmisor excitador glutamato (Glu), sustancia P (SP) o péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), lo que da como resultado un procesamiento nociceptivo mejorado. A nivel postsináptico, PGE₂ activa directamente las neuronas del asta dorsal, mejora la actividad AMPAR y NMDAR, o bloquea la neurotransmisión glicinérgica inhibitoria. (TRPV1, potencial receptor transitorio subtipo V1; TTX-R, canales de sodio resistentes a tetrodotoxina; NMDAR, receptor de ácido N-metil-d-aspártico; AMPAR, receptor de quisqualato; NK1R, neuroquinina-1 receptor; CGRPR, receptor CGRP). (Tomado y modificado de Chen *et al.*, 2013)

Los receptores adicionales incluyen canales iónicos sensibles al ácido activados por protones, receptores del canal P2X activados por ATP, receptores activados por proteinasa, activados por tripsina o triptasa, receptores nicotínicos de acetilcolina, receptores de glutamato y receptores de bradicinina. Una vez que los nociceptores se despolarizan, los potenciales de acción viajan desde la periferia hasta la médula espinal dorsal. En las terminales nerviosas sensoriales de la médula espinal, los potenciales de acción entrantes despolarizan sus terminales nerviosas centrales, provocando

la liberación de neurotransmisores como el glutamato, sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (**Figura 3**)(Chen *et al.*, 2013). Una vez liberados, estos transmisores activan receptores en las neuronas del asta dorsal que despolarizan estas células.

Por lo tanto, en términos generales, en la conducción de la información del dolor desde el sitio de la lesión o inflamación, las neuronas sensoriales transducen energías mecánicas, térmicas o químicas en señales eléctricas que luego se convierten, mediante la liberación de transmisores, en un proceso de señalización química en la médula espinal (Ellison, 2017; Hudspith, 2016; Lee & Neumeister, 2020).

Varios mediadores inflamatorios no producen dolor manifiesto, sino sensibilización periférica. Estos agentes actúan uniéndose a receptores en neuronas sensoriales que a su vez activan cascadas de transducción de señales que provocan modificaciones postraduccionales de los canales iónicos y/u otras proteínas que aumentan la excitabilidad de las neuronas sensoriales (Muley *et al.*, 2016). Los mediadores inflamatorios clásicos que producen sensibilización periférica son las prostaglandinas, PGE₂ y PGI₂. Estos compuestos se sintetizan y liberan en respuesta a una lesión aguda y/o después de una inflamación crónica por las acciones de las ciclooxigenasas sobre el ácido araquidónico (Kakavandi *et al.*, 2021). Por ello, el principal mecanismo que produce los efectos analgésicos de fármacos antiinflamatorios no esteroideos es la inhibición de las ciclooxigenasas, que previene la síntesis de prostaglandinas. Otros compuestos que se sintetizan y liberan durante la inflamación y que contribuyen a la sensibilización periférica, incluyen citocinas (IL-1 β , TNF α e IL-6) y quimiocinas, factor de crecimiento nervioso (NFG) y otros factores tróficos, ácido lisofosfatídico, esfingosina-1-fosfato (S1P), 5-hidroxitriptamina (5-HT) y endotelina-1 (ET1)(Muley *et al.*, 2016). Las PGE₂ se unen a sus receptores acoplados a proteínas (EP1 y EP4) aumentando la producción de AMPc con activación de la proteína quinasa A (PKA) y factores de intercambio activados por AMPc (Epacs). La bradicinina y la unión de ATP a sus receptores, aumenta la actividad de la fosfolipasa C β , que libera trifosfato

de inositol (IP3), liberando calcio de las reservas intracelulares y diacilgliceroles (DAG), que activan la proteína quinasa C (PKC). A su vez PKA y PKC fosforilan los canales iónicos activados por voltaje y por ligando que aumentan la excitabilidad de las neuronas sensoriales (Chen *et al.*, 2013; Kakavandi *et al.*, 2021). El NGF y las citocinas, causan sensibilización periférica al unirse a receptores de tirosina quinasa (TC) o receptores similares al TNF, lo que activa una serie de vías de señalización descendentes involucradas con la modificación postraducciona l de proteínas en neuronas sensoriales (Hudspith, 2016). Los efectores activados por NGF y receptores de citocinas incluyen fosfolipasa C γ (PLC γ), PI3 quinasas y proteínas G pequeñas como *ras*. La activación de PLC γ libera PI3 y DAG, mientras que las PI3 quinasas activan otra proteína quinasa, AKT, y las proteínas G pequeñas activan las MAP quinasas (p38, ERK, JNK)(Lee & Neumeister, 2020). La sensibilización periférica se mantiene durante la inflamación crónica por dos factores principales: el mantenimiento de la respuesta inflamatoria y/o inmunitaria a lo largo del tiempo y la capacidad de los mediadores inflamatorios para aumentar la expresión génica de neurotransmisores, receptores o proteínas de canal que aumentan la excitabilidad de las neuronas sensoriales nociceptivas. Las citocinas contribuyen a mantener la hipersensibilidad aumentando la expresión de ciclooxigenasa (COX2) en varios tejidos con un aumento concomitante de la producción de prostaglandinas (Chen *et al.*, 2013; Kakavandi *et al.*, 2021). Llegados a este punto, es importante destacar que el manejo efectivo del dolor y la inflamación representa un desafío en la investigación clínica, ya que la disciplina científica del manejo del dolor es un campo de investigación relativamente nuevo (Tompkins *et al.*, 2017)

2.7 Antioxidantes naturales y su papel en el alivio del dolor

Los hábitos dietéticos son aspectos fundamentales para evaluar y modular la salud y el bienestar, pero, además, diferentes paneles nutricionales pueden ayudar a las personas a prevenir el dolor agudo y crónico. Sin embargo,

actualmente, la terapia con medicamentos es el régimen de tratamiento principal para resolver el dolor, pero desafortunadamente, los tratamientos actuales no son completamente efectivos y conllevan a diversos efectos adversos (Farrar *et al.* 2017; Nesbit *et al.* 2020).

Originalmente se pensaba que los efectos antioxidantes eran directos, es decir que actuaban solamente mediante la captación de RL. Sin embargo, se han identificado otros posibles mecanismos bioquímicos y moleculares, que incluyen la modulación de vías de señalización intercelular e intracelular. Tal como la regulación de los factores de transcripción nuclear y el metabolismo de las grasas; la modulación de la síntesis de mediadores inflamatorios, incluidas las citoquinas, el factor de necrosis tumoral α , y las interleucinas (IL) -1β , e IL-6 (Fraga *et al.* 2019).

Varias líneas de evidencia han demostrado que el receptor de capsaicina (vanilloide) TRPV1, puede ser activado por una multitud de activadores primarios (p. ej., protones y "endovaniloides") y moduladores secundarios (p. ej., factor de crecimiento nervioso, bradicinina, prostaglandinas y trifosfato de adenosina), luego provoca la liberación de neuropéptidos (Péptido relacionado con el gen de la calcitonina), aminoácidos excitadores, óxido nítrico y mediadores proinflamatorios en la periferia, que a su vez transmiten información nociceptiva a la médula espinal (Shi *et al.*, 2011). Dado que se ha demostrado que los agentes antioxidantes, pueden modular la síntesis de mediadores inflamatorios, su papel en la antinocicepción puede ser muy importante.

2.8 Estudios preclínicos de dolor e inflamación del género *Erythrina*

Existen estudios preclínicos sobre el efecto analgésico y antiinflamatorio de algunas especies del género *Erythrina*, como los que se muestran en la **tabla 4**. *E. variegata* fue la especie más estudiada, tanto por su efecto analgésico, como antiinflamatorio (Bhagyasri *et al.*, 2017; Fahmy *et al.*, 2018; Haque *et al.*, 2006; Muhammad *et al.*, 2014), seguida de *E. velutina* y *E. mulungu* (Marchioro *et al.*, 2005; Vasconcelos *et al.*, 2010, 2014). En su mayoría, se

utilizaron disolventes de alta polaridad (etanol, agua y metanol) para obtener los extractos. Esto sugiere que la actividad biológica demostrada, en los diversos estudios, se debió en gran parte a los compuestos polares. Dos flavanonas (sigmoidina A y B), un flavonoide prenilado (abisinona V-40-metil éter), una prenilisoflavona (warangalona) y un pterocarpano (ericristagalina), demostraron propiedades antiinflamatorias en dosis de 300 a 600 mg/kg (Cui *et al.*, 2008; Sokeng *et al.*, 2013), todos los compuestos demostraron una marcada eficacia antiinflamatoria. Los mecanismos antiinflamatorios sugeridos incluyen la inhibición de prostaglandinas y ciclooxigenasas. Los fármacos de referencia más utilizados en los modelos de dolor fueron la morfina y el diclofenaco. Mientras que para los modelos de inflamación fueron indometacina, diclofenaco y dexametasona y en algunos casos se utilizó ácido acetilsalicílico y pentazocina. En general, todos los estudios preclínicos coinciden en que cada especie estudiada tiene un efecto analgésico y/o antiinflamatorio. También se mencionaron los efectos antagonistas de la histamina y/o la serotonina. Aunque sus causas no están aclaradas, el bloqueo de los receptores HR y 5-HT están relacionados. Asimismo, se destaca la participación de la actividad antioxidante en la regulación de procesos antiinflamatorios y analgésicos mediante la inhibición del ON. Según los autores, los compuestos implicados en estos mecanismos son principalmente flavonoides. Sin embargo, también se menciona que los alcaloides erisotrina, erisotrina hipoforina, redujeron el número de células inflamatorias en el tejido pulmonar, principalmente eosinófilos y linfocitos.

Posiblemente debido a la disminución de IL-4 e IL-5, que estimulan la maduración de eosinófilos en la médula ósea y reclutan estas células a los tejidos. A su vez, esto puede afectar la modulación de la síntesis y liberación de mediadores inflamatorios, como prostaglandinas, óxido nítrico y citocinas como IL-1 y TNF. Los estudios de acoplamiento muestran que la faseolina de *Erythrina variegata* tiene la mejor puntuación de aptitud frente a la COX-1, que es 56.64 y 59.63 para la enzima COX-2. Sin embargo, es necesario

profundizar en los posibles mecanismos de acción, así como los fitoconstituyentes y su relación con la actividad biológica.

Tabla 4. Estudios preclínicos sobre el efecto analgésico y antiinflamatorio de especies del género *Erythrina*.

Especie	Extracto	Parte(s) usada	Modelo	Reference
<i>E. addisoniae</i>	EtOAc y MeOH	Corteza de tallo	Inhibición de la producción de leucotrienos B4 a partir de leucocitos polimorfonucleares de rata. Inhibición de ciclooxigenasa-1 (COX-1) de plaquetas humanas. Edema de pata en ratón inducido por PLAP ₂ . Edema de oreja de ratón inducido por TPA	(Talla <i>et al.</i> , 2003)
<i>E. lysistemon</i> <i>E. lysistemon</i> <i>E. latissima</i> <i>E. humeana</i> <i>E. zeyheri</i>	Etanol y acetato de etilo	Hojas y corteza	Inhibición de ciclooxigenasa-1	(Pillay <i>et al.</i> , 2001)
<i>E. indica</i>	MeOH	Hojas	Edema inducido por carragenina	(Verma <i>et al.</i> , 2005)
<i>E. droogmansina</i>	AcOEt y MeOH	Corteza de raíz flavonoide prenilado (abisinona V-4'-metil éter,)	Edema inducido por carragenina Edema de oído inducido por xileno Granuloma inducido por gránulos de algodón	(Sokeng <i>et al.</i> , 2013)
<i>E. crista-galli</i>	EtOH (70 %) Diclorometano MeOH	Partes aéreas	<i>Writhing</i> Formalina <i>Hot-palte</i>	(Fischer <i>et al.</i> , 2007)
<i>E. mildbraedii</i>	AcOEt	Corteza de raíz pterocarpano Ericristagalina	Edema inducido por carragenina Edema de pata en ratón inducido por PLAP ₂ . Edema de oreja de ratón inducido por TPA.	(Njamen <i>et al.</i> , 2003)
<i>E. mulungu</i>	EtOH y EtOH 30%	Flores y corteza de tallo	Asma inducida por ovoalbúmina (OVA) en ratones Edema de pata inducido por dextrano	(Amorim <i>et al.</i> , 2019; Silvânia M.M. Vasconcelos <i>et al.</i> , 2011; Silvânia Maria Mendes Vasconcelos <i>et al.</i> , 2003)
<i>E. senegalensis</i>	Acuoso y EtOH (70%)	Corteza y raíz	<i>Writhing</i> Edema de pata inducido por albúmina de huevo en ratas. <i>Hot-plate</i>	(Saidu <i>et al.</i> , 2000; Musa <i>et al.</i> , 2016)

<i>E. sigmoidea</i>	Cloroformo	Corteza (flavononas sigmoidina A y B)	Inhibición de leucotrienos B4 a partir de leucocitos polimorfonucleares de rata. Inhibición de COX-1 en plaquetas humanas. Edema de pata inducido por PLAP ₂ en ratón. Edema de oreja de ratón inducido por TPA.	(Njamen <i>et al.</i> , 2004)
<i>E. variegata</i>	MeOH, EtOH (95%), EtOH y Acuoso.	Hojas y corteza	<i>Writhing</i> <i>Tail-flik</i> Edema de la pata trasera inducido por carragenina. Granuloma inducido por gránulos de algodón. <i>Hot plate</i> Estabilización de membrana HRBC	(Haque <i>et al.</i> , 2006b; Krishna Raju Mantena & Tejaswini, 2015; Nasir Uddin <i>et al.</i> , 2014; Bhagyasri <i>et al.</i> , 2017)
<i>E. velutina</i>	EtOH (30%) y Acuoso.	Corteza de tallo y hojas	<i>Writhing</i> Formalina <i>Hot-plate</i> Edema de la pata trasera inducido por carragenina	(Silvânia Maria Mendes Vasconcelos <i>et al.</i> , 2003; Silvânia M.M. Vasconcelos <i>et al.</i> , 2011; Marchioro <i>et al.</i> , 2005)

2.9 Actividad antioxidante del género *Erythrina* en modelos *in vitro*

Existen varios métodos para investigar las propiedades antioxidantes de diferentes tipos de muestras. Se pueden clasificar en modelos antioxidantes *in vitro* e *in vivo* (Alam *et al.*, 2020). La actividad antioxidante de los extractos y / o compuestos de *E. abyssinica*, *E. livingstoniana* y *E. mildbraedii* se ha demostrado en diferentes estudios (Ali *et al.*, 2012; Anouar, 2016; Bedane *et al.*, 2015, 2016; MacHumi *et al.*, 2006). El ensayo de eliminación de radicales *in vitro* con DPPH fue la prueba más utilizada para determinar la capacidad de eliminación de radicales libres. En la mayoría de los estudios, se obtuvo una actividad similar e incluso mayor que la de los controles positivos (Trolox, BHA, ácido ascórbico y quercetina) (Bedane *et al.*, 2015, 2016; Gabr *et al.*, 2017; Robinson & Zhang, 2011; Tauseef *et al.*, 2013). También se ha evaluado la reducción de iones hierro (Fe), un ensayo que se utiliza a menudo como

indicador de la actividad de donación de electrones (FRAP). Además, se ha medido la actividad antioxidante *in vivo* de las enzimas SOD, CAT y GSH, para evaluar el potencial hepatoprotector de *Erythrina indica*, *senegalensis* y *neillii* en ratas. Donde se restauraron las actividades de las enzimas antioxidantes (p <0.05) (Janbaz *et al.*, 2012). La inhibición de la lipoxigenasa y la xantina oxidasa, enzimas que participan en la producción de especies reactivas de oxígeno y agentes proinflamatorios, han sido otras pruebas utilizadas (Ali *et al.*, 2012; Anouar, 2016; Umamaheswari *et al.*, 2009). Asimismo, la disminución de la peroxidación lipídica (TBARS) y la inhibición del NO se utilizaron para evaluar las propiedades antioxidantes (Mujahid *et al.*, 2017; Ozawa *et al.*, 2010; Sowndhararajan *et al.*, 2012). Entre los compuestos responsables de estas actividades están: erivarina H, abisinona V, mildbona, mildbenona, 7,30-dihidroxi-40-metoxi-50- (3 metilbut-2-enil) flavanona, erilivingstonia H,7,30,40-trihidroxi-flavanona, trans-3,4,20, 40-tetrahidroxichalcona, erivarina J y ericrisagalina (Anouar, 2016; Bedane *et al.*, 2016; Gurmessa *et al.*, 2018; Peleyeju *et al.*, 2019; Yenesew *et al.*, 2000, 2003; C. Zhang *et al.*, 2014). El acoplamiento molecular flexible en la hemo oxigenasa, una importante proteína de estrés que participa en la protección celular, actividades antioxidantes y antiinflamatorias, se demostró con 2-O-galoil orientina, formando cuatro interacciones de unión con residuos, Arg 136 (dos interacciones), Met34 y Gly139 (Muhammad *et al.*, 2014). Por otro lado, se ha informado que el compuesto abisinona V aumenta el estrés oxidativo y reduce la resistencia al estrés en el modelo de *Caenorhabditis elegans* (Chukwujekwu *et al.*, 2016). Así mismo, muchos compuestos antioxidantes también se evalúan por su actividad citotóxica que promueve la apoptosis favoreciendo un entorno prooxidante. Esto depende en gran medida de las concentraciones utilizadas del compuesto. Sin embargo, se requieren estudios para ayudar a aclarar esta actividad.

Como se mencionó anteriormente, un aumento de radicales libres exacerba la respuesta inflamatoria. Asimismo, se ha observado que la suplementación con antioxidantes en modelos animales puede disminuir la sensibilización

periférica provocada por ROS. Por lo que se sugiere que compuestos con actividad antioxidante del género *Erythrina* pueden jugar un papel importante en la modulación del dolor inflamatorio. Aunque las plantas medicinales a menudo tienen muchos usos diferentes dentro y entre culturas, queda mucho por investigar sobre las especies de este género en términos de su potencial para tratar el dolor y la inflamación.

3. Justificación

Los opioides y los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), así como los antidepresivos y anticonvulsivantes, siguen siendo los fármacos más utilizados para aliviar el dolor agudo y crónico, sin embargo, éstos presentan una amplia gama de efectos adversos, motivo el cual, es necesario continuar con la búsqueda de nuevos fármacos con efecto analgésico. En este escenario, de manera tradicional también se recurre al uso de diversas especies de plantas medicinales para el alivio del dolor, por lo que, algunas especies vegetales han sido estudiadas por su morfología, distribución, farmacología y composición química, entre ellas el género *Erythrina*. Así mismo, las flores de *Erythrina americana* son muy apreciadas por sus usos ornamentales y también son empleadas en una variedad de platillos regionales en diversas comunidades de México. Además, estas flores se han utilizado en la medicina tradicional para tratar la inflamación de extremidades, úlceras, abscesos, así como dolor de espalda y dolor de muelas, entre otros padecimientos. Se han encontrado informes que detallan el uso etnomédico de al menos 30 especies diferentes de este género. Sin embargo, hasta ahora no existen estudios científicos que demuestren el efecto analgésico y antioxidante de las flores de *E. americana*.

Dada la creciente necesidad del uso de nuevas terapias para el tratamiento del dolor, se destaca el conocimiento popular sobre las plantas medicinales utilizadas para tal fin. Por lo que, el estudio de las flores comestibles de la *E. americana* puede contribuir con evidencia científica para demostrar el efecto analgésico, que se le atribuye en la medicina tradicional y podría ser una importante fuente de compuestos bioactivos, que contribuyan al desarrollo de fitofármacos para el tratamiento del dolor.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del extracto etanólico de las flores de *Erythrina americana* sobre la capacidad antioxidante *in vitro* y la actividad antinociceptiva *in vivo*, para contribuir con evidencia científica sobre el uso de esta especie en el tratamiento del dolor en la medicina tradicional.

4.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar el contenido fenólico por el método Folin-Ciocalteu y la capacidad antioxidante *in vitro* del extracto etanólico de *E. americana* mediante los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP.
- ✓ Determinar la toxicidad aguda del EEa estableciendo la dosis letal media (DL₅₀) de acuerdo con la OECD en ratas *wistar*.
- ✓ Evaluar el efecto antinociceptivo del EEa en los modelos de dolor *writhing*, *hot plate* y formalina.
- ✓ Analizar la posible participación de la vía del óxido nítrico (ON) en el mecanismo de acción del efecto antinociceptivo, a través de la administración de precursores e inhibidores de ON.
- ✓ Identificar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en el extracto mediante métodos fitoquímicos, cromatográficos y espectroscópicos.

5. Material y métodos

5.1 Obtención del extracto

5.1.1 Material vegetal

Las flores de *E. americana*, fueron colectadas en marzo de 2019, a las 10 am, en la comunidad de Xiquila, municipio de Huejutla de Reyes en el estado de Hidalgo (latitud 20°21'33" N Longitud 98°43'4" O). Se identificó un ejemplar en el Herbario del Área Académica de Biología del Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería de la UAEH.

5.1.2 Extracción

Las flores se limpiaron, quitando cualquier material vegetal ajeno a la muestra. Se secaron a temperatura ambiente y en la sombra sin exposición a la luz solar. Posteriormente, las flores se pesaron (998g), se fragmentaron mediante un molino mecánico y fueron sometidas a un proceso de extracción por maceración, utilizando etanol como disolvente por 72 h, con agitación diaria. Este procedimiento se repitió 3 veces. El extracto se filtró a través del papel Whatman y se concentró mediante un evaporador rotativo BUCHI R-205, a presión reducida hasta obtener un extracto seco de color café oscuro (Djiogue *et al.* 2014; Amorim *et al.* 2018) (**Figura 4**).



Fig. 4. Proceso de extracción etanólica de flores de *E. americana*

5.2 Determinación de contenido fenólico total y capacidad antioxidante

5.2.1 Prueba para determinar contenido fenólico total

En la determinación de fenoles solubles totales se utilizó la metodología descrita por Ramírez-Moreno y colaboradores, la cual se basa en una reacción de óxido-reducción con el reactivo Folin-Ciocalteu. Dicha técnica se fundamenta en el cambio de color de amarillo a azul en presencia de compuestos fenólicos, esto se debe a que el reactivo de Folin Ciocalteu es una mezcla de ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico, la cual es reducida a óxidos azules de tungsteno y molibdeno durante la oxidación fenólica que ocurre en condiciones de pH alcalino (Ramírez-Moreno *et al.*, 2018).

Para realizar la curva de calibración se empleó como estándar ácido gálico (7.5mg/ 25 mL agua), el reactivo de Folin Ciocalteu se preparó en una relación 1:10 en agua destilada, y la solución de Na₂CO₃ se utilizó al 7.5%.

La curva de calibración con ácido gálico se construyó a una concentración de 0,100, 200 y 300 mg/L (ácido gálico/agua destilada). La concentración se determinó por espectrofotometría, midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm, en un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, Software KC Junior, Estados Unidos de América), utilizando como blanco agua destilada.

Para la medición de las muestras, se tomaron 100 µL de solución (5mg/mL) y se adicionaron 500 µL de Folin y 400 µL de solución de Na₂CO₃ en un tubo Eppendorf. Posteriormente se agitó el tubo en vortex (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Inc., NY, Estados Unidos de América). La muestra se dejó reposar 30 minutos a temperatura ambiente, y después se realizó la lectura de absorbancia en el lector de microplacas, a una longitud de onda de 765 nm. El análisis de las muestras se realizó por triplicado, los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por litro (mg EAG/L).

5.2.2 Prueba para determinar capacidad antioxidante con DPPH

El ensayo con el compuesto 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) se realizó de acuerdo con el procedimiento reportado por Morales y Jiménez-Pérez (Morales & Jiménez-Pérez, 2001). El DPPH es un radical libre susceptible a reaccionar con compuestos antioxidantes mediante la cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante (Guija, Inocente, Ponce, & Zarzosa, 2015).

Se preparó una solución con 7.4 mg de DPPH y 100 mL de etanol. Se realizó una curva estándar de Trolox (3.75 mg de Trolox en 50 mL de etanol) con las concentraciones de 0, 50, 100, 200, 300 μ L de Equivalentes Trolox por litro (μ L ET/L).

Posteriormente, se agregaron 100 μ L de cada muestra y 500 μ L de reactivo DPPH•. Esta mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante una hora. Se realizó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 520 nm en un lector de microplacas. Cada muestra se leyó por triplicado y los resultados de capacidad antioxidante se expresaron en micromoles equivalentes de Trolox por litro (μ mol ET/L).

5.2.3 Prueba para determinar capacidad antioxidante con ABTS

El ensayo con el ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS) se llevó a cabo de acuerdo con la metodología reportada por Kuskoski y colaboradores (Kuskoski *et al.*, 2005). Esta prueba es útil para medir la actividad antioxidante de compuestos tanto hidrofílicos como lipofílicos (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini-filho, & Fett, 2005). Se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del catión radical ABTS•+ derivado de la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones (Mesa-Vanegas *et al.*, 2010; Re *et al.*, 1999).

El procedimiento comenzó con la obtención del catión radical ABTS^{•+}, el cual se obtuvo tras la reacción de ABTS^{•+} 7 mM (76.8 mg de ABTS^{•+} en 20 mL de agua destilada) con persulfato potásico (2.45 mM, concentración final), incubados a temperatura ambiente y en oscuridad durante 16 horas. Posterior a la formación del radical ABTS^{•+}, se realizaron algunas diluciones de la solución hasta ajustar un valor de absorbancia comprendido entre 0.70 ± 0.1 a una longitud de onda de 754 nm (longitud de onda de máxima absorción).

Para la preparación de la curva estándar, se utilizó el reactivo Trolox (3.75 mg Trolox en 50 mL de etanol) y posteriormente se prepararon diluciones de 0, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 $\mu\text{mol/L}$. La lectura se realizó en un lector de microplacas a una longitud de onda de 754 nm.

5.2.4 Prueba para determinar capacidad antioxidante con FRAP

La prueba de la capacidad de reducción del hierro o poder antioxidante de la reducción férrica (FRAP, por sus siglas en inglés Ferric Reducing Antioxidant Power), se llevó a cabo de acuerdo con la metodología reportada por Pérez-Jiménez, que consiste en medir el incremento en la absorbancia a 593 nm (coloración azul) que tiene lugar cuando el complejo TPTZ-Fe⁺³ (Tripiridiltriazina -Fe⁺³) es reducido a TPTZ-Fe⁺² (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008). La capacidad antioxidante refleja la capacidad que tiene extracto para reducir especies férricas (Benzie & Strain, 1996; García *et al.*, 2011).

Para realizar el ensayo, se preparó el reactivo FRAP a una concentración 10:1:1 con 100 mL de solución amortiguadora (0.3 M, pH de 3.6), 10 mL de TPTZ (10mM en HCl) y 10 mL de FeCl₃ (20 mM en agua). Se realizó una curva estándar de FeSO₄ con las siguientes concentraciones: 0, 20, 30, 40, y 50 μM FeSO₄. Después se colocaron 30 μL de cada muestra y dilución, 90 μL de agua destilada y 900 μL de reactivo FRAP. Cada muestra se agitó en vortex y se incubaron en baño maría a una temperatura de 37°C durante 10 min. Luego de transcurrido este tiempo se realizó la lectura de la absorbancia en un lector de microplacas a una longitud de onda de 593 nm. Cada muestra se midió

por triplicado y se expresaron los resultados de capacidad antioxidante como micromoles de hierro (II) por litro ($\mu\text{mol Fe (II)/ L}$).

5.3 Consideraciones éticas para el uso de animales de experimentación

El manejo de los animales se realizó con estricto apego a la NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” y siguiendo el reglamento interno y principios éticos establecidos por el Comité Institucional Ético para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la UAEH. Todos los experimentos fueron realizados en el laboratorio de investigación del Bioterio de la UAEH, de acuerdo con los procedimientos descritos en el protocolo aprobado con número CICUAL011-2019.

Para determinar la dosis letal media (DL_{50}) y el efecto antinociceptivo en los modelos de dolor *Writhing* y *Hot plate* se utilizaron ratones de la cepa CD-1 machos de aproximadamente 30-35 g de peso, de 8 a 10 semanas de edad. En las pruebas con modelo de formalina se emplearon ratas Wistar macho de 10 semanas de edad, con aproximadamente 180 a 200g de peso. Los animales se mantuvieron en los cuartos de aislamiento en el Bioterio de la UAEH, en condiciones estándar de ciclo luz/oscuridad de 12 horas, a 22 °C y con control de humedad relativa del 45%. Se les proporcionó alimento y agua *ad libitum*. Previo a cada experimento, los animales se dejaron en privación de alimento por 12 horas.

5.4 Determinación de Dosis Letal Media (DL_{50})

La prueba de toxicidad aguda para determinar la DL_{50} se realizó siguiendo la guía de la OECD (2001). Este ensayo está basado en un procedimiento que usa un número mínimo de animales por etapa. Se utilizaron ratones CD1, distribuidos en 2 grupos ($n=3$). En la primera etapa se administró al grupo 1, una dosis de 2000 mg/kg del extracto etanólico de las inflorescencias de *E.*

americana (EEa), vía intragástrica, y vehículo al grupo 2. Estos animales se mantuvieron en observación individual después de la dosificación, con especial atención en las primeras 4 horas, y diariamente por un periodo de 14 días. La administración de la siguiente dosis, mayor (5000 mg/Kg) o inferior (300 mg/Kg) se decidió en función de las observaciones y sobrevivencia de los animales en la primera etapa. Al finalizar el periodo de observación, los animales se llevaron a eutanasia por dislocación cervical, para realizar el análisis macroscópico de los órganos.

5.5 Evaluación de la actividad antinociceptiva

Para evaluar el efecto antinociceptivo *in vivo* se emplearon tres modelos de dolor: *Writhing*, *Hot plate*, y Formalina. La distribución de los grupos experimentales fue la misma para los tres modelos de dolor. Los animales se distribuyeron en 6 grupos (n=6) de la siguiente manera: un grupo control negativo (CN) con la administración de vehículo; un grupo control positivo (CP) con la administración del fármaco de referencia, y 4 grupos con dosis diferentes del EEa: 100,178, 316 y 562 mg/Kg, vía intragástrica, para establecer curvas dosis respuesta en cada modelo. Al término de los experimentos en los modelos de dolor, los animales fueron sacrificados en la cámara de eutanasia con dióxido de carbono para evitar sufrimiento.

5.5.1 Modelo de *Writhing* para evaluar analgesia periférica

Este modelo permite evaluar la analgesia periférica en respuesta a un estímulo nociceptivo inducido por ácido acético. En este estudio se utilizaron 36 ratones CD1, distribuidos en 6 grupos.

Cada grupo fue tratado con las diferentes dosis del EEa (100,178, 316 y 562 mg/Kg), con indometacina (10mg/Kg) como fármaco de referencia o sólo vehículo (solución acuosa de Tween 80 al 1%) vía intragástrica respectivamente. Media hora después del tratamiento, recibieron una inyección intraperitoneal de ácido acético al 0,6% (0,1 ml/10 g) para la

inducción del dolor y enseguida se registró el número total de contracciones abdominales o estiramientos por periodos de 5 minutos: 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25 y 25-30, hasta completar un curso temporal de 30 minutos (**Figura 5**).

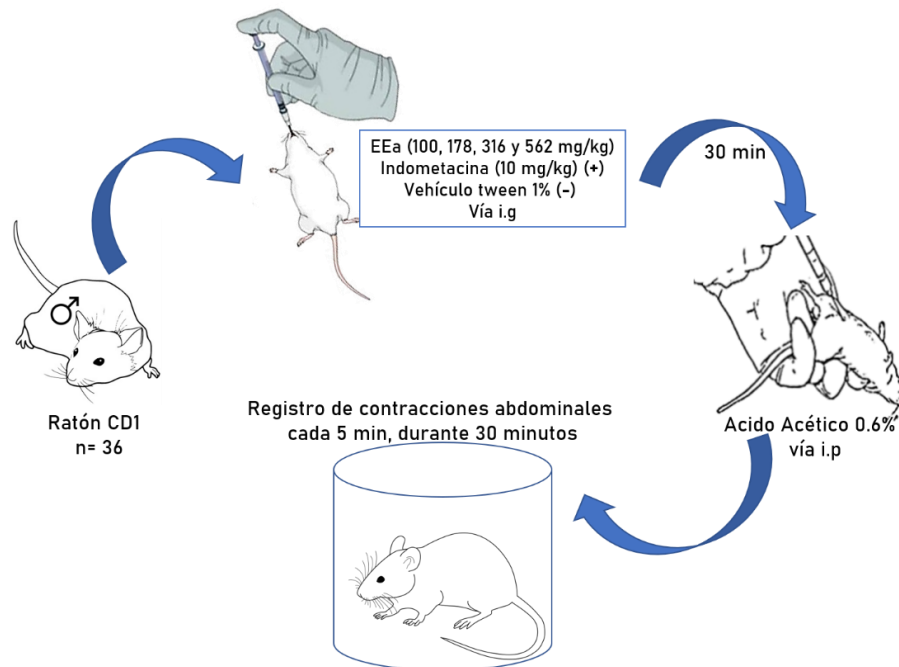


Fig. 5. Diseño metodológico del modelo *Writhing* para evaluar la analgesia periférica

5.5.2 Modelo de Hot-plate para evaluar analgesia a nivel central

Este modelo permite evaluar la actividad analgésica de sustancias similares a los opiáceos, ya que se observa la analgesia a nivel central, abarcando mecanismos neurogénicos y centrales de la nocicepción. En esta prueba se utilizaron 36 ratones CD1, con la distribución antes mencionada. Los grupos se trataron con diferentes dosis del EEa (316, 562 y 1000 mg/Kg), con tramadol como fármaco de referencia (56 mg/kg) o vehículo (solución acuosa de Tween 80 al 1%), vía intragástrica. 15 minutos después, se colocaron dentro de una caja acrílica, sobre una placa caliente de aluminio a $55\pm 0.5^{\circ}\text{C}$

(analgesímetro Hot and Cold Plate, Ugo Basile), para medir la respuesta nociceptiva. La latencia de retiro del signo de dolor (lamido de ambas patas delanteras o salto fuera de la superficie caliente), fue registrada mediante un cronómetro.

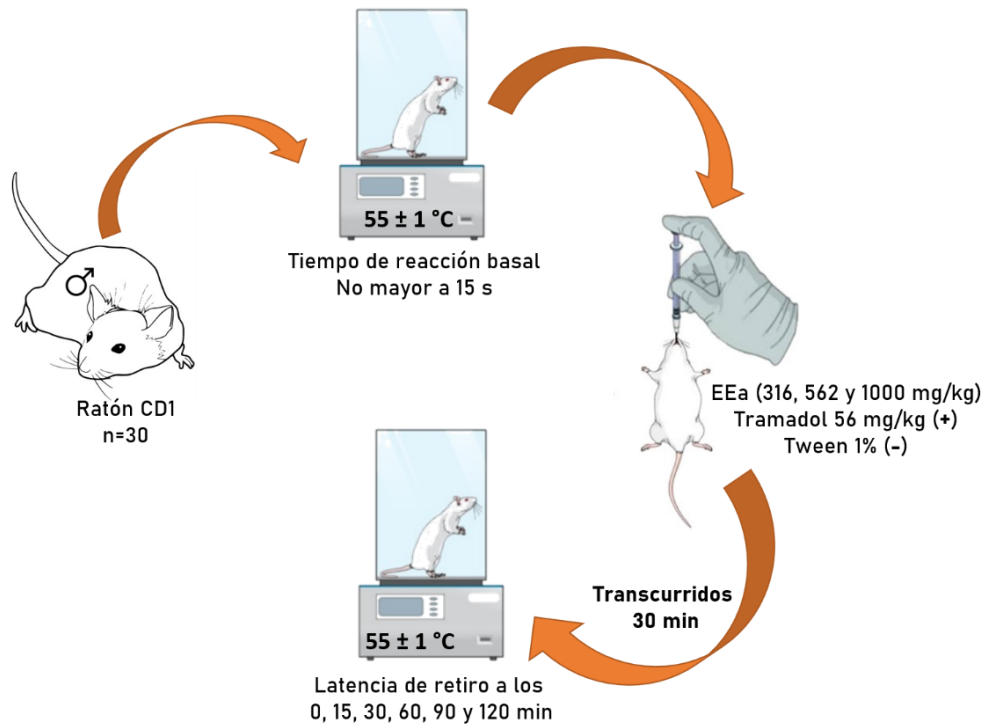


Fig. 6. Diseño metodológico del modelo *Hot plate* para evaluar dolor a nivel central

Dicho período de latencia de retiro no fue mayor a 30 segundos, para evitar daño tisular, y se midió a intervalos de 0, 15, 30, 60, 90 y 120 min (**Figura 6**).

5.5.3 Modelo de Formalina para evaluar analgesia en dolor nociceptivo e inflamatorio.

Este modelo produce una respuesta dolorosa bifásica inducida por la inyección de formalina vía subcutánea en la pata de la rata, con una primera fase de corta duración (primeros 5 minutos), debida a la activación de los nociceptores en la pata de la rata y una segunda fase (10-50 minutos después de la inyección) debida a una respuesta inflamatoria con sensibilización de las neuronas nociceptoras de la médula espinal. Para ello, se utilizaron 36 ratas

Wistar, divididas en 6 grupos, que se trataron previamente con las diferentes dosis del EEa (100,178, 316 y 562 mg/Kg), con diclofenaco (17 mg/Kg) como fármaco de referencia o con vehículo (solución acuosa de Tween 80 al 1%) vía intragástrica.

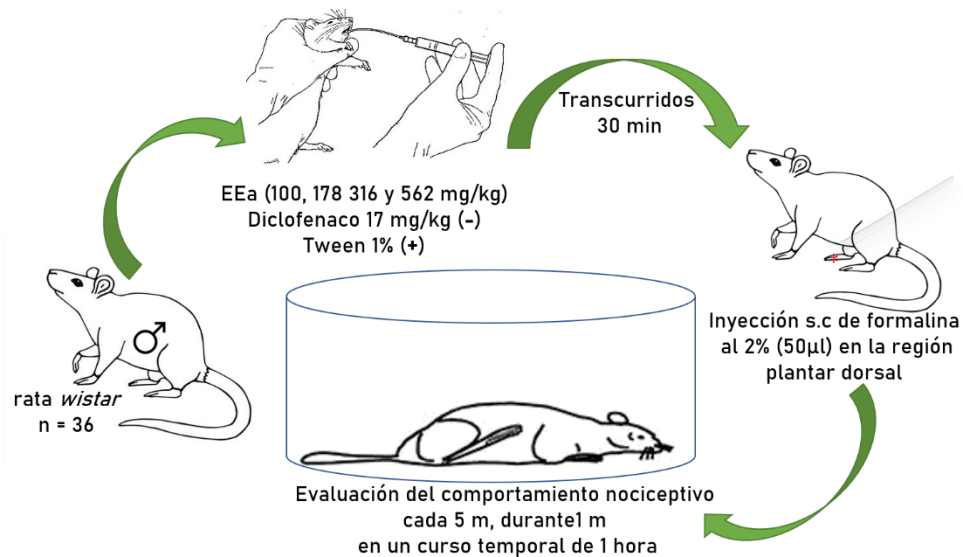


Fig. 7. Diseño metodológico del modelo de Formalina para evaluar dolor nociceptivo e inflamatorio

Pasados 30 minutos, se administró formalina al 2% (50µl/animal) mediante una inyección subcutánea en la región dorsal de la pata trasera derecha. Inmediatamente después de la inyección, se realizó el registro del número de veces en que el animal sacude o levanta la extremidad, usando un cronómetro y un contador. Esta conducta nociceptiva se registró en periodos de 1 minuto, cada 5 minutos durante una hora (**Figura 7 y 8**).



Fig. 8. Evaluación antinociceptiva en el modelo de Formalina

5.6 Análisis del posible mecanismo de acción.

Para determinar la implicación de la vía del óxido nítrico (ON) en la actividad antinociceptiva del EEa, se utilizó un método previamente adoptado por Perimal y colaboradores (2011) con una ligera modificación que a continuación se describe, empleando el modelo de formalina. Se usaron 30 ratas que fueron distribuidas en 5 grupos (n=6). El primer grupo de ratas fue pre-tratado con L-Arginina (precursor de ON, 100 mg/kg, ip). A un segundo grupo se le administró L-Arginina y 15 minutos después la DE₅₀ de EEa, 412 mg/kg (EEa+L-Arginina). Así mismo, un tercer grupo recibió una sola administración del éster metílico de nitroarginina (L-NAME) (inhibidor de la enzima óxido nítrico sintasa, 10 mg/kg ip). Al cuarto grupo se le administró L-NAME + EEa, de la misma forma que el grupo 2. Y finalmente, el quinto grupo solo recibió el vehículo (solución acuosa de Tween 80 al 1%). 30 minutos después de la administración de los tratamientos, se aplica el estímulo nocivo para inducir el dolor e inflamación de acuerdo con el modelo de Formalina descrito anteriormente; enseguida se registró la respuesta nociceptiva (número de sacudidas de la pata) durante 60 minutos, después de la inyección subcutánea plantar de 50 µl de formalina al 2%.

5.7 Identificación de metabolitos secundarios

5.7.1 Perfil fitoquímico

A partir de 20 g del extracto etanólico de flores de *E. americana*, se realizó el fraccionamiento por cromatografía en columna de vidrio de 14 pulgadas de longitud y 2 pulgadas de diámetro (CC), empacada con 210 g de gel de sílice 60 (Merck, 0.04-0.063mm), utilizando fase móvil de hexano-acetato de etilo (10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 1:1 *v/v*) y acetato de etilo-metanol (10:0, 9:1, 8:2 *v/v*), con gradiente de concentración. Se recolectaron fracciones de 100 mL cada una, las cuales fueron concentradas en rotavapor a presión reducida; éstas se monitorearon por cromatografía en capa fina, empleando como adsorbente gel de sílice (60 GF254, Merck, México) como fase móvil acetato de etilo-metanol (8:2 *v/v*).

Las cromato-placas se observaron con luz UV a 254 y 365 nm (Cole-Parmer 9818) y se revelaron con un agente cromogénico de sulfato cérico, calentando a 110 °C por 5 min, , cloruro férrico y reactivo de Dragendorf, lo que permitió reunir las fracciones por su identidad cromatográfica.

5.7.2 Estudios espectroscópicos de los metabolitos secundarios mayoritarios.

Los espectros de RMN de ¹H y ¹³C se obtuvieron a temperatura ambiente en un espectrómetro Bruker Avance a 400 y 100 MHz, respectivamente, así como los espectros COSY, HSQC y HMBC, empleando CDCl₃, DMSO-d₆, CD₃OD y acetona-d₆ como disolventes y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos se dan en ppm a frecuencias altas a partir del TMS y las constantes de acoplamiento (J) se dan en Hz.

5.8 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se expresaron como la media \pm error estándar (EE). Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y las diferencias entre las medias se determinaron a través de una prueba de Tukey, con un nivel de significancia de $p < 0.05$. El área bajo la curva (ABC) de la respuesta antinociceptiva fue calculada por el método de los trapezoides. El análisis se realizó mediante el paquete estadístico GraphPad Prism 9 para Windows, 2021.

6. Resultados

6.1 Rendimiento del extracto

La extracción es un paso importante en el procesamiento fitoquímico para el descubrimiento de componentes bioactivos a partir de materiales vegetales. En este caso, se obtuvieron 27g de extracto total de las flores de *E. americana*, lo que representa un rendimiento de 2.7%.

6.2 Contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante

6.2.1 Contenido fenólico total

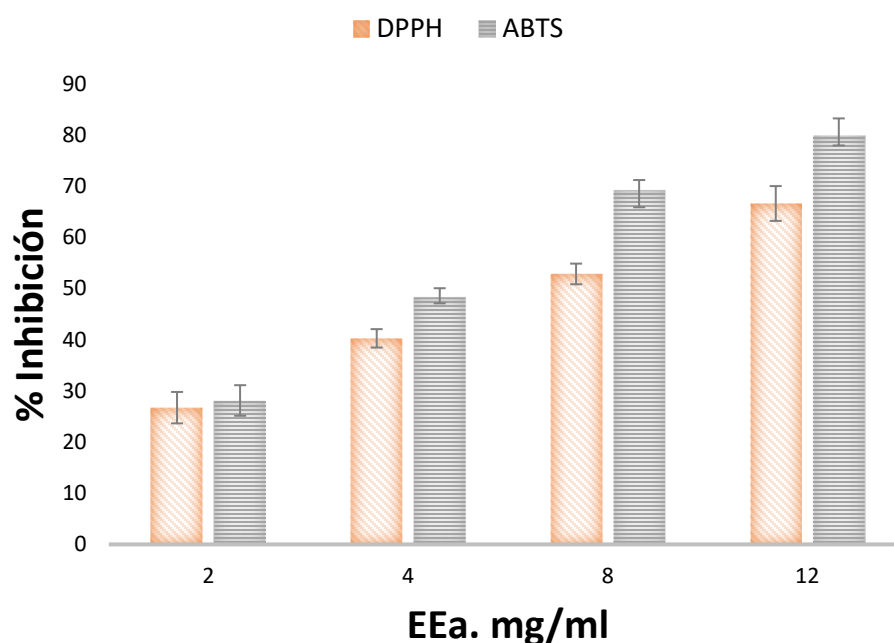
El término «compuestos fenólicos» engloba a todas aquellas sustancias que poseen varias funciones fenol, nombre popular del hidroxibenceno, unidas a estructuras aromáticas o alifáticas (Creus, 2004). En este estudio se encontró un contenido de fenoles totales de 4.36 ± 1.16 mg EAG/g, en el EEa. Las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos son una de las características más destacables, ya que se han demostrado los beneficios de estas propiedades en la salud humana, como la prevención del cáncer, enfermedades cardiovasculares o incluso de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Pisoschi *et al.*, 2021).

6.2.2 Capacidad antioxidante

El EEa mostró tener capacidad de eliminación de radicales con un porcentaje de inhibición de $66.48 \pm 1.51\%$ para DPPH y $79.04 \pm 0.35\%$ para ABTS en concentración de 12 mg/mL (**Gráfica 1**). Además, se observó poder reductor en la técnica de FRAP (119 ± 4.83 μ M. FeSO₄). Así mismo, se estableció una fuerte correlación entre el contenido de fenoles y la actividad antioxidante, tanto para ABTS y DPPH respectivamente, lo que evidenció ($r=0.83$ ABTS, $r=0.88$ DPPH y $r=0.93$ FRAP).

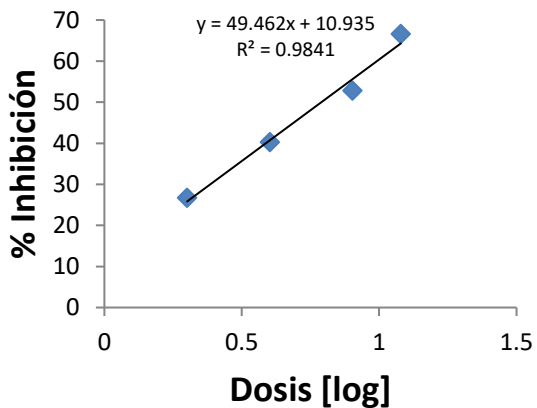
La capacidad de eliminación de radicales se expresó como porcentaje de inhibición (I%) que se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$I\% = \frac{Abs\ control - Abs\ muetrs}{Abs\ control} \times 100$$

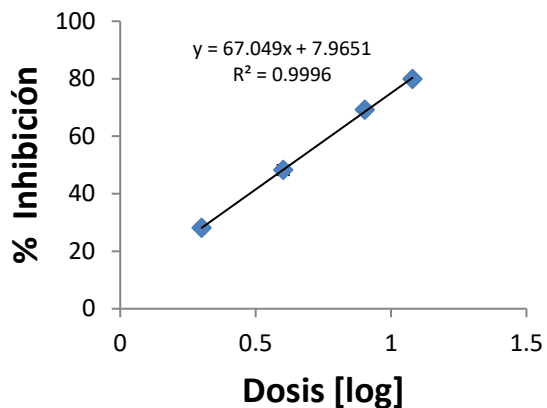


Gráfica 1. Actividad atrapadora de radicales libres del EEa. Expresada como porcentaje de inhibición en los ensayos DPPH y ABTS

Para determinar la capacidad atrapadora de radicales libres se calculó la concentración del extracto correspondiente al 50 por ciento de inhibición (CI₅₀), a partir de la curva del porcentaje de inhibición frente a la concentración del extracto con DPPH y ABTS. Cada muestra se analizó por triplicado para cada concentración (**Gráficas 2 y 3**).



Gráfica 2. Concentración inhibitoria 50 en el ensayo DPPH



Gráfica 3. Concentración inhibitoria 50 en el ensayo ABTS

La CI_{50} fue de 6.16 mg/ml para DPPH y de 4.23 mg/ml para ABTS, lo que indicó que el extracto tiene un buen potencial como atrapador de radicales libres.

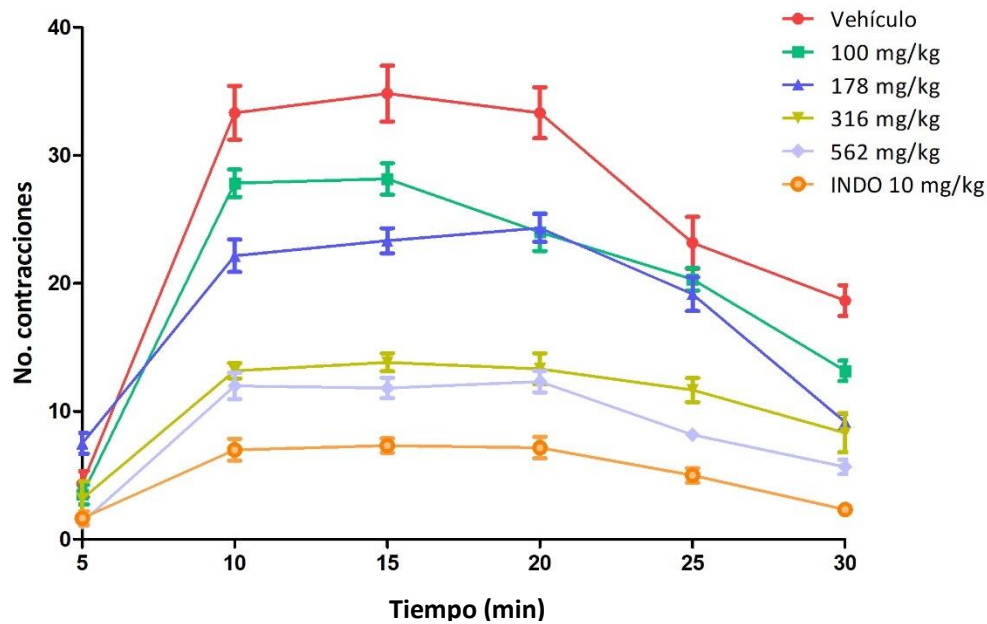
6.3 Dosis Letal Media (DL₅₀)

Una vez aprobado el protocolo por el Comité Institucional Ético para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CIECUAL) con el folio de aprobación CIECUAL/011/2019, se determinó la DL₅₀ del EEa, que fue superior a 5000mg/kg, ya que a esa dosis hubo sobrevivencia de los animales y en el análisis macroscópico no se observó daño en los órganos.

6.4 Actividad antinociceptiva

6.4.1 Analgesia periférica (*Writhing*)

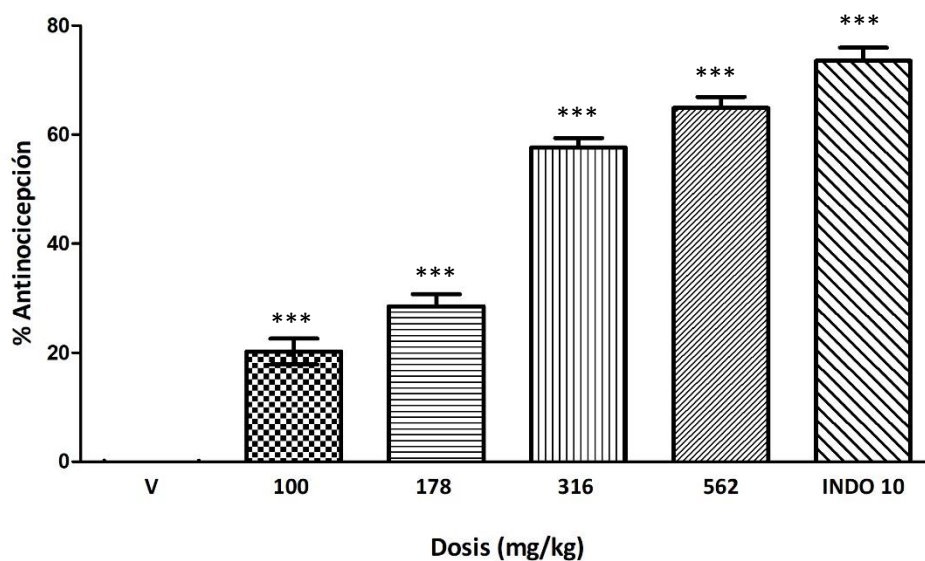
El extracto de *E. americana* redujo la nocicepción inducida por el ácido acético, lo que se evidenció por la disminución de las contracciones abdominales, comparadas con el control (vehículo) como se puede observar en el curso temporal de la **Gráfica 4**. Así mismo, en el ABC del efecto antinociceptivo, se evidenció que el efecto de la dosis máxima del EEa (214 ± 36.39) fue menor al efecto de la indometacina (110 ± 10.21), ya que es mayor ABC por el número de contracciones registradas en el curso temporal con respecto al fármaco de referencia. En este modelo, el dolor se genera indirectamente a través de mediadores endógenos como la bradicinina, la serotonina y la capsaicina, que estimula las neuronas nociceptivas periféricas. Esta prueba se ha utilizado como herramienta de detección para evaluar agentes analgésicos o antiinflamatorios debido a la dualidad del modelo (Dzoyem *et al.*, 2017).



Gráfica 4. Curso temporal del efecto antinociceptivo del EEA en la prueba de *Writhing*.

Cada punto representa la media \pm EEM $n = 6$, en un curso temporal de 30 minutos

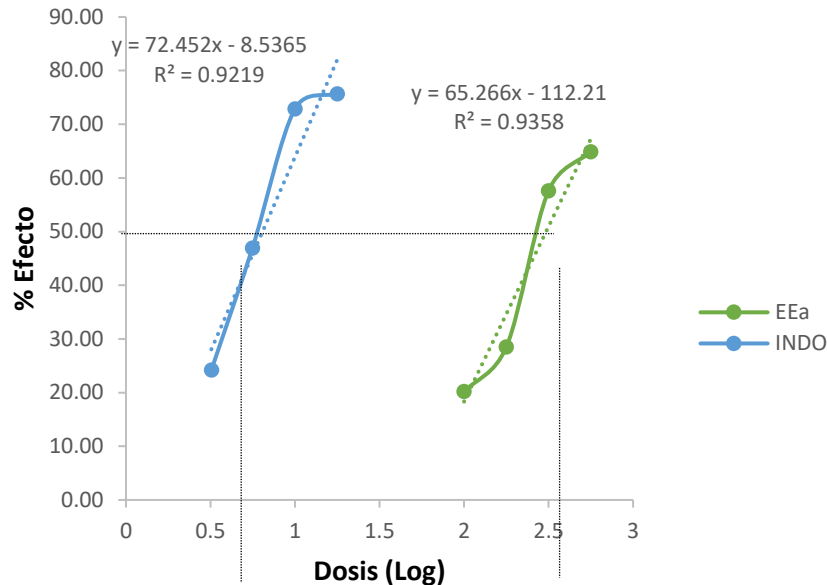
En la **Grafica 5** se representa el porcentaje del efecto antinociceptivo dependiente de la dosis del EEA, donde se puede observar la disminución de las contracciones abdominales, este efecto del EEA es estadísticamente significativo ($p < 0.05$) comparado con el vehículo. El mejor efecto se obtuvo con las dosis de 316 y 562 mg/kg. El efecto antinociceptivo del extracto no fue mayor al de la indometacina, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en comparación con el efecto de este fármaco, por lo cual, se puede decir que presentan un efecto similar.



Gráfica 5. Efecto antinociceptivo del EEA en la prueba de *Writhing*. Datos expresados como la media del porcentaje de antinocicepción \pm EEM. $n=6$ *** $P<0.001$ vs. Vehículo. ANOVA seguido de Tukey.

La prueba de *Writhing*, a diferencia de los ensayos *Tail flick* y *Hot plate*, está mediada por la actividad del receptor de NMDA, que se sabe que está asociado con la síntesis de ON (Larson *et al.*, 2000). Esta síntesis puede actuar sobre segundos mensajeros, la fosforilación de los receptores o el potencial de membrana en reposo de las neuronas, que como resultado desencadenan el mecanismo nociceptivo (Larson *et al.*, 2000). Por lo tanto, el EEA puede estar actuando mediante la inhibición de la síntesis de ON, debido a su actividad antioxidante. Ya se ha destacado la regulación de procesos antiinflamatorios y analgésicos a través de la inhibición del ON (D *et al.*, 2004; Sokeng *et al.*, 2013). Independientemente del mecanismo mediante el cual un fármaco ejerza sus efectos, por unión a receptores o interacción química, el control del efecto depende de la concentración del fármaco en el sitio de acción. Por lo que, establecer la curva dosis-respuesta, representa gráficamente cómo actúa la dosis de un compuesto para producir el efecto (respuesta). Esta representación gráfica de los fármacos y/o extractos estudiados en condiciones idénticas, permite comparar los perfiles farmacológicos de los tratamientos. Por ello, en este estudio se realizó la curva dosis-respuesta del fármaco y se estimó la dosis

efectiva 50 (DE₅₀) de la indometacina y del EEa, como se puede observar en la **Gráfica 6**.



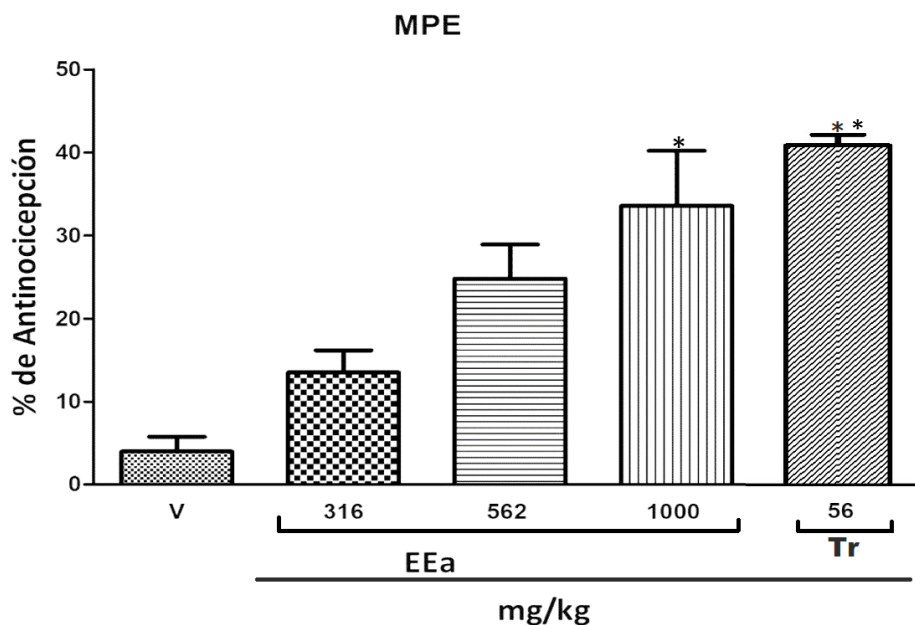
Gráfica 6. Curva dosis respuesta de Indometacina y el EEa. El eje “y” indica el porcentaje de efecto antinociceptivo en el modelo *Writhing* y el eje “x”, representa el logaritmo de la dosis, donde se estimó la dosis efectiva 50 (DE₅₀)

La DE₅₀ para la indometacina se estableció en 6.42 mg/kg y para el extracto de 305.75 mg/kg (**Gráfica 6**). Estas curvas pueden brindar más información para tomar decisiones terapéuticas adecuadas, ya que permite determinar la dosis necesaria, su frecuencia y el índice terapéutico de los fármacos; además, ofrece datos sobre la potencia y selectividad de los medicamentos.

6.4.2 Analgesia a nivel central (*Hot plate*)

Los datos se expresaron como el porcentaje del máximo efecto posible (% MPE), calculado mediante la siguiente ecuación:

$$MPE (\%) = \frac{PL\ post - PL\ pre}{TLE - PL\ pre} \times 100$$



Gráfica 7. Efecto antinociceptivo del EEA en *Hot-plate*. Las barras representan la media del porcentaje del máximo efecto antinociceptivo posible (MPE) ± EEM. n=6 *P<0.05 vs. Vehículo, **p<0.01 vs tramadol (Tr). ANOVA seguido de Tukey.

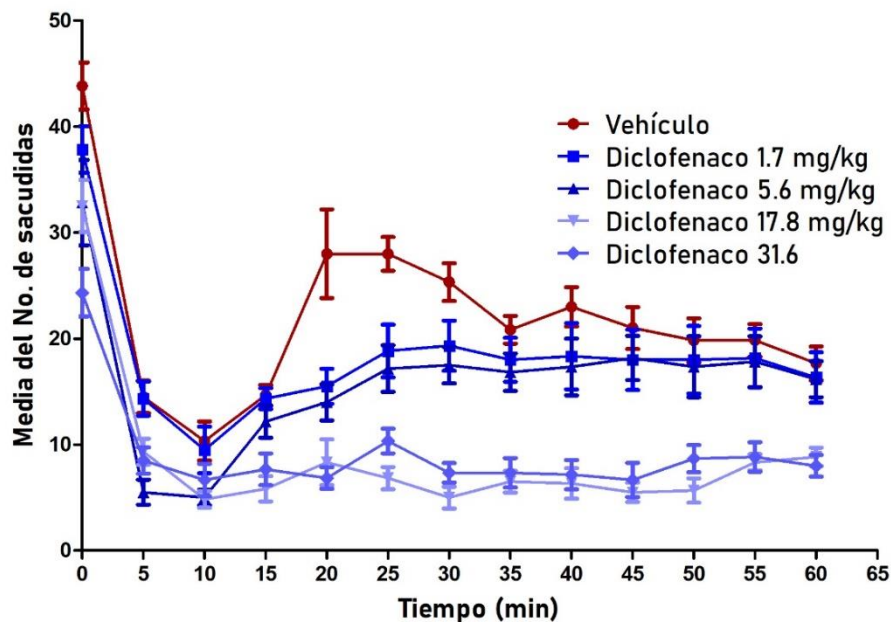
En el modelo de *Hot plate* el EEA incrementó el tiempo de latencia de retiro de forma dosis dependiente (**Gráfica 7**). Se encontraron diferencias significativas (p<0.05) vs control, con la dosis de 1000 mg/kg y con el fármaco de referencia tramadol (Tr), el cual tuvo mejor efecto con las dosis de 56 mg/kg (p<0.01). Así mismo, no se observó diferencia significativa entre la dosis máxima del extracto comparado con el tramadol, por lo cual, se puede decir que ambos presentan un efecto antinociceptivo similar. La prueba de la placa caliente es una forma rápida y relativamente económica de evaluar el dolor térmico agudo, y una ventaja sobre el movimiento de la cola o la retirada de la cola, ya que es la oportunidad de evaluar la sensibilidad térmica sin confundirse con la

analgesia inducida por el estrés asociada con la inmovilización. Sin embargo, la prueba de la placa caliente es algo más complicada que otros ensayos térmicos, porque los roedores (especialmente las ratas) exhiben repertorios de comportamiento bastante complejos y sutiles.

En el ensayo *Hot plate*, se empleó el calor como el principal estímulo nociceptivo, esta prueba implica una función cerebral superior y se considera una respuesta organizada supraespinal (Dzoyem et al., 2017) Por lo anterior, este modelo permite evaluar la actividad analgésica de sustancias similares a los opiáceos, ya que se observa la analgesia a nivel central, abarcando mecanismos neurogénicos y centrales de la nocicepción.

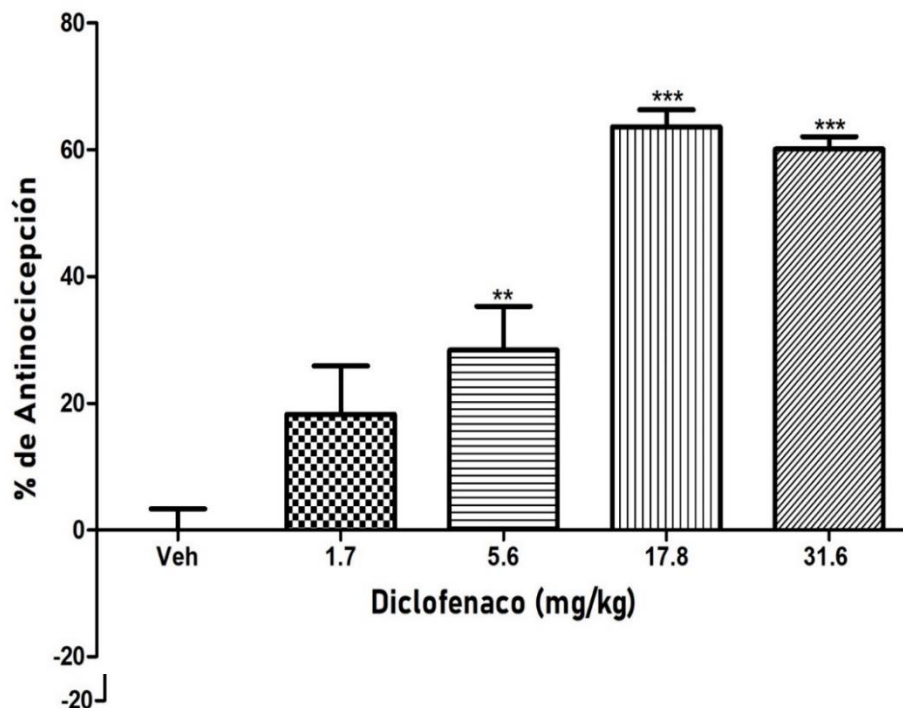
6.4.3 Analgesia en dolor nociceptivo e inflamatorio (Formalina)

Para poder determinar la dosis adecuada de diclofenaco a utilizar en los experimentos como fármaco de referencia, se determinó el curso temporal del diclofenaco en el modelo de formalina empelando diferentes dosis de este fármaco, de acuerdo con la literatura (**Gráfica 8**).



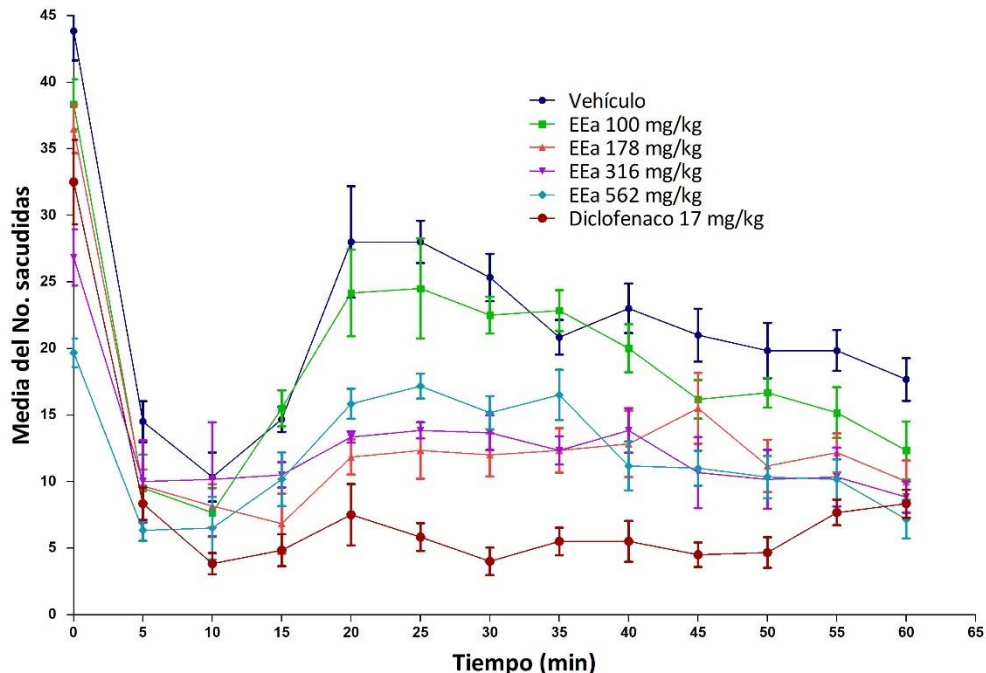
Gráfica 8. Curso temporal de antinocicepción bifásico de diclofenaco. Datos expresados como la media \pm SEM de número de sacudidas en el modelo de Formalina. Diferencia significativa vs vehículo $p < 0.05$ según lo determinado por el ANOVA seguido de la prueba de Tukey.

En esta prueba, la formalina se inyecta vía subcutánea en la pata trasera del animal, contabilizando el comportamiento nociceptivo. Se observan dos fases de la respuesta: una fase temprana (neurogénica) que comienza inmediatamente después de la inyección y dura de 0 a 5 minutos y una fase tardía (inflamatoria) de 15 a 60 minutos después de la inyección. El número de sacudidas se representó en función del tiempo. El curso temporal de las diferentes dosis del fármaco dio como resultado una curva bifásica, la primera fase (de 0 a 5 minutos) se caracteriza por representar el dolor nociceptivo y en la segunda fase (de los 10 – 50 minutos), se presenta el dolor inflamatorio. Las áreas bajo las curvas se calcularon utilizando la regla trapezoidal. La reducción significativa en el área se interpretó como el porcentaje de antinocicepción (**Gráfica 9**). Se calcularon las ABC para las dos fases del ensayo y el porcentaje de antinocicepción para cada fase. La administración de formalina produjo un patrón típico de comportamiento nociceptivo.



Gráfica 9. Porcentaje de antinocicepción de diclofenaco en la prueba de Formalina. Datos expresados como la media \pm SEM del porcentaje. ** Diferencia significativa con el grupo de vehículos ($p < 0.01$) según lo determinado por el ANOVA seguido de la prueba de Dunnett.

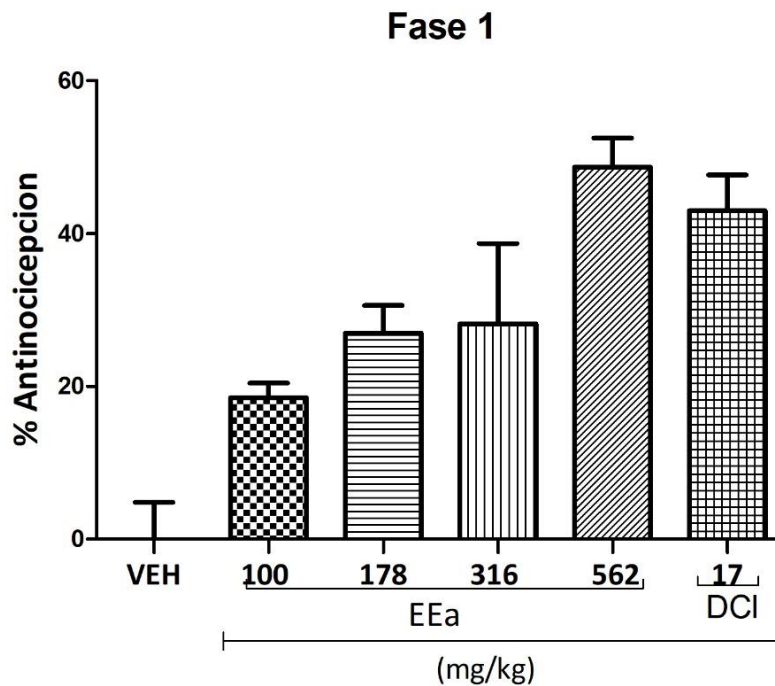
Los mejores efectos de antinocicepción, para el fármaco de referencia, se observaron en las dosis de 17.8 y 31.6 mg/kg, sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre estas dosis (**Gráfica 9**), por lo que se decidió utilizar la dosis de 17.8 mg/kg, como referencia en los experimentos posteriores. Se consideró esta dosis más segura, ya que la DL_{50} de este fármaco en animales de experimentación, es de 50 mg/kg. Así mismo no se observaron diferencias significativas entre las dosis de 1.7 y 5.6 mg/kg con respecto al vehículo. Una vez que se determinó la dosis del fármaco a utilizar, se administraron las diferentes dosis del extracto EEa y se obtuvo el curso temporal del efecto antinociceptivo, contrastando el efecto con el vehículo y el fármaco de referencia como se puede ver en la **Gráfica 10**. Se observó una reducción de la respuesta nociceptiva (sacudidas de la extremidad) con el EEa de una forma dosis dependiente. Además, se identificaron diferentes respuestas dependiendo de la fase de dolor.



Gráfica 10. Curso temporal de antinocicepción en el modelo de Formalina. Se representa el número de sacudidas después de la inyección de formalina en ratas pre-tratadas con el vehículo, diferentes dosis del EEa o Diclofenaco. Datos expresados como el número medio de sacudidas \pm SEM.

A partir de los resultados obtenidos en el curso temporal, se calculó el % de antinocicepción para cada fase. La administración oral del EEa indujo una disminución de la respuesta nociceptiva dependiente de la dosis durante la primera fase ($p < 0,05$) (**Grafica 11**).

Se encontraron diferencias significativas en la dosis de 562 mg/kg *vs* vehículo ($p < 0,05$) y con las demás dosis del EEa. Además, no hubo diferencia significativa entre esta dosis y el fármaco de referencia (diclofenaco) lo que demuestra un efecto equiparable del EEa con respecto a este fármaco de referencia (**Gráfica 11**).

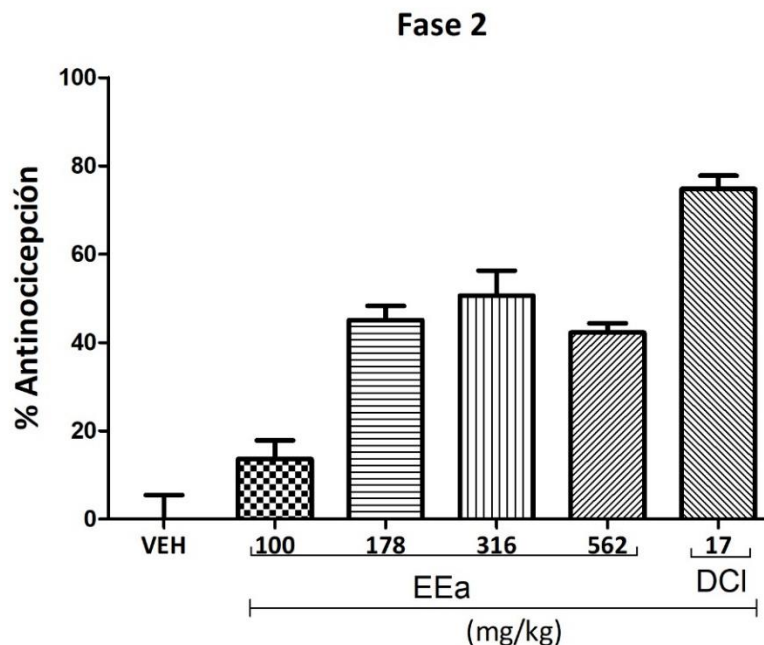


Gráfica 11. Porcentaje de antinocicepción del EEa en la primera fase en el modelo de Formalina. Datos expresados como media \pm SEM del porcentaje de antinocicepción del EEa, Diclofenaco (DCI) y el vehículo (VEH). * Diferencia significativa con el grupo de vehículo ($p < 0,05$) según lo determinado por el ANOVA seguido de la prueba de Tukey.

La administración del EEa y DCI mostró una disminución significativa en el número de sacudidas, lo que indica un efecto antinociceptivo en comparación con su grupo de control de vehículo ($p < 0,05$). Por otro lado, DCI tuvo un mejor

efecto antinociceptivo en la segunda fase que EEa ($p < 0.05$), no obstante, no se encontraron diferencias significativas entre éste y el fármaco, lo que indica que el EEa produce un efecto deseable, comparable con el fármaco. Así mismo, se observó que no hubo diferencias significativas entre las dosis de 178, 316 y 562 mg/kg (**Gráfica 12**), lo que podría suponer que se puede ejercer un efecto eficaz con una dosis menor del extracto, para lo que se tendría que calcular la DE_{50} .

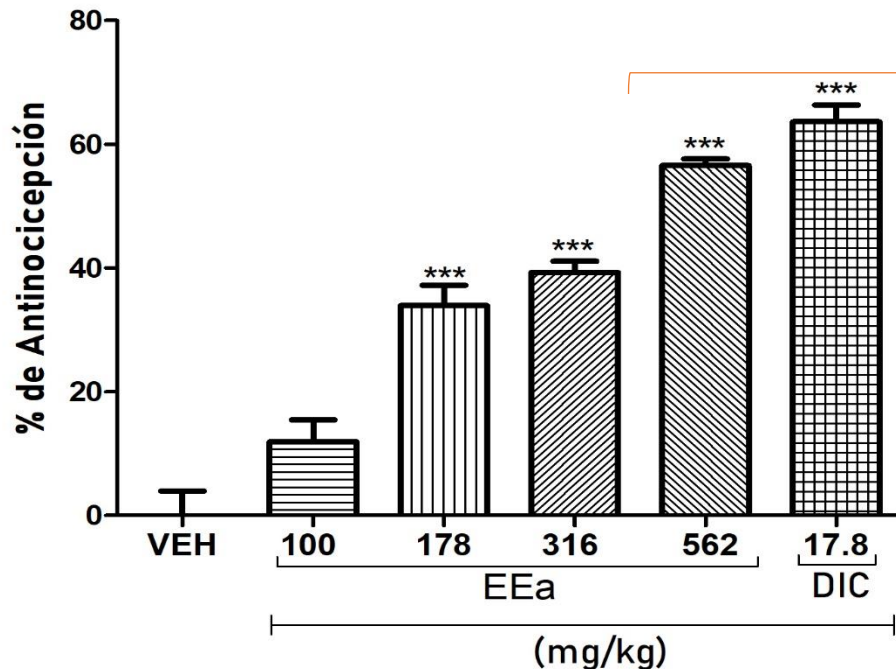
La primera fase de la actividad nociceptiva refleja una activación directa de las aferentes sensoriales nociceptivas por la formalina, seguida de la activación aferente producida por mediadores inflamatorios en la segunda fase. Esto apoya la idea de que diferentes mecanismos subyacen a las dos etapas de activación conductual y electrofisiológica.



Gráfica 12. Porcentaje de antinocicepción del EEa en la segunda fase en el modelo de Formalina. Datos expresados como media \pm SEM del porcentaje de antinocicepción del EEa, Diclofenaco (DCI) y el vehículo (VEH). * Diferencia significativa con el grupo de vehículos ($p < 0.05$) según lo determinado por el ANOVA seguido de la prueba de Tukey

Para visualizar el efecto general que tiene el extracto en estos modelos, se calculó el % de antinocicepción para ambas fases (**Gráfica 13**). Dicha

representación gráfica, demostró que EEa redujo la respuesta al estímulo doloroso en ambas fases, lo que sugiere una actividad analgésica y antiinflamatoria.



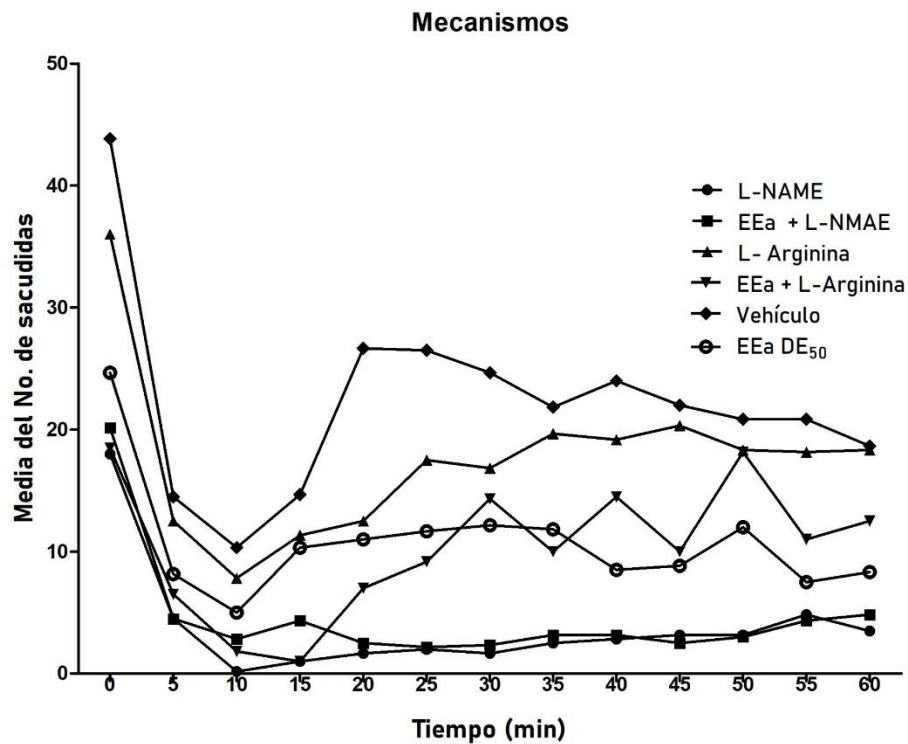
Gráfica 13. Porcentaje de antinocicepción bifásico del EEa en el modelo de Formalina. Datos expresados como media \pm SEM del porcentaje de antinocicepción del EEa, Diclofenaco (DIC) y el vehículo (VEH). Diferencia significativa vs vehículo $p < 0.05$ según lo determinado por el ANOVA seguido de la prueba de Tukey.

6.5 Implicación de la vía L-Arginina/ON/cGMP en el efecto antinociceptivo

En la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento del dolor, se buscan compuestos efectivos cuyo mecanismo de acción sea distinto a los ya utilizados. En este contexto, la iniciación periférica del proceso nociceptivo ha sido un tema relevante de estudio científico y médico durante años. Por tanto, el descubrimiento de fármacos que ejercen su acción antinociceptiva únicamente en la periferia podría evitar los efectos secundarios centrales, ocasionados por los tratamientos tradicionales. Además, el ON está implicado en mecanismos de hiperalgesia y alodinia, al permitir un incremento de la

transmisión nociceptiva en terminales nerviosas centrales. Es por ello que resulta importante evaluar la implicación de la vía del canal óxido nítrico-cGMP-KATP en el proceso nociceptivo.

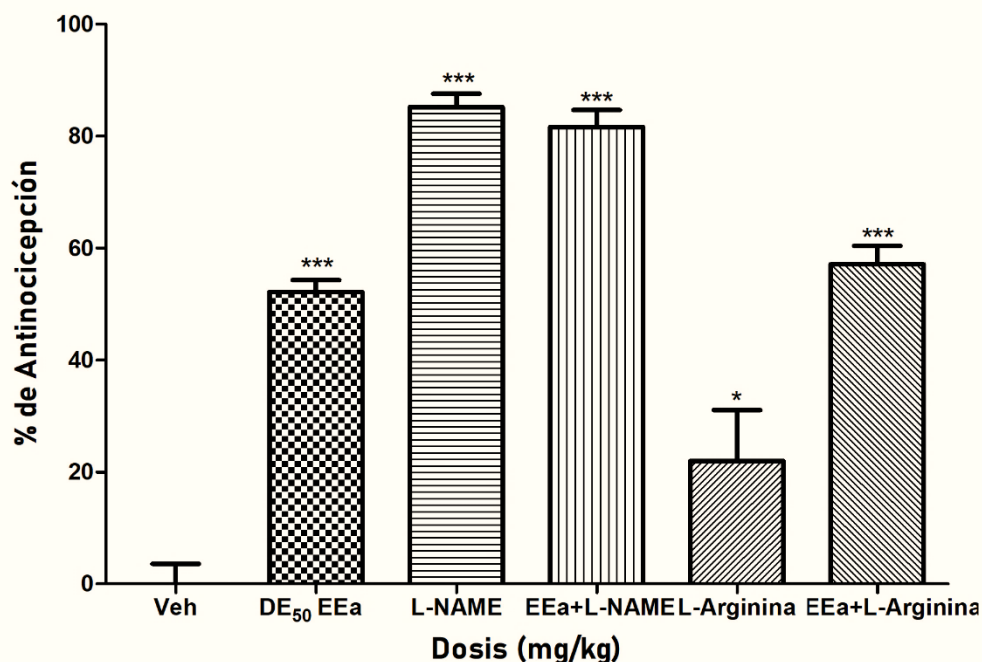
Para analizar si el efecto antinociceptivo observado en el modelo de formalina, estaba mediado por la vía periférica del canal L-arginina/ON/cGMP/KATP, se usó la dosis efectiva 50 del EEa, que fue de 412 mg/kg, esta dosis fue administrada de forma individual, así como L-NAME, L-Arginina y sus combinaciones con el extracto, cuyo resultados se observan en la **Gráfica 14**, donde se representa el curso temporal del efecto antinociceptivo de los tratamientos administrados en el modelo de Formalina.



Gráfica 14. Curso temporal del efecto antinociceptivo para determinar posible mecanismo de acción en el modelo de Formalina. Se representa el promedio de la respuesta antinociceptiva de la DE₅₀ de EEa, L-NAME, L-Arginina y sus combinaciones durante 60 minutos.

En **Gráfica 15**, se observa que la administración única de L-NAME (10 mg/kg), como inhibidor de óxido nítrico sintasa (ONS), redujo la respuesta nociceptiva, es decir, hubo un efecto antinociceptivo. La administración conjunta de EEa+L-NAME incrementó el efecto antinociceptivo del extracto, sin embargo, no se modificó el efecto de L-NAME. La administración de L-Arginina también demostró un efecto antinociceptivo en los animales de experimentación, aunque no tan efectivo como L-NAME, encontrándose diferencias significativas ($P < 0.05$) entre estos grupos. De igual forma, este efecto aumentó con la coadministración del EEa, no obstante, la administración conjunta de EEa+L-Arginina, no mostró diferencias estadísticamente significativas en comparación con la sola administración de EEa, el efecto fue prácticamente el mismo.

Debido a los efectos inhibidores de la ONS, L-NAME ha sido una de las herramientas farmacológicas más útiles en la investigación relacionada con el antagonismo de la enzima ONS (Liu *et al.*, 2019). Por lo que, de acuerdo con los resultados observados, se demuestra la posible implicación de la vía de los canales L-arginina/NO/cGMP/KATP en el efecto antinociceptivo que el EEa presenta en la prueba de formalina en ratas (**Gráfica 15**). La inhibición de la síntesis de prostaglandinas probablemente esté involucrada en los efectos antiinflamatorios y antinociceptivos de este extracto, pero no se pueden excluir mecanismos adicionales.



Gráfica 15. Porcentaje de antinocicepción del efecto global de DE₅₀ EEa, L-NAME, L-Arginina y su combinación. Datos expresados como la media \pm SEM del porcentaje de antinocicepción en el modelo de Formalina. Diferencia significativa vs vehículo $p < 0.05$ según lo determinado por el ANOVA seguido de la prueba de Tukey.

6.6 Perfil fitoquímico de las flores de *E. americana*

El extracto etanólico de las flores de *E. americana* se sometió a cromatografía en columna obteniendo fracciones gruesas (100 mL) con AcOEt y mezclas de AcOEt - MeOH con polaridad creciente, las cuales se identificaron como A-M. Las fracciones C - F (Fig 9 A) eluidas con AcOEt:MeOH (8:2 *v/v*) y AcOEt:MeOH (7:3 *v/v*), que dieron positiva la prueba con FeCl₃ fueron reunidas y se purificaron mediante cromatografía en columna empleando CHCl₃:MeOH (85:15 *v/v*). Se lograron separar 45 mg de un compuesto que muestra aún impurezas y se llevó a purificación mediante una cromatografía en columna, del cual se logró obtener 12 mg de un compuesto puro que se etiquetó como RRDMSO al que se le realizó espectroscopía de RMN. Las fracciones J-M que dieron positiva la prueba de Dragendorf, se reunieron y recromatografiaron en columna eluidas con CHCl₃:MeOH (6:4 *v/v*). De esta fracción se obtuvieron

6.4 mg de un compuesto etiquetado como FLM y se también se realizó espectroscopia de RMN.

Una vez desengrasado el extracto mediante hexano y a partir del fraccionamiento de columna, se realizó una cromatografía en capa fina y se revelaron con reactivos específicos, lo anterior para identificar los principales grupos de metabolitos presentes en la muestra, ya que las tinciones suelen estar diseñadas para funcionar sólo con determinados grupos funcionales. Cloruro férrico para flavanoides, Dragendorff para alcaloides y sulfato cérico como revelador universal.

El revelado indicó que los dos grupos principales presentes en el extracto son flavonoides y alcaloides, ya que reaccionaron con cloruro férrico y el reactivo de Dragendorff, respectivamente, como se puede ver en la cromato-placas de las **Figura 9**.

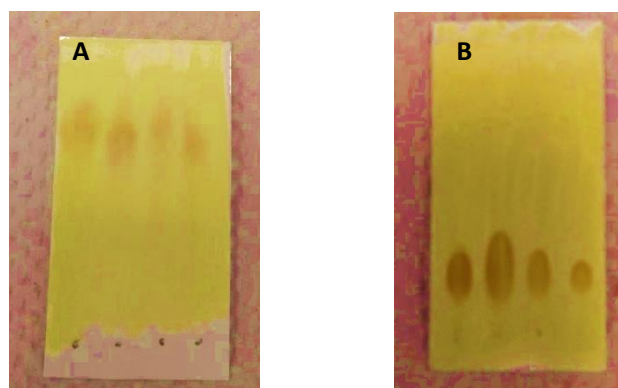


Fig. 9. Identificación fitoquímica en cromato-placas.
Cromatografía en capa fina de las fracciones AcEtOH y MeOH revelado con cloruro férrico (A) y revelado con Dragendorff (B).

Para caracterizar los metabolitos mayoritarios que fueron identificados en el extracto de las flores de *E. americana*, se realizaron estudios espectroscópicos de los compuestos que fueron purificados mediante métodos cromatográficos como se indicó anteriormente.

En el **Anexo 10.4** se encuentran las imágenes de los espectros obtenidos de los compuestos aislados, cuyo análisis se realizará posteriormente como parte de otro estudio, por lo cual, la elucidación estructural de los metabolitos aislados del EEa, no fue incluido en este trabajo.

7 Discusión

7.1 Rendimiento del extracto

Como ya se ha mencionado anteriormente, del 70 al 95% de las flores comestibles son agua, por lo tanto, el rendimiento que se obtiene de estas estructuras suele ser bajo, por lo que, el resultado obtenido fue el esperado. Además, el rendimiento de extracción y la pureza de los extractos pueden verse muy influenciados por el método de extracción, la parte usada del material vegetal y las especies de plantas. Se ha observado que hay un mayor rendimiento cuando se utiliza la planta molida o triturada, ya que el tamaño de partícula facilita el contacto con el solvente. Así mismo, la interacción de las partículas se ve favorecida por la agitación, lo que permite reducir el tiempo de maceración.

Por otro lado, las flores comestibles se pueden aplicar a una variedad de necesidades como componentes de alimentos. Las primeras investigaciones sobre flores comestibles se publicaron por primera vez en 1934; este tema de investigación ganó una atención significativa en la última década, principalmente debido a los hallazgos de compuestos antioxidantes y sus propiedades funcionales (Prabawati *et al.*, 2021), lo que llevó a diversificar la utilización de flores comestibles para una serie de propósitos. Los resultados de este estudio fueron similares a los obtenidos por Amorim *et al.*, (2019), en donde se obtuvo un rendimiento de 3.17 %, en flores de *E. mulungu*. Además, se estableció una correlación positiva entre el rendimiento del extracto, el contenido fenólico y la actividad antioxidante. Así mismo, se ha demostrado en otro estudio que las flores de *E. americana*, tienen una importante concentración de carotenoides (Pinedo-Espinoza *et al.*, 2020).

7.2 Capacidad antioxidante

Los flavonoides constituyen el grupo de compuestos fenólico más extendido en la naturaleza y éstos son los que poseen una mayor capacidad antioxidante (Fahmy *et al.*, 2018). No obstante, se ha visto que además de flavonoides, la combinación de triterpenoides, esteroides y carbohidratos son responsables del potencial antioxidante observado en las flores comestibles (Kumari *et al.*, 2021).

Con respecto al contenido de fenólico identificado en el extracto etanólico de flores de *E. americana*, de acuerdo a la literatura, los extractos de flores suelen proporcionar cantidades de fenoles totales de moderadas a bajas (Zheng *et al.*, 2018). En cuanto a las especies del género *Erythrina*, estudios previos han demostrado el contenido fenólico en extractos de hojas de *E. neillii* con diferentes solventes, el extracto metanólico total fue el que presentó el mayor contenido 10,12 mg EAG /g seguido del de acetato de etilo con 9,56 mg EAG/g. Así mismo, se obtuvieron 412.8 mg GAE/g en extracto metanólico de corteza de *E. indica* (Sowndhararajan *et al.*, 2012). Si bien la composición de los extractos depende del método de extracción, también existe evidencia de que las variaciones en la distribución, composición y concentración de los grupos fitoquímicos en las plantas se atribuyen a las reacciones de las especies al ambiente (Andrade *et al.*, 2018). En este trabajo se obtuvieron 4.36 ± 1.16 mg EAG/g, resultados menores a los que obtuvo Pinedo *et al.*, (2020) cuyo contenido de fenoles en flores fue de 7.80 mg EAG/g. Como ya se mencionó anteriormente, estas diferencias se atribuyen a las reacciones que el ambiente genera en las plantas, ya que aunque los fenoles son sintetizados de *novo* por las plantas y son regulados genéticamente, su síntesis también suele ser promovida por una reacción a determinada infección por microorganismos (las plantas heridas secretan fenoles para defenderse de posibles ataques fúngicos o bacterianos), para combatir el estrés oxidativo o para regular el crecimiento (Bystrická *et al.*, 2011; Feduraev *et al.*, 2019). Por otro lado, aunque se

considera que existe una relación positiva entre el rendimiento del extracto y una mejor recuperación de compuestos fenólicos, se ha reportado que a mayor extracción los rendimientos mostraron altos niveles de grupos no fenólicos en las muestras de extracto. Lo que refuerza el hecho de que la extracción de compuestos fenólicos de matrices vegetales es muy dependiente de la composición química de la muestra, así como de la afinidad entre los compuestos químicos presentes en la muestra y el solvente utilizado (Braga *et al.*, 2016).

Así mismo, el consumo de alimentos que contengan compuestos con propiedades antioxidantes es de importancia para ayudar al cuerpo en la lucha contra las especies reactivas de oxígeno excesivas y así prevenir diversas enfermedades degenerativas. Las flores comestibles, han ganado campo de investigación, debido a los hallazgos de compuestos antioxidantes y sus propiedades funcionales, ya que se pueden aplicar a una variedad de necesidades como componentes de alimentos (Prabawati *et al.*, 2021). Para evaluar las propiedades antioxidantes, existen varias técnicas *in vitro* e *in vivo* (Alam *et al.*, 2020). En este estudio se utilizaron las técnicas *in vitro* DPPH, ABTS y FRAP. En dichas técnicas el EEa mostró tener capacidad de eliminación de radicales con un porcentaje de inhibición de $66.48 \pm 1.51\%$ en la técnica DPPH y de $79.04 \pm 0.35\%$ en la técnica ABTS, ambas en concentraciones de 12 mg/mL. Además, se observó poder reductor en la técnica de FRAP ($119 \pm 4.83 \mu\text{M}$. FeSO_4). Estos resultados son superiores a los encontrados por Tauseef *et al.*, (2013) quienes encontraron porcentajes de inhibición desde 2 hasta 42% en fracciones MeOH/AcOA 1%, en hojas de *E. vogelii*. Así también, que la CI_{50} de EEa fue de 6.16 mg/ml en la prueba DPPH y de 4.23 mg/ml en la prueba ABTS. Mientras que Tauseef *et al.*, 2013, encontró CI_{50} mayores a 0.2 g/ml en extractos de hojas de *E. vogelii* y *E. sigmoidea*. No obstante, esta diferencia se debió en parte a la estructura de la planta analizada y a la técnica de extracción, pero se hace evidente que las especies que componen el género *Erythrina*, son potenciales agentes antioxidantes.

En otras especies del mismo género se demostró actividad antioxidante en compuestos de *E. abyssinica*, *E. livingstoniana* y *E. mildbraedii* (Ali *et al.*, 2012; Anouar, 2016; MacHumi *et al.*, 2006) donde las CI_{50} van de los 27.5 $\mu\text{g/ml}$ hasta los 200 $\mu\text{g/ml}$, claro que se debe considerar que estos datos corresponden a compuestos puros encontrados en hojas y tallo de las especies de *Erythrina* mencionadas. No obstante, en estos estudios se encontró una actividad similar e incluso mayor, que los controles positivos (Trolox, BHA, ácido ascórbico y quercetina). El ensayo de eliminación de radicales *in vitro* utilizada en dichos estudios fue DPPH.

Dentro del género *Erythrina* se han utilizado varios métodos para determinar la propiedad antioxidante de diferentes muestras. La actividad antioxidante de los extractos y/o compuestos de *E. abyssinica*, *E. livingstoniana* y *E. mildbraedii*, fueron evaluadas principalmente mediante el ensayo DPPH. En la mayoría de dichos estudios, se da una actividad similar e incluso superior a la de los controles positivos (Trolox, BHA, ácido ascórbico y quercetina) (Bedane *et al.*, 2016; Gabr *et al.*, 2017; Y. Zhang *et al.*, 2007). También se ha evaluado la reducción del hierro férrico (Fe^{+3}), mediante la técnica FRAP. Todos con resultados similares a los obtenidos en este estudio.

Otras de las técnicas usadas para evaluar la actividad antioxidantes en especies del género *Erythrina*, fue la inhibición de la lipoxigenasa y la xantina oxidasa, enzimas que participan en la producción de especies reactivas de oxígeno y agentes proinflamatorios (Ali *et al.*, 2012; Anouar, 2016; Umamaheswari *et al.*, 2009) obteniendo resultados positivos. Por lo anterior, debido a la actividad antioxidante que presentan las especies del género *Erythrina* y la que se pone en evidencia en este estudio, se podría decir que la especie *E. americana* puede ser una importante fuente de compuestos bioactivos, útiles en el cuidado de la salud humana. Ya que se ha demostrado que las flores comestibles con una composición variada de compuestos fenólicos tienen efectos antimicrobianos, anticancerígenos y antiinflamatorios y tienen un efecto preventivo en el desarrollo de enfermedades degenerativas como la diabetes y las enfermedades cardiovasculares (Prabawati *et al.*, 2021).

Entre los compuestos propios de las especies analizadas, que se han reportado como responsables de esta actividad antioxidante, son: erivarina H, abisinona V, mildbona, mildbenona, 7,3'-dihidroxi-4'-metoxi-5'-(3 metilbut-2-enil) flavanona, erilivingstona H, 7,3',4'-trihidroxiflavanona, trans-3,4,2',4'-tetrahidroxicalcona, erivarina J y erycrisagalina (Anouar, 2016; Bedane *et al.*, 2016; Sokeng *et al.*, 2013).

Por otro lado, también se ha documentado actividad antioxidante de algunos alcaloides, incluso, se demostró que algunos alcaloides activan la vía del factor nuclear Nrf2, produciendo la inhibición de la NADPH-oxidasa (Macáková *et al.*, 2019). De la misma forma que otros compuestos antioxidantes, los alcaloides pueden comportarse como antioxidantes y prooxidantes dependiendo de las condiciones y la prooxidación podría ser la razón de la activación de Nrf2 (Macáková *et al.*, 2019). Por lo tanto, los alcaloides presentes en las flores de *Erythrina* también puede estar actuando como antioxidantes y esto estar relacionado con la menor presencia de fenoles en el extracto.

Así mismo, se ha explorado la participación de agentes antioxidantes en la regulación de procesos antiinflamatorios y analgésicos a través de la inhibición del óxido nítrico (NO) (Njamen *et al.*, 2013; Sokeng *et al.*, 2013).

7.3 DL₅₀

Los valores de la DL₅₀ son usados con frecuencia como un indicador general de la toxicidad aguda de una sustancia. Una baja DL₅₀ es indicativo de mayor toxicidad. En las regiones semiáridas de México, es común utilizar la riqueza florística de las plantas silvestres como ingredientes alimentarios, tal es el caso del “pemuche” que es consumido por la población mexicana en varios estados, por lo que era poco probable que fuera tóxico. Por lo que la DL₅₀ fue >5000mg/kg, contrario a lo encontrado por Bhagyasri y colaboradores, en extracto acuoso de hojas de *E. variegata*, que fue <3162mg/kg (Bhagyasri *et al.*, 2017). Además, estas diferencias en la toxicidad en otras especies del género *Erythrina*, en parte pueden deberse a la variedad de distribución de los

compuestos fitoquímicos en las partes aéreas de las plantas. En general, las hojas presentan mayor diversidad de metabolitos, posiblemente, debido a su actividad metabólica alta (fotosíntesis), ya que la exposición a la luz modula la síntesis y presencia de fitoquímicos que protegen a las plantas contra patógenos o herbívoros (Andrade *et al.*, 2018).

7.4 Actividad antinociceptiva

La evaluación de la actividad antinociceptiva en este estudio, demostró que las flores de *E. americana* son un agente potencial en el tratamiento de dolor, debido a que, en los tres modelos evaluados, el EEa demostró efecto antinociceptivo. En este sentido, se han descrito resultados similares para el extracto hidroalcohólico de la corteza del tallo de *E. velutina* y *E. mulungu* (Marchioro *et al.*, 2005). En dichas especies, se han encontrado compuestos como erisotrina y eritralina, que son capaces de inhibir la producción de óxido nítrico, el cual es asociado al mecanismo del dolor. Este efecto obtenido fue significativo comparado con el vehículo y similar a los fármacos de referencia. Nuestros resultados son superiores a los reportados por otros autores, en el modelo *writhing*, donde se observa antinocicepción de 49% en dosis de 500 mg/kg en extracto metanólico de hojas de *E. variegata*. Por el contrario, estudios del extracto acuoso de hojas de *E. velutina* alcanzan un efecto antinociceptivo de hasta 88 y 96% en dosis de 300 y 600 mg/kg (Bhagyasri *et al.*, 2017). Estas diferencias en los resultados se pueden deber principalmente a las diferentes partes aéreas que se ocuparon y el tipo de extracción utilizada.

Los resultados obtenidos demuestran que EEa, induce analgesia periférica y probablemente se debe al bloqueo de la liberación de sustancias endógenas como las prostaglandinas. Ya que, la inyección de ácido acético activa nociceptores periféricos en las fibras nerviosas sensoriales y produce dolor e hiperalgesia, derivando en señales químicas a través de la liberación de mediadores proinflamatorios (Hassanpour *et al.*, 2020). Así mismo, el efecto observado en el modelo Formalina, puede estar asociado la presencia de compuestos bioactivos con actividad antinociceptiva y antiinflamatoria. Ya se

han reportado la presencia de alcaloides extraídos de las hojas de *E. variegata* con actividad antiinflamatoria. Tal es el caso del alcaloide hipoforina un compuesto aislado de muchas especies de *Erythrina* y otras especies de plantas, cuyos reportes la promueven como una de las moléculas que se considera como potencial candidata a fármaco antiinflamatorio (Aswad *et al.*, 2018). Ya que las prostaglandinas juegan un papel importante en el desarrollo de la segunda fase de la reacción inflamatoria en este modelo, se podría sugerir que EEa puede estar inhibiendo la acción de estas sustancias.

Por otro lado, existen publicaciones recientes sobre la presencia de altas concentraciones de carotenoides rojos como la capsantina y la capsorrubina; así como ácido ascórbico, en flores de *E. americana*. Dichos compuestos también han sido reportados como agentes inhibidores de radicales libres como $O_2^{\cdot-}$ y el $\cdot OH$, por lo que bloquean la peroxidación lipídica causada por estos agentes, que constituyen un mecanismo asociado al proceso inflamatorio.

Así mismo, el bloqueó de los radicales anteriormente mencionados, puede disminuir la producción de xantina oxidasa, una enzima implicada en el daño tisular (Umamaheswari *et al.*, 2009). Ya que el radical $O_2^{\cdot-}$ al actuar como aceptor de electrones, es también un cofactor de dicha enzima. De igual manera, se ha reportado una alta concentración de ácidos fenólicos como el ácido clorogénico, vainílico, ferúlico y rutina en flores de *E. americana* (Pinedo-Espinoza *et al.*, 2020), dichos estos compuestos han demostrado tener actividad antiinflamatoria.

Existe una gran variedad de estudios preclínicos, que respaldan el efecto analgésico y antiinflamatorio de diversas especies del género *Erythrina*. En su mayoría, se utilizaron solventes de alta polaridad (etanol, agua y metanol) para obtener los extractos. Lo que sugiere, que la actividad biológica demostrada, puede deberse en gran parte a compuestos polares, los cuales generalmente se asocian con una actividad antioxidante.

Por otro lado, se ha visto que las especies reactivas de oxígeno (ROS) intersticiales e intracelulares sobrecargadas y el Ca^{2+} intracelular son mensajeros clave en el desarrollo y mantenimiento del dolor patológico. Por lo que el efecto antioxidante hallado en este extracto puede estar participando en la disminución de la respuesta nociceptiva de los modelos de dolor en animales.

Además, se ha comprobado que algunos compuestos presentes en las especies del género *Erythrina*, como son las flavanonas (sigmoidina A y B), un flavonoide prenilado (abisinona V-40 -éter metílico), una prenilisoflavona (warangalona) y un pterocarpano (ericristagalina) tienen propiedades antiinflamatorias (Cui *et al.*, 2008; Sokeng *et al.*, 2013). Así mismo, se ha reportado una alta concentración de ácidos fenólicos como el ácido clorogénico, vainílico, ferúlico y rutina en flores de *E. americana* (Pinedo-Espinoza *et al.*, 2020), estos compuestos también se han reportado como agentes antiinflamatorios (Javed *et al.*, 2020; Valcheva-Kuzmanova *et al.*, 2019).

Por otro lado, hay que destacar que en las especies que componen este género, también se reporta una importante presencia de alcaloides. Algunos estudios, han encontrado que alcaloides como erisotrina e hipoforina redujeron el número de células inflamatorias en tejido pulmonar, principalmente eosinófilos y linfocitos. Posiblemente, mediante la disminución de las interleucinas IL-4 e IL-5, moléculas que estimulan la maduración de eosinófilos en la médula ósea y reclutan estas células al tejido. A su vez, esto puede afectar la modulación de la síntesis y liberación de mediadores inflamatorios, como prostaglandinas, óxido nítrico y citoquinas como IL-1 y TNF α (Amorim *et al.*, 2019).

Por lo tanto, esta evidencia corrobora que las flores de *Erythrina americana*, son agentes potenciales para el tratamiento del dolor e inflamación, sobre todo por los resultados observados en el modelo de formalina. Ya que este modelo bifásico inicia con la activación del canal quimiorreceptor TRPA1 (canal de iones de anquirina 1 del receptor potencial transitorio) por acción de la

formalina, expresado en las neuronas nociceptoras periféricas (Fischer *et al.*, 2015). Mientras que la fase tardía está mediada por una combinación de información periférica y sensibilización de la médula espinal (Langford & Mogil, 2008). La activación de TRPA1 en los nociceptores conduce a potenciales de acción que señalan dolor y provocan respuestas aversivas o protectoras. De hecho, el mal funcionamiento de TRPA1 puede provocar una señalización anormal del dolor (Brewster *et al.*, 2016). Durante la lesión del tejido, los ligandos endógenos activan TRPA1 y en consecuencia el proceso de inflamación, lo que promueve el dolor y la hipersensibilidad. Por lo tanto, las búsqueda de antagonistas de TRPA, involucra fármacos para combatir el dolor, la inflamación (Brewster *et al.*, 2016). Este extracto evaluado de EEa, tuvo un efecto en ambas fases del modelo, por lo que se puede decir que actúa como antagonista del receptor. Sin embargo, existen muchos otros mecanismos asociados a la activación.

7.5 Mecanismos de acción

El ON juega un papel esencial en el desarrollo y mantenimiento del dolor, las enzimas ONS se expresan en los ganglios sensoriales periféricos de la raíz dorsal (GRD) y en las neuronas de la médula espinal central, y éstas se regulan a la alza durante la inflamación y la lesión (Miyamoto *et al.*, 2009). Así mismo, recientemente se ha sugerido que TRPV1 y TRPA1, dos canales iónicos polimodales que detectan estímulos nocivos e inciden en los nociceptores periféricos, son activados por el ON. Es así que, donadores de ON, como L-Arginina pueden activar directamente el canal iónico TRPA1 (Brewster *et al.*, 2016), por lo que, la administración de inhibidores de ONS (como L-NAME), podría bloquear la activación de TRPA1 (Liu *et al.*, 2019). Al administrar, L-NAME y L-Arginina junto con el EEa, podría indicarnos el mecanismo de acción por medio del cual actúa.

La administración de L-NAME por si sola tuvo un efecto antinociceptivo, lo que evidenció la acción de ON en el proceso nociceptivo, ya que L-NAME inhibió la ONS y por ende la producción de ON, bloqueando la activación de TRPA1. Por

el contrario, la sola administración de L-Arginina, no incrementó la respuesta nociceptiva, es decir, no aumentó la producción de ON. Sin embargo, el ON puede tener efectos pro y antinociceptivos en el procesamiento nociceptivo, dependiendo de factores como el sitio de acción y la concentración del mismo (Gomes *et al.*, 2020). Por lo que, la dosis administrada de L-Arginina si pudo elevar la concentración de ON, pero entonces, la concentración producida pudo sobrepasar el efecto pro-nociceotivo y actuar como antinociceptivo, ya que éste fue el comportamiento observado en el modelo de Formalina de este estudio. Dicho mecanismo, está asociado a lo reportado por Gomes *et al.*, (2020), donde menciona que el Guanosín monofosfato cíclico (GMPc) actúa de manera opuesta al Adenosín monofosfato cíclico (AMPc), promoviendo analgesia periférica. De hecho, se ha demostrado que la administración periférica de GMPc o de fármacos que estimulan la señalización de GMPc, como la acetilcolina (ACh) y el carbacol, promueven analgesia (Gomes *et al.*, 2020). Lo anterior comprueba la sobreactivación de la vía L-Arginina/ON/cGMP y el efecto observado por la administración de L-Arginina en este estudio.

7.6 Metabolitos secundarios identificados en las flores de *E. americana*

De acuerdo con los resultados del perfil fitoquímico del EEa, se demuestra que los compuestos mayoritarios son alcaloides y flavonoides, lo cual coincide con lo encontrado en la literatura, donde se ha reportado una alta concentración de ácidos fenólicos como el ácido clorogénico, vainílico, ferúlico y rutina en flores de *E. americana* (Pinedo-Espinoza *et al.*, 2020), que además reportan tener actividad antiinflamatoria, por lo que podrían ser éstos los compuestos presentes.

Así mismo, algunos de los alcaloides encontrados en el género *Erythrina* y con actividad antiinflamatoria, son hipaforina y erisodina. Hipaforina, compuesto aislado de muchas especies de *Erythrina* y otras especies de plantas, se ha

considerado como potencial candidato a fármaco antiinflamatorio (*Aswad et al.*, 2018). Así también, el alcaloide erisodina causó una fuerte inhibición sobre el DPPH, comparable a la actividad del ácido ascórbico (Mujahid & Siddiqui, 2014), por lo que, también pueden ser algunos de los compuestos presentes en el extracto EEa.

Debido a que el perfil fitoquímico del extracto refleja que los compuestos mayoritarios son alcaloides y flavonoides, se sugiere, que los compuestos presentes pueden ser agentes potenciales para el tratamiento del dolor.

8 Conclusiones

Los datos presentados en este estudio muestran que los fitoconstituyentes del género *Erythrina* tienen la capacidad potencial de modular el proceso nociceptivo e inflamatorio, ya que el extracto presentó estos efectos en los tres modelos de dolor utilizados. Así mismo, se comprobó que el extracto tiene una importante actividad antioxidante, el cual debe estar asociado al efecto antinociceptivo demostrado. Así mismo, es importante seguir trabajando con esta especie para profundizar en los mecanismos moleculares implicados el efecto antioxidante y antinociceptivo. Con estos resultados se contribuye al conocimiento de *E. americana* sobre el uso se le da en la medicina tradicional para aliviar el dolor.

9 Referencias

1. Akbaribazm, M., Khazaei, M. R., & Khazaei, M. (2020). Phytochemicals and antioxidant activity of alcoholic/hydroalcoholic extract of *Trifolium pratense*. *Chinese Herbal Medicines*, 12(3), 326–335. <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2020.02.002>
2. Alam, M. K., Rana, Z. H., Islam, S. N., & Akhtaruzzaman, M. (2020). Comparative assessment of nutritional composition, polyphenol profile, antidiabetic and antioxidative properties of selected edible wild plant species of Bangladesh. *Food Chemistry*, 320(September 2019), 126646. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126646>
3. Ali, M. S., Ali, M. I., Ahmed, G., Afza, N., Lateef, M., Iqbal, L., Waffo, A. F. K., & Ahmed, Z. (2012). Potent antioxidant and lipoxygenase inhibitory flavanone and chalcone from *Erythrina mildbraedii* harms (Fabaceae) of cameroon. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section B Journal of Chemical Sciences*, 67(1), 98–102. <https://doi.org/10.1515/znb-2012-0116>
4. Amorim, J., Borges, M. de C., Fabro, A. T., Contini, S. H. T., Valdevite, M., Pereira, A. M. S., & Carmona, F. (2019). The ethanolic extract from *Erythrina mulungu* Benth. flowers attenuates allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Journal of Ethnopharmacology*, 242. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.08.009>
5. Anouar, E. H. (2016). Antioxidant activity of mildbone and mildbenone secondary metabolites of *Erythrina mildbraedii* Harms: A theoretical approach. *Computational and Theoretical Chemistry*, 1077, 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2015.11.003>
6. Asadi-Samani, M., Bahmani, M., & Rafieian-Kopaei, M. (2014). The chemical composition, botanical characteristic and biological activities of *Borago officinalis*: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(S1), S22–S28. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60199-1](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60199-1)
7. Aswad, M., Rayan, M., Abu-Lafi, S., Falah, M., Raiyn, J., Abdallah, Z., & Rayan, A. (2018). Nature is the best source of anti-inflammatory drugs: indexing natural products for their anti-inflammatory bioactivity. *Inflammation Research*, 67(1), 67–75. <https://doi.org/10.1007/s00011-017-1096-5>
8. Bedane, K. G., Kusari, S., Eckelmann, D., Masesane, I. B., Spiteller, M., & Majinda, R. R. T. (2015). Erylivingstone A-C with antioxidant and antibacterial activities from *Erythrina livingstoniana*. *Fitoterapia*, 105, 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.06.016>
9. Bedane, K. G., Kusari, S., Masesane, I. B., Spiteller, M., & Majinda, R. R. T. (2016). Flavanones of *Erythrina livingstoniana* with antioxidant properties. *Fitoterapia*, 108, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.11.014>
10. Bernardino-Nicanor, A., Luis Montañéz-Soto, J., De Los Ángeles Vivar-Vera, M., Mayolo Juárez-Goiz, J., Acosta-García, G., & González-Cruz, L. (2016). *Erythrina* nutraceuticals. *BioResources*, 11(4), 9741–9755.
11. Bhagyasri, Y., Nagalatha, G., Reddy, N. V., & Subramanian, N. S. (2017). Analgesic and anti-inflammatory activity of leaf extracts of *Erythrina variegata*. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 7(8), 681–692. <http://www.iajpr.com/archive/volume-7/aug-2017.html>
12. Bjørklund, G., & Chirumbolo, S. (2017). Role of oxidative stress and antioxidants in daily nutrition and human health. *Nutrition*, 33, 311–321.

- <https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.07.018>
13. Bokelmann, J. M. (2022). Calendula (*Calendula officinalis*): Flower. *Medicinal Herbs in Primary Care*, 263–267. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-84676-9.00034-9>
 14. Braga, G. C., Melo, P. S., Bergamaschi, K. B., Tiveron, A. P., Massarioli, A. P., & Alencar, S. M. de. (2016). Rendimento de extração, atividade antioxidante e compostos fenólicos dos subprodutos agro industriais de uva, manga e amendoim. *Ciencia Rural*, 46(8), 1498–1504. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150531>
 15. Brewster, M. S. J., Gaudet, R., & Biology, C. (2016). *workings revealed by electron cryomicroscopy*. 37(11), 1184–1192. <https://doi.org/10.1002/bies.201500085>.How
 16. Chen, D., Yao, J., Liu, T., Zhang, H., Li, R., Zhang, Z., & Gu, X. (2019). Research and application of *Portulaca oleracea* in pharmaceutical area. *Chinese Herbal Medicines*, 11(2), 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2019.04.002>
 17. Chukwujekwu, J. C., de Kock, C. A., Smith, P. J., Van Heerden, F. R., & Van Staden, J. (2016). Antiplasmodial activity of compounds isolated from *Erythrina caffra*. *South African Journal of Botany*, 106(1), 101–103. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.05.019>
 18. Ciobanu, M., Pirvu, L., Paun, G., Savin, S., Albu, B. G., Munteanu, C., Cusu, J. P., Atkinson, I., Culita, D. C., Petcu, G., & Parvulescu, V. (2019). Development of a new (bio)hybrid matrix based on *Althaea officinalis* and *Betonica officinalis* extracts loaded into mesoporous silica nanoparticles for bioactive compounds with therapeutic applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 51, 605–613. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.03.040>
 19. Corrigan, B. M., Van Wyk, B. E., Geldenhuys, C. J., & Jardine, J. M. (2011). Ethnobotanical plant uses in the KwaNobela Peninsula, St Lucia, South Africa. *South African Journal of Botany*, 77(2), 346–359. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.09.017>
 20. Cui, L., Thuong, P. T., Lee, H. S., Ndinteh, D. T., Mbafor, J. T., Fomum, Z. T., & Oh, W. K. (2008). Flavanones from the stem bark of *Erythrina abyssinica*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16(24), 10356–10362. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.10.012>
 21. D, N., JT, M., ZT, F., A, K., JC, M., MC, R., RM, G., S, M., & JL, R. (2004). Anti-inflammatory activities of two flavanones, sigmoidin A and sigmoidin B, from *Erythrina sigmoidea*. *Planta Medica*, 70(2), 104–107. <https://doi.org/10.1055/S-2004-815484>
 22. da Silva, M. M. B., Santana, A. S. C. O., Pimentel, R. M. M., Silva, F. C. L., Randau, K. P., & Soares, L. A. L. (2013). Anatomy of leaf and stem of *Erythrina velutina*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(2), 200–206. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000013>
 23. de Arajo-Jnior, J. X., de Oliveira, M. S. G., G.V., P., S., M., & E.G., A. (2012). A Phytochemical and Ethnopharmacological Review of the Genus *Erythrina*. *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*. <https://doi.org/10.5772/26997>
 24. De Luca, A., Sibilio, G., De Luca, P., & Del Guacchio, E. (2018). DNA barcoding to confirm the morphological identification of the coral trees (*Erythrina* spp., fabaceae) in the ancient gardens of Naples (Campania, Italy). *Plants*, 7(2). <https://doi.org/10.3390/plants7020043>
 25. dos Santos, D. S., Barreto, R. de S. S., Serafini, M. R., Gouveia, D. N.,

- Marques, R. S., Nascimento, L. de C., Nascimento, J. de C., & Guimarães, A. G. (2019). Phytomedicines containing *Matricaria* species for the treatment of skin diseases: A biotechnological approach. *Fitoterapia*, 138, 104267. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104267>
26. Duda, S. C., Mărghitaș, L. A., Dezmirean, D., Duda, M., Mărgăoan, R., & Bobiș, O. (2015). Changes in major bioactive compounds with antioxidant activity of *Agastache foeniculum*, *Lavandula angustifolia*, *Melissa officinalis* and *Nepeta cataria*: Effect of harvest time and plant species. *Industrial Crops and Products*, 77, 499–507. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.045>
 27. Dzoyem, J. P., McGaw, L. J., & Eloff, J. N. (2014). In vitro antibacterial, antioxidant and cytotoxic activity of acetone leaf extracts of nine under-investigated Fabaceae tree species leads to potentially useful extracts in animal health and productivity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-147>
 28. El-Masry, S., Amer, M. E., Abdel-Kader, M. S., & Zaatout, H. H. (2002). Prenylated flavonoids of *Erythrina lysistemon* grown in Egypt. *Phytochemistry*, 60(8), 783–787. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00202-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00202-9)
 29. Fernandes, L., Casal, S., Pereira, J. A., Saraiva, J. A., & Ramalhosa, E. (2017). Edible flowers: A review of the nutritional, antioxidant, antimicrobial properties and effects on human health. *Journal of Food Composition and Analysis*, 60, 38–50. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.03.017>
 30. Fischer, M. J. M., Soller, K. J., Sauer, S. K., Kalucka, J., Veglia, G., & Reeh, P. W. (2015). *Formalin Evokes Calcium Transients from the Endoplasmatic Reticulum*. 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123762>
 31. Gabr, S. K., Bakr, R. O., Elshishtawy, H. M., El-Fishawy, A. M., & El-Alfy, T. S. (2017). Botanical and genetic characters of *Erythrina × neillii* cultivated in Egypt. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27(3), 273–281. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.02.005>
 32. Gagné, F. (2014). Oxidative Stress. *Biochemical Ecotoxicology: Principles and Methods*, 103–115. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411604-7.00006-4>
 33. Garbacki, N., Gloaguen, V., Damas, J., Bodart, P., Tits, M., & Angenot, L. (1999). Anti-inflammatory and immunological effects of *Centaurea cyanus* flower-heads. *Journal of Ethnopharmacology*, 68(1–3), 235–241. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00112-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00112-9)
 34. García-Mateos, R., Soto-Hernández, M., & Vibrans, H. (2001). *Erythrina americana* miller (“Colorín”; Fabaceae), a versatile resource from Mexico: A review. *Economic Botany*, 55(3), 391–400. <https://doi.org/10.1007/BF02866562>
 35. Gomes, F. I. F., Cunha, F. Q., & Cunha, T. M. (2020). Peripheral nitric oxide signaling directly blocks inflammatory pain. *Biochemical Pharmacology*, 176(November 2019), 113862. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113862>
 36. Guo, T. Z., Wei, T., Huang, T. T., Kingery, W. S., & Clark, J. D. (2018). Oxidative Stress Contributes to Fracture/Cast-Induced Inflammation and Pain in a Rat Model of Complex Regional Pain Syndrome. *Journal of Pain*, 19(10), 1147–1156. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2018.04.006>
 37. Gurmessa, G. T., Kusari, S., Laatsch, H., Bojase, G., Tatolo, G., Masesane, I. B., Spittler, M., & Majinda, R. R. T. (2018). Chemical constituents of root and stem bark of *Erythrina brucei*. *Phytochemistry Letters*, 25(February), 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2018.03.006>
 38. Haque, R., Ali, M. S., Saha, A., & Alimuzzaman, M. (2006). Analgesic Activity of Methanolic Extract of the Leaf of *Erythrina variegata*. *Dhaka University*

- Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5(1), 77–79.
<https://doi.org/10.3329/DUJPS.V5I1.235>
39. Janbaz, K. H., Nisar, U., Ashraf, M., & Qadir, M. I. (2012). Spasmolytic, bronchodilatory and antioxidant activities of *Erythrina superosa* Roxb. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 69(6), 1111–1117.
40. Jang, Y., Cho, P. S., Yang, Y. D., & Hwang, S. W. (2018). Nociceptive Roles of TRPM2 Ion Channel in Pathologic Pain. *Molecular Neurobiology*, 55(8), 6589–6600. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0862-2>
41. Javed, F., Jabeen, Q., Aslam, N., & Awan, A. M. (2020). Pharmacological evaluation of analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of ethanolic extract of *Indigofera argentea* Burm. f. *Journal of Ethnopharmacology*, 259(May), 112966.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112966>
42. Juan, C. A., de la Lastra, J. M. P., Plou, F. J., & Pérez-Lebeña, E. (2021). The chemistry of reactive oxygen species (Ros) revisited: Outlining their role in biological macromolecules (dna, lipids and proteins) and induced pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9).
<https://doi.org/10.3390/IJMS22094642>
43. Kamble, M. Y., Mane, S. S., Murugan, C., & Jaisankar, I. (2018). Diversity of ethno-medicinal plants of tropical islands - with special reference to andaman and nicobar islands. In *Biodiversity and Climate Change Adaptation in Tropical Islands*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813064-3.00003-X>
44. Koike, A., Barreira, J. C. M., Barros, L., Santos-Buelga, C., Villavicencio, A. L. C. H., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Edible flowers of *Viola tricolor* L. as a new functional food: Antioxidant activity, individual phenolics and effects of gamma and electron-beam irradiation. *Food Chemistry*, 179, 6–14.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.01.123>
45. Kumar, A., Lingadurai, S., Jain, A., & Barman, N. (2010). *Erythrina variegata* Linn: A review on morphology, phytochemistry, and pharmacological aspects. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 147–152. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70908>
46. Lalli, J. Y. Y., Van Zyl, R. L., Van Vuuren, S. F., & Viljoen, A. M. (2008). In vitro biological activities of South African Pelargonium (Geraniaceae) species. *South African Journal of Botany*, 74(1), 153–157.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2007.08.011>
47. Langford, D. J., & Mogil, J. S. (2008). Pain Testing in the Laboratory Mouse. In *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals* (Second Edi). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-012373898-1.50027-9>
48. Lawal, B., Shittu, O. K., Oibiokpa, F. I., Berinyuy, E. B., & Mohammed, H. (2017). African natural products with potential antioxidants and hepatoprotectives properties: a review. *Clinical Phytoscience*, 2(1).
<https://doi.org/10.1186/s40816-016-0037-0>
49. Lee, S., Xiao, C., & Pei, S. (2008). Ethnobotanical survey of medicinal plants at periodic markets of Honghe Prefecture in Yunnan Province, SW China. *Journal of Ethnopharmacology*, 117(2), 362–377.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.02.001>
50. Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., & Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, 13, 757–772.
<https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>
51. Liu, N. Q., Van der Kooy, F., & Verpoorte, R. (2009). *Artemisia afra*: A

- potential flagship for African medicinal plants? *South African Journal of Botany*, 75(2), 185–195. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2008.11.001>
52. Liu, T., Zhang, M., Mukosera, G. T., Borchardt, D., Li, Q., Tipple, T. E., Ishtiaq Ahmed, A. S., Power, G. G., & Blood, A. B. (2019). L-NAME releases nitric oxide and potentiates subsequent nitroglycerin-mediated vasodilation. *Redox Biology*, 26. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2019.101238>
53. Macáková, K., Afonso, R., Saso, L., & Mladěnka, P. (2019). The influence of alkaloids on oxidative stress and related signaling pathways. *Free Radical Biology and Medicine*, 134, 429–444. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.026>
54. MacHumi, F., Bojase-Moleta, G., Mapitse, R., Masesane, I., & Majinda, R. R. T. (2006). Radical scavenging-flavonoids from *Erythrina abyssinica*. *Natural Product Communications*, 1(4), 287–292. <https://doi.org/10.1177/1934578x0600100404>
55. Madkour, L. H. (2020). Cellular signaling pathways with reactive oxygen species (ROS). *Reactive Oxygen Species (ROS), Nanoparticles, and Endoplasmic Reticulum (ER) Stress-Induced Cell Death Mechanisms*, 37–79. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822481-6.00003-7>
56. Marchioro, M., Blank, M. D. F. A., Mourão, R. H. V., & Antonioli, Â. R. (2005). Anti-nociceptive activity of the aqueous extract of *Erythrina velutina* leaves. *Fitoterapia*, 76(7–8), 637–642. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.07.002>
57. Maroyi, A. (2011). An ethnobotanical survey of medicinal plants used by the people in Nhema communal area, Zimbabwe. *Journal of Ethnopharmacology*, 136(2), 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.05.003>
58. Merlugo, L., Santos, M. C., Sant'Anna, L. S., Cordeiro, E. W. F., Batista, L. A. C., Miotto, S. T. S., Garcia, C. V., Moreira, C. M., & Mendez, A. S. L. (2015). Alkaloids in erythrina by UPLC-ESI-MS and in vivo hypotensive potential of extractive preparations. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/959081>
59. Mhlongo, L. S., & Van Wyk, B. E. (2019). Zulu medicinal ethnobotany: new records from the Amandawe area of KwaZulu-Natal, South Africa. *South African Journal of Botany*, 122, 266–290. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.02.012>
60. Mills, S. E. E., Nicolson, K. P., & Smith, B. H. (2019). Chronic pain: a review of its epidemiology and associated factors in population-based studies. *British Journal of Anaesthesia*, 123(2), e273–e283. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2019.03.023>
61. Miyamoto, T., Dubin, A. E., Petrus, M. J., & Patapoutian, A. (2009). TRPV1 and TRPA1 Mediate Peripheral Nitric Oxide-Induced Nociception in Mice. 4(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007596>
62. Moliner, C., Barros, L., Dias, M. I., Reigada, I., Ferreira, I. C. F. R., López, V., Langa, E., & Rincón, C. G. (2019). *Viola cornuta* and *Viola x wittrockiana*: Phenolic compounds, antioxidant and neuroprotective activities on *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 27(4), 849–859. <https://doi.org/10.1016/J.JFDA.2019.05.005>
63. Muhammad, M., Uddin, N., Bin Emran, T., Mamunur, M., Mahib, R., & Dash, R. (2014). Hypothesis Molecular docking and analgesic studies of *Erythrina variegata*'s derived phytochemicals with COX enzymes. www.bioinformation.net
64. Mujahid, M., Hussain, T., Siddiqui, H. H., & Hussain, A. (2017). Evaluation of hepatoprotective potential of *Erythrina indica* leaves against antitubercular

- drugs induced hepatotoxicity in experimental rats. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 8(1), 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.jaim.2016.10.005>
65. Mujahid, M., & Siddiqui, H. H. (2014). in- Vitro Evaluation of Free Radical Scavenging Activity of Erythrina Indica Leaves. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 4(4). <https://doi.org/10.22270/jddt.v4i4.867>
66. Muley, M. M., Krustev, E., & Mcdougall, J. J. (2016). Preclinical Assessment of Inflammatory Pain. In *CNS Neuroscience and Therapeutics* (Vol. 22, Issue 2, pp. 88–101). <https://doi.org/10.1111/cns.12486>
67. Mulik, S., & Ozuna, C. (2020). Mexican edible flowers: Cultural background, traditional culinary uses, and potential health benefits. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 21(March), 100235. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100235>
68. Musa, A.; Nazifi, A.B.; Usman, A.I.; Kassim, A. Evaluation of analgesic and behavioural effects of ethanol root bark extract of
69. *Erythrina senegalensis* DC (Fabaceae). UoN Protal 2016, 5, 81–86.
70. Nawale, S., Padma Priya, K., Pranusha, P., & Ganga Raju, M. (2018). Data of antihyperlipidaemic activity for methanolic extract of Tagetes patula Linn. flower head along with piperine, as bioavailability enhancer. *Data in Brief*, 21, 587–597. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.10.022>
71. Njamen, D., Djiogue, S., Zingue, S., Mvondo, M. A., & Nkeh-Chungag, B. N. (2013). In vivo and in vitro estrogenic activity of extracts from Erythrina poeppigiana (Fabaceae). *Journal of Complementary & Integrative Medicine*, 10(1), 63–73. <https://doi.org/10.1515/jcim-2013-0018>
72. Ondua, M., Njoya, E. M., Abdalla, M. A., & McGaw, L. J. (2019). Anti-inflammatory and antioxidant properties of leaf extracts of eleven South African medicinal plants used traditionally to treat inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, 234, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.12.030>
73. Ozawa, M., Kawamata, S., Etoh, T., Hayashi, M., Komiyama, K., Kishida, A., Kuroda, C., & Ohsaki, A. (2010). Structures of new erythrinan alkaloids and nitric oxide production inhibitors from Erythrina crista-galli. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 58(8), 1119–1122. <https://doi.org/10.1248/cpb.58.1119>
74. Patriota, L. L. de S., Ramos, D. de B. M., dos Santos, A. C. L. A., Silva, Y. A., Gama e Silva, M., Torres, D. J. L., Procópio, T. F., de Oliveira, A. M., Coelho, L. C. B. B., Pontual, E. V., da Silva, D. C. N., Paiva, P. M. G., de Lorena, V. M. B., Mendes, R. L., & Napoleão, T. H. (2020). Antitumor activity of Moringa oleifera (drumstick tree) flower trypsin inhibitor (MoFTI) in sarcoma 180-bearing mice. *Food and Chemical Toxicology*, 145(August). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111691>
75. Peleyeju, G. B., Emmanuel, T., Tata, C. M., Djuidje Fotsing, M. C., Niemann, N., Rhyman, L., Arderne, C., Ndinteh, D. T., & Ramasami, P. (2019). Crystal structure and antibacterial activity of scandenone (warangalone) from Erythrina plants. *Journal of Molecular Structure*, 1191, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.04.070>
76. Pinedo-Espinoza, J. M., Gutiérrez-Tlahque, J., Santiago-Saenz, Y. O., Aguirre-Mancilla, C. L., Reyes-Fuentes, M., & López-Palestina, C. U. (2020). Nutritional Composition, Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Wild Edible Flowers Consumed in Semiarid Regions of Mexico. *Plant Foods for Human Nutrition*, 75(3), 413–419. <https://doi.org/10.1007/s11130-020-00822-2>
77. Pillay, C.C.N.; Jäger, A.K.; Mulholland, D.A.; van Staden, J. Cyclooxygenase inhibiting and anti-bacterial activities of South African Erythrina species. J.

- Ethnopharmacol. 2001, 74, 231–237. [CrossRef]
78. Pires, T. C. S. P., Barros, L., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). Edible flowers: Emerging components in the diet. *Trends in Food Science and Technology*, 93, 244–258. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.09.020>
79. Pisoschi, A. M., Pop, A., Iordache, F., Stanca, L., Predoi, G., & Serban, A. I. (2021). Oxidative stress mitigation by antioxidants - An overview on their chemistry and influences on health status. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 209, 112891. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112891>
80. Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
81. Pompermaier, L., Marzocco, S., Adesso, S., Monizi, M., Schwaiger, S., Neinhuis, C., Stuppner, H., & Lautenschläger, T. (2018). Medicinal plants of northern Angola and their anti-inflammatory properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 216(January), 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.01.019>
82. Prabawati, N. B., Oktavirina, V., Palma, M., & Setyaningsih, W. (2021). Edible Flowers: Antioxidant Compounds and Their Functional Properties. *Horticulturae* 2021, Vol. 7, Page 66, 7(4), 66. <https://doi.org/10.3390/HORTICULTURAE7040066>
83. Robinson, M. M., & Zhang, X. (2011). the World Medicines Situation 2011 Traditional Medicines : Global Situation , Issues and Challenges. *World Health Organization, 3rd Edition*, 1–14.
84. Russell, E. G., & Cotter, T. G. (2015). New Insight into the Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in Cellular Signal-Transduction Processes. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 319). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.07.004>
85. Saidu, K.; Onah, J.; Orisadipe, A.; Olusola, A.; Wambebe, C.; Gamaniel, K. Antiplasmodial, analgesic, and anti-inflammatory
86. activities of the aqueous extract of the stem bark of *Erythrina senegalensis*. J. Ethnopharmacol. 2000, 71, 275–280. [CrossRef]
87. Saraswathi, J., Venkatesh, K., Baburao, N., Hilal, M. H., & Rani, A. R. (2011). Phytopharmacological importance of pelargonium species. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(13), 2587–2598.
88. Schlage, C., Mabula, C., Mahunnah, R. L. A., & Heinrich, M. (2000). Medicinal plants of the Washambaa (Tanzania): Documentation and ethnopharmacological evaluation. *Plant Biology*, 2(1), 83–92. <https://doi.org/10.1055/s-2000-296>
89. Shanmuga, S. C., & Subramanian, S. (2012). Musa Paradisiaca flower extract improves carbohydrate metabolism in hepatic tissues of streptozotocin-induced experimental diabetes in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3 SUPPL.), S1498–S1503. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60444-4](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60444-4)
90. Shi, G., Zhao, M., Zhao, Q., Huang, Y., & Chen, Y. (2011). Phytomedicine Mechanisms involved in the antinociception of petroleum ether fraction from the EtOH extract of *Chrysanthemum indicum* in mice. *European Journal of Integrative Medicine*, 18(7), 609–616. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.10.014>
91. Singh, H., Bhushan, S., Arora, R., Singh Buttar, H., Arora, S., & Singh, B. (2017). Alternative treatment strategies for neuropathic pain: Role of Indian medicinal plants and compounds of plant origin-A review. *Biomedicine and*

- Pharmacotherapy*, 92, 634–650.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.079>
92. Skrajda-Brdak, M., Dąbrowski, G., & Konopka, I. (2020). Edible flowers, a source of valuable phytonutrients and their pro-healthy effects – A review. *Trends in Food Science and Technology*, 103, 179–199.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.06.016>
93. Sokeng, S., Talla, E., Jeweldai, V., Koubé, J., & Dongmo, F. (2013). Anti-inflammatory effect of Abyssinone V-4'-methyl ether on acute and chronic inflammation models. *Undefined*.
94. Sotelo, A., López-García, S., & Basurto-Peña, F. (2007). Content of nutrient and antinutrient in edible flowers of wild plants in Mexico. *Plant Foods for Human Nutrition*, 62(3), 133–138. <https://doi.org/10.1007/s11130-007-0053-9>
95. Sowndhararajan, K., Joseph, J. M., & Rajendrakumaran, D. (2012). In vitro xanthine oxidase inhibitory activity of methanol extracts of *Erythrina indica* Lam. leaves and stem bark. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3 SUPPL.), S1415–S1417. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60428-6](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60428-6)
96. Swamy, M. K. (2020). Plant-derived bioactives: Chemistry and mode of action. *Plant-Derived Bioactives: Chemistry and Mode of Action*, 1–589.
<https://doi.org/10.1007/978-981-15-2361-8>
97. Takahashi, J. A., Rezende, F. A. G. G., Moura, M. A. F., Dominguet, L. C. B., & Sande, D. (2020). Edible flowers: Bioactive profile and its potential to be used in food development. *Food Research International*, 129, 108868.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108868>
98. Talla, E.; Njamen, D.; Mbafor, J.T.; Fomum, Z.T.; Kamanyi, A.; Mbanya, J.C.; Giner, R.M.; Recio, M.C.; Máñez, S.; Ríos, J.L.
99. Warangalone, the isoflavonoid anti-inflammatory principle of *Erythrina addisoniae* stem bark. *J. Nat. Prod.* 2003, 66, 891–893.
[CrossRef] [PubMed]
100. Tauseef, S., Ali, M. S., Ahmed, A., Ali, M. I., Ahmed, Z., Sherwani, S. K., Ahmed, G., Onocha, P. A., Joseph, N., Francois, A., Waffo, K., & Tauseef, F. (2013). *In vitro* Antioxidant activity analysis of five medicinally important plants. 2(4), 183–188.
101. Tene, V., Malagón, O., Finzi, P. V., Vidari, G., Armijos, C., & Zaragoza, T. (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchi, Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(1), 63–81.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.10.032>
102. Togola, A., Austerheim, I., Theis, A., Diallo, D., & Paulsen, B. (2008). Ethnopharmacological uses of *Erythrina senegalensis*: A comparison of three areas in Mali, and a link between traditional knowledge and modern biological science. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 4, 1–9.
<https://doi.org/10.1186/1746-4269-4-6>
103. Umamaheswari, M., Asokkumar, K., Sivashanmugam, A. T., Remyaraju, A., Subhadradevi, V., & Ravi, T. K. (2009). In vitro xanthine oxidase inhibitory activity of the fractions of *Erythrina stricta* Roxb. *Journal of Ethnopharmacology*, 124(3), 646–648.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.05.018>
104. Valcheva-Kuzmanova, S., Iren, B., Belcheva, S., Todorova, M., & Tashev, R. (2019). Chlorogenic acid and gallic acid elevate pain sensitivity threshold in olfactory bulbectomised rats. *European Neuropsychopharmacology*, 29(7), S562–S563.
<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2018.11.835>

105. Valsalam, S., Agastian, P., Arasu, M. V., Al-Dhabi, N. A., Ghilan, A. K. M., Kaviyarasu, K., Ravindran, B., Chang, S. W., & Arokiyaraj, S. (2019). Rapid biosynthesis and characterization of silver nanoparticles from the leaf extract of *Tropaeolum majus* L. and its enhanced in-vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and anticancer properties. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 191, 65–74.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.12.010>
106. Vasconcelos, S. M. M., Lima, N. M., Sales, G. T. M., Cunha, G. M. A., Aguiar, L. M. V., Silveira, E. R., Rodrigues, A. C. P., Macedo, D. S., Fonteles, M. M. F., Sousa, F. C. F., & Viana, G. S. B. (2007). Anticonvulsant activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu*. *Journal of Ethnopharmacology*, 110(2), 271–274.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.023>
107. Vasconcelos, S. M. M., Macedo, D. S., de Melo, C. T. V, Monteiro, A. P., Cunha, G. M. A., Sousa, F. C. F., Viana, G. S. B., Rodrigues, A. C. P., & Silveira, E. R. (2010). Central activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in mice . *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56(3), 389–393. <https://doi.org/10.1211/0022357022746>
108. Wangchuk, P., Yeshi, K., & Jamphel, K. (2017). Pharmacological, ethnopharmacological, and botanical evaluation of subtropical medicinal plants of Lower Kheng region in Bhutan. *Integrative Medicine Research*, 6(4), 372–387. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2017.08.002>
109. Wróblewska, K., Szumny, A., Żarowska, B., Kromer, K., Dębicz, R., & Fabian, S. (2019). Impact of mulching on growth essential oil composition and its biological activity in *Monarda didyma* L. *Industrial Crops and Products*, 129, 299–308. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2018.11.076>
110. Yenesew, A., Irungu, B., Derese, S., Midiwo, J. O., Heydenreich, M., & Peter, M. G. (2003). Two prenylated flavonoids from the stem bark of *Erythrina burttii*. *Phytochemistry*, 63(4), 445–448.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00209-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00209-7)
111. Yenesew, A., Midiwo, J. O., Heydenreich, M., Schanzenbach, D., & Peter, M. G. (2000). Two isoflavanones from the stem bark of *Erythrina saculeuxii*. *Phytochemistry*, 55(5), 457–459. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00349-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00349-6)
112. Zhang, C., Zhou, Y., Sun, Z., Feng, J., & Wang, Y. (2014). Polysaccharides extraction from *Erythrina variegata*, chemical characterization and its antioxidant activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 68, 267–273.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.05.009>
113. Zhang, L., Zhuang, H., Zhang, Y., Wang, L., Zhang, Y., Geng, Y., Gou, Y., Pei, S., & Wang, Y. (2018). Plants for health: An ethnobotanical 25-year repeat survey of traditional medicine sold in a major marketplace in North-west Yunnan, China. *Journal of Ethnopharmacology*, 224, 119–125.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.05.029>
114. Zhang, Y., Li, X. L., Lai, W. P., Chen, B., Chow, H. K., Wu, C. F., Wang, N. L., Yao, X. S., & Wong, M. S. (2007). Anti-osteoporotic effect of *Erythrina variegata* L. in ovariectomized rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(1), 165–169. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.07.005>
115. Zheng, J., Yu, X., Maninder, M., & Xu, B. (2018). Total phenolics and antioxidants profiles of commonly consumed edible flowers in China. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 1524–1540.
<https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1494195>

10. Anexos

10.1 Constancias de participación en Congresos



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo



COLEGIO NACIONAL DE QUÍMICOS FARMACÉUTICOS BIÓLOGOS MÉXICO, A.C. ©

El Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C.

y la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Otorgan el presente

RECONOCIMIENTO

a: Tania Jiménez Cabrera, Dra. Minarda De la O Arciniega,
Dra. Mirandeli Bautista Ávila, Dra. Claudia Velázquez González,
Dr. Osmar Antonio Jaramillo Morales

Por su participación como PONENTES del trabajo titulado: "Evaluación del efecto antinociceptivo del extracto etanólico de las flores comestibles de *Erythrina americana*" en el "XXVIII Congreso de Educación Química Farmacéutica Biológica y la XXIV Reunión Nacional de Estudiantes de Farmacia".

COLEGIO NACIONAL DE QUÍMICOS FARMACÉUTICOS BIÓLOGOS MÉXICO, A.C.

 DAR Juan José Díaz Esquivel Presidente del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C.	 Dr. Roberto Díaz Torres Presidente de la Comisión de Reunión Nacional de Estudiantes de Farmacia del CNQFBM, A.C.	 M. en C. Mayra Lucía Morales Galicia Vicepresidenta de la Comisión de Educación del CNQFBM, A.C.
 M. C. Esp. Adrián Moya Escalera Director del Instituto de Ciencias de la Salud		

Certificado



Tania Jiménez Cabrera, Minarda De la O Arciniega, Mirandeli Bautista Ávila,
Claudia Velázquez González, Osmar A. Jaramillo Morales, Nelly Cruz Cansino

Por presentar el trabajo

Capacidad antioxidante de las flores comestibles de *Erythrina americana* y su
efecto antinociceptivo

En el Evento Internacional

23 Conferencia de Química

Santiago de Cuba, 16 al 20 de noviembre de 2020

Como Cartel

Dra. C. Diana Sedal Yanes
Rectora de la Universidad de Oriente
Presidenta del Comité Organizador

Dra. C. Magaly Casals Hung
Secretaría Ejecutiva





Certificate of Attendance

Tania Jiménez Cabrera

For attending the Annual Meeting SFRR-E 2021, Redox Biology in the 21st Century:
A New Scientific Discipline, held in Belgrade, Serbia, 15-18 June

Prof. Daniela Caporossi
President, SFRR-E

Prof. Bato Korac
Chair, SFRR-E Belgrade 2021

10.2 Memorias de Congresos

UNIVERSITY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND VETERINARY MEDICINE CLUJ-NAPOCA



the **18th** INTERNATIONAL CONFERENCE
**LIFE SCIENCES FOR
SUSTAINABLE DEVELOPMENT**
26th - 28th September 2019, Cluj-Napoca, Romania

BOOK OF ABSTRACTS

No. 6/2019



26th - 28th September 2019, Cluj-Napoca, Romania
www.usamvcluj.ro



IN VITRO ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACT OF FLOWERS FROM *ERYTHRINA AMERICANA*

Tania JIMÉNEZ-CABRERA¹, Minarda De la O-ARCINIEGA¹
Osmar Antonio JARAMILLO-MORALES¹, Claudia VELÁZQUEZ-GONZÁLEZ¹,
Elena Guadalupe OLVERA-HERNÁNDEZ¹, Alejandro CHEHUE-ROMERO¹, Liana
Claudia SALANTA², Mirandeli BAUTISTA-ÁVILA^{1*}

¹Health Sciences Institute, Academic Department of Pharmacy, Autonomous University of the State of Hidalgo, México.

²Faculty of Food Science and Technology, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca, Romania

*Corresponding author: mirandeli.bautista@gmail.com

Introduction. The flowers of *Erythrina americana* are a very valuable food in different regions of Mexico. In addition, the aerial parts of the tree (leaves, bark and fruit) are used empirically in traditional medicine to treat some diseases such as cardiovascular disease, cancer and diabetes, related to oxidative stress.

Aims. Evaluate the antioxidant capacity of the ethanolic extract of the flowers of *E. americana*.

Materials and Methods: *In vitro* antioxidant activity of the crude extract was evaluated through 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) and the ferric reducing ability of plasma (FRAP) assays by triplicate. A sample of 100 μ L (2mg/mL ethanol extract) was mixed with 500 μ L DPPH reactant. After a 60 min, the absorbance was recorded at 520 nm and the results were calculated from the Trolox standard curve and expressed as Trolox equivalents. Also 20 μ L the sample was mixed with 980 μ L of ABTS⁺ solution, and absorbance was recorded at 754 nm after 7 min. The results were calculated from the ascorbic acid standard curve and expressed as ascorbic acid equivalents. Finally 900 μ L of prepared FRAP reagent was mixed with 100 μ L of sample; the absorbance at 593 nm was recorded after a 10 min incubation at 37 °C. FRAP values are expressed as μ M of Fe⁺² equivalents/g.

Results. The results showed a radical scavenging ability in the DPPH and ABTS assay with 173 μ mol ET/L and 23.28 μ mol EAc/L respectively. It also showed a reduction capacity of Fe⁺³ ions of 6.70 μ M Fe⁺²/L.

Conclusion. The ethanol extract from flowers of *E. americana* shows a moderate antioxidant capacity, which suggests that this food can have a beneficial role in human health.

Keywords: antioxidant, DPPH, *Erythrina*, FRAP

References

1. Bjørklund G., Chirumbolo S. (2017) Role of oxidative stress and antioxidants in daily nutrition and human health. Nutrition 33:311-321.

10.3 Publicación de artículo

International Journal of
Molecular Sciences

Review

**Promising Antioxidant Activity of *Erythrina* Genus:
An Alternative Treatment for Inflammatory Pain?**Tania Jiménez-Cabrera ¹, Mirandeli Bautista ^{1,*}, Claudia Velázquez-González ¹,
Osmar Antonio Jaramillo-Morales ², José Antonio Guerrero-Solano ¹, Thania Alejandra Urrutia-Hernández ¹
and Minarda De la O-Arciniega ^{1,*}

- ¹ Institute of Health Sciences, Autonomous University of the State of Hidalgo, San Agustín Tlaxiaca 55679, Hidalgo, Mexico; tania_jimenez@uaeh.edu.mx (T.J.-C.); claudiav@uaeh.edu.mx (C.V.-G.); gsnutricional@gmail.com (J.A.G.-S.); thania_urrutia9356@uaeh.edu.mx (T.A.U.-H.)
- ² Nursing and Obstetrics Department, Life Sciences Division, Campus Irapuato-Salamanca, Ex Hacienda El Copal, Km. 9 Carretera Irapuato-Silao, A.P. 311, Irapuato 36500, Guanajuato, Mexico; oa.jaramillo@ugto.mx
- * Correspondence: mibautista@uaeh.edu.mx (M.B.); mina@uaeh.edu.mx (M.D.I.O.-A.)

Abstract: The negative impact that oxidative stress has on health is currently known. The complex mechanism of free radicals initiates a series of chain reactions that contribute to the evolution or development of different degenerative disorders. Likewise, these disorders are usually accompanied by inflammatory processes and, therefore, pain. In this sense, reactive oxygen species (ROS) have been shown to promote the nociceptive process, but effective treatment of pain and inflammation still represents a challenge. Over time, it has been learned that there is no single way to relieve pain, and as long as there are no other alternatives, the trend will continue to apply multidisciplinary management, such as promote the traditional use of the *Erythrina* genus to manage pain and inflammation. In this sense, the *Erythrina* genus produces a wide range of secondary metabolites, including flavanones, isoflavones, isoflavones, and pterocarpanes; these compounds are characterized by their antioxidant activity. Phenolic compounds have demonstrated their ability to suppress pro-oxidants and inhibit inflammatory signaling pathways such as MAPK, AP1, and NFκB. Although there is preclinical evidence supporting its use, the pharmacological effect mechanisms are not entirely clear. Nowadays, there is a fast advancement in knowledge of the disciplines related to drug discovery, but most of nature's medicinal potential has not yet been harnessed. This review analyzes the decisive role that the *Erythrina* genus could play in managing inflammatory pain mediated by its compounds and its uses as an antioxidant.

Keywords: *Erythrina*; antioxidant; inflammatory pain; prenylated flavonoids



Citation: Jiménez-Cabrera, T.; Bautista, M.; Velázquez-González, C.; Jaramillo-Morales, O.A.; Guerrero-Solano, J.A.; Urrutia-Hernández, T.A.; De la O-Arciniega, M. Promising Antioxidant Activity of *Erythrina* Genus: An Alternative Treatment for Inflammatory Pain? *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 248. <https://doi.org/10.3390/ijms22010248>

Received: 20 November 2020

Accepted: 23 December 2020

Published: 29 December 2020

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Molecular Origin of Inflammatory Pain

Pain is traditionally defined as a complex sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage or described in terms of such damage (International Association for the Study of Pain) [1–3]. It is a complex process that involves neuronal signaling pathways between the peripheral nervous system (PNS) and the central nervous system (CNS) [1,3]. The transduction of noxious stimuli (those that actually or potentially damage tissues) is carried out by a nociceptor, creating an electrophysiological neuronal signal encoded in the form of an action potential that is transmitted to the CNS. The acute injury is associated with a first, well-localized pain sensation transduced and transmitted by nociceptors. Although pain is one of the body's most important adaptation and protection mechanisms, the degree of tissue damage leads to the release of inflammatory mediators that bind to its receptors, triggering an enzymatic cascade [1]. Thus, inflammatory pain is generated by an increase in sensitivity due to the cellular response associated with tissue damage, promoting the influx of activated cells such as macrophages, lymphocytes, and mast cells that release inflammatory mediators such as bradykinin, H₂O ions, ATP, purines,



PP146

Antinociceptive and anti-inflammatory effect of *Erythrina americana* flowers: an alternative for pain management

Tania Jiménez Cabrera*, Minarda De la O Arciniega, Mirandeli Bautista, Claudia Velázquez González, Elena G. Olvera Hernández

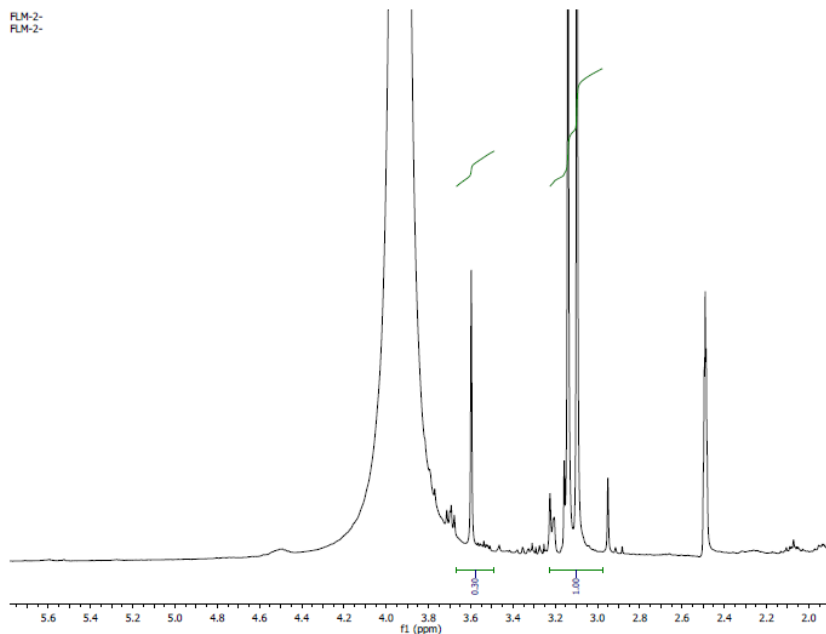
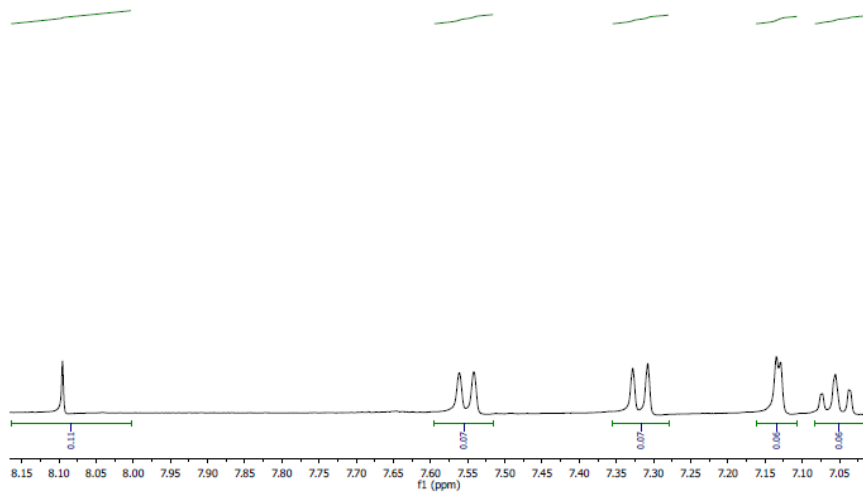
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca, Mexico

Although pain is a physiological alert mechanism activated by detecting a harmful or potentially harmful stimulus, pain is frequently related to inflammatory processes and can persist even after the injury has healed. For this reason, its treatment has always been the object of study since pain that is not relieved (chronic pain) is recognized worldwide as a health problem that reduces the quality of life of those who suffer from it. The genus *Erythrina* is made up of a great diversity of species, at least 120. The different parts of the tree are used in traditional medicine to treat various health disorders, among which the relief of pain and inflammation stands out. However, few studies demonstrate antinociceptive and anti-inflammatory activity. To evaluate analgesia in nociceptive and inflammatory pain, first, Wistar rats were divided into six groups. Then the animals were treated with different doses of ethanol extract from the flowers of *E. americana* (100, 178, 316, and 562 mg/kg), diclofenac (17 mg/kg), or vehicle (tween 1%) by the intragastric route. Pain stimulation was performed by subcutaneous administration of 2% formalin (50 μ L/animal) to the hind paw and, the nociceptive response was measured in periods of 1 minute every 5 minutes for one hour. The results showed that the oral administration of the extract significantly reduced the nociceptive behavior produced by formalin administration. It is suggested that antioxidant compounds such as rutin or chlorogenic acid in flowers of *E. americana* are responsible for the analgesic activity, which could provide beneficial effects in pain management.

E-mail address: mibautista@uaeh.edu.mx

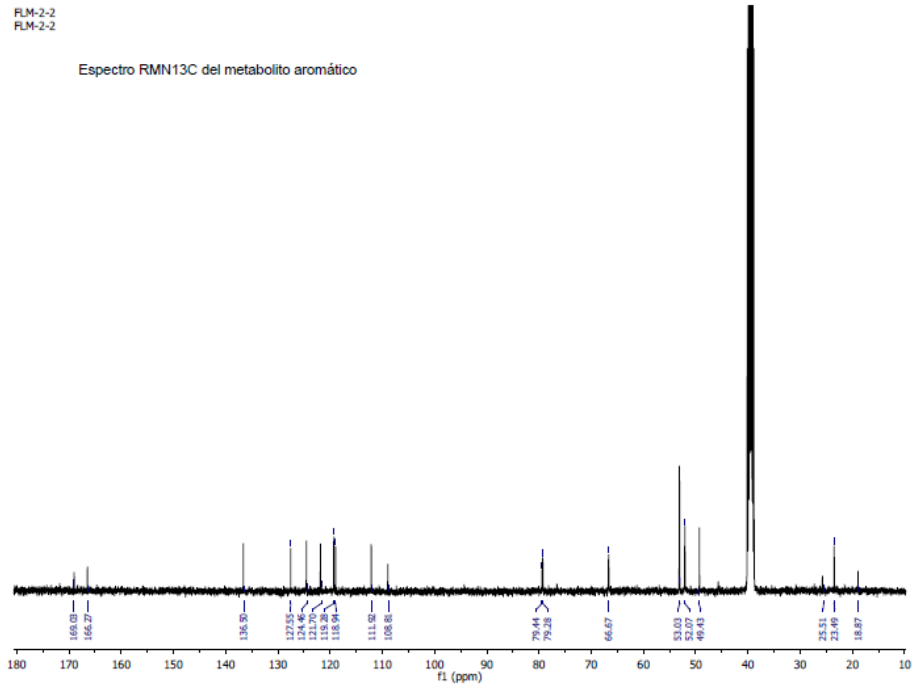
10.4 Espectros de los metabolitos aislados

FLM-2-
FLM-2- Espectro RMN1H del metabolito aromático

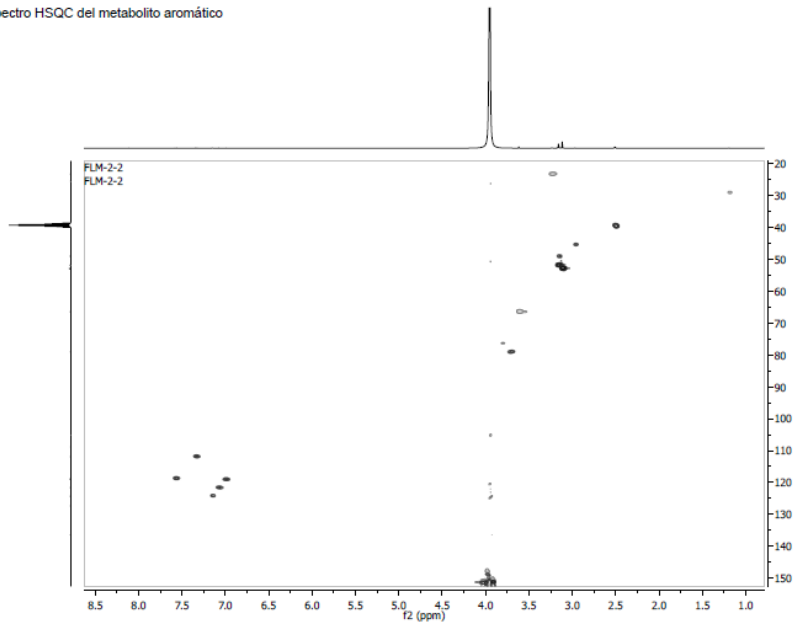


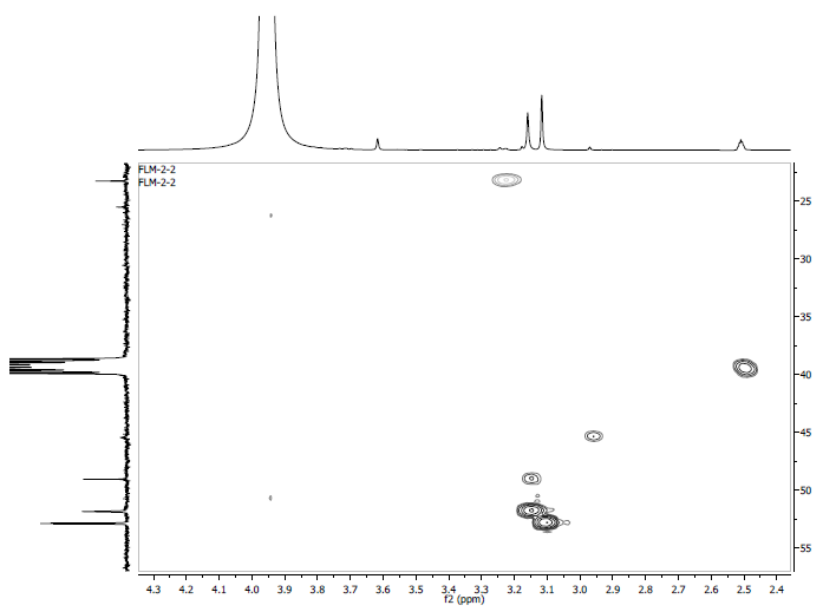
FLM-2-2
FLM-2-2

Espectro RMN13C del metabolito aromático

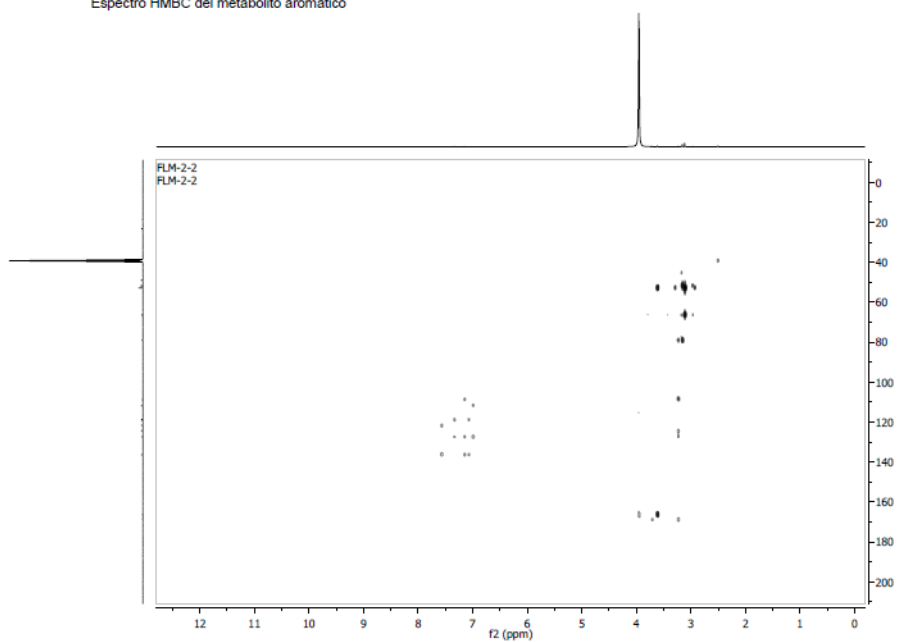


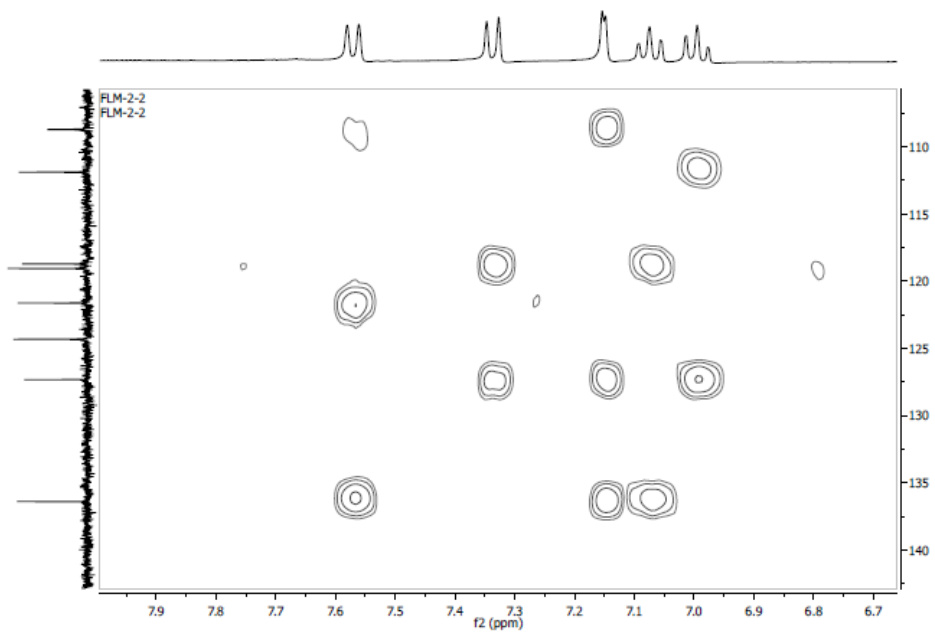
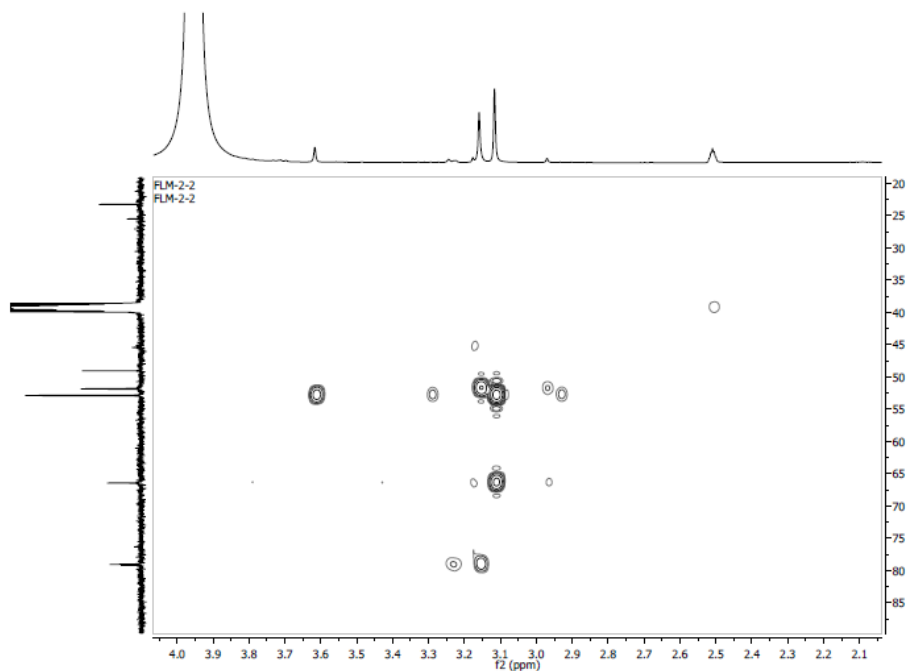
espectro HSQC del metabolito aromático

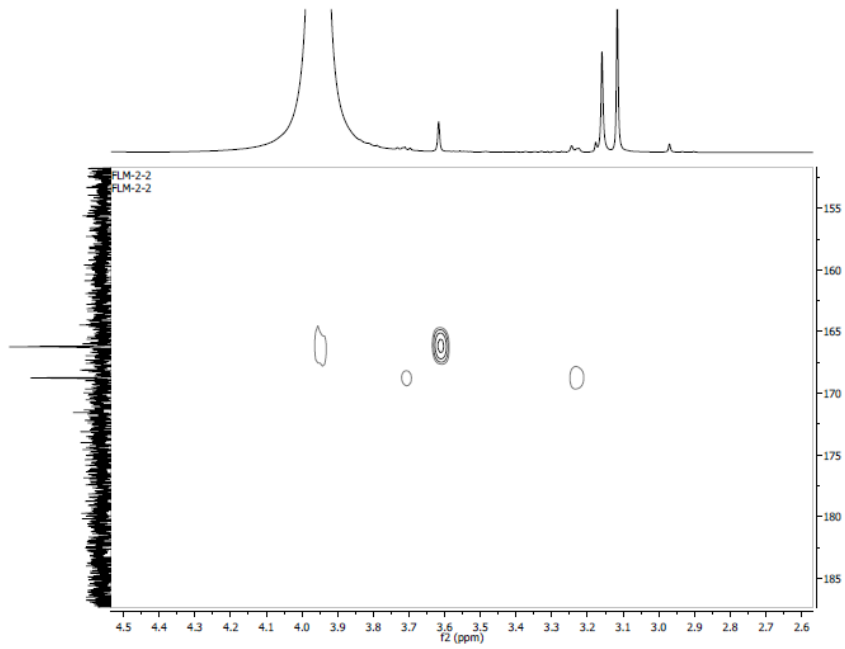




Espectro HMBC del metabolito aromático

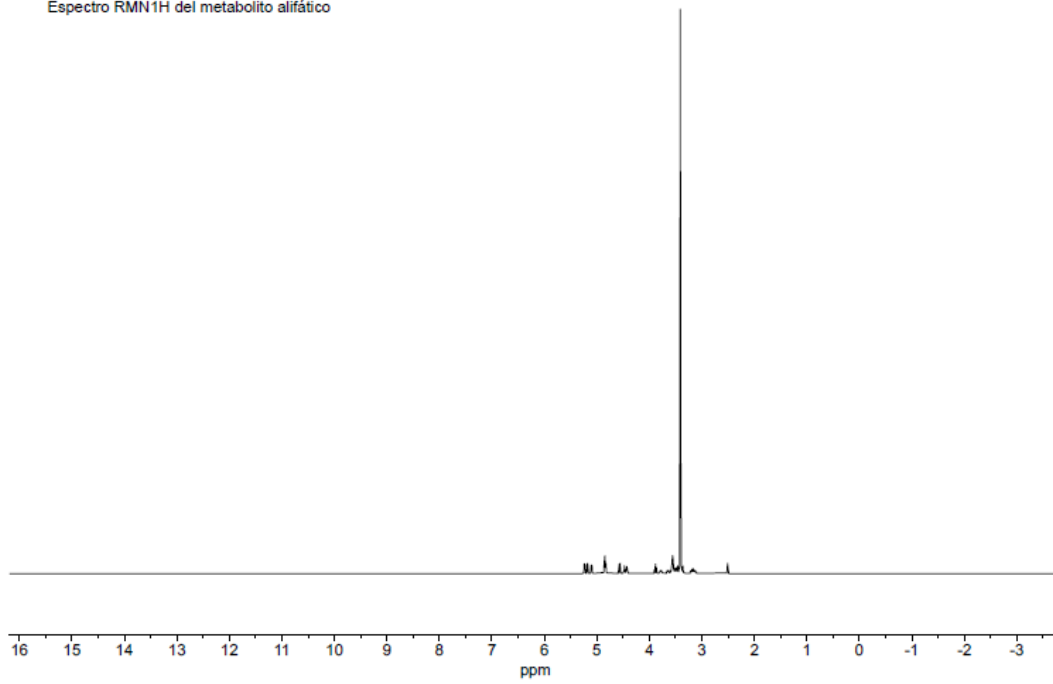


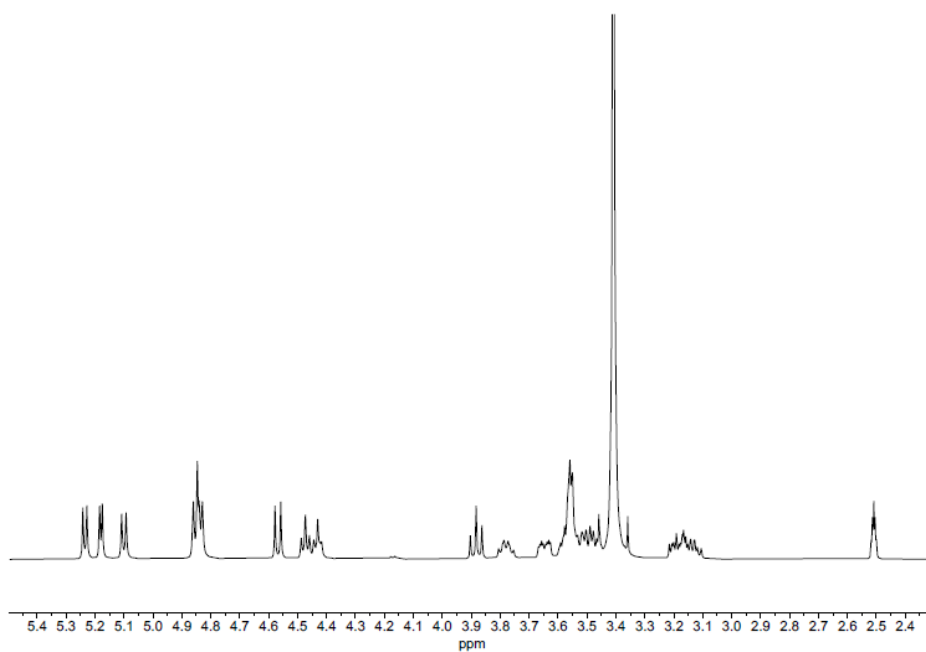




RRDMSO

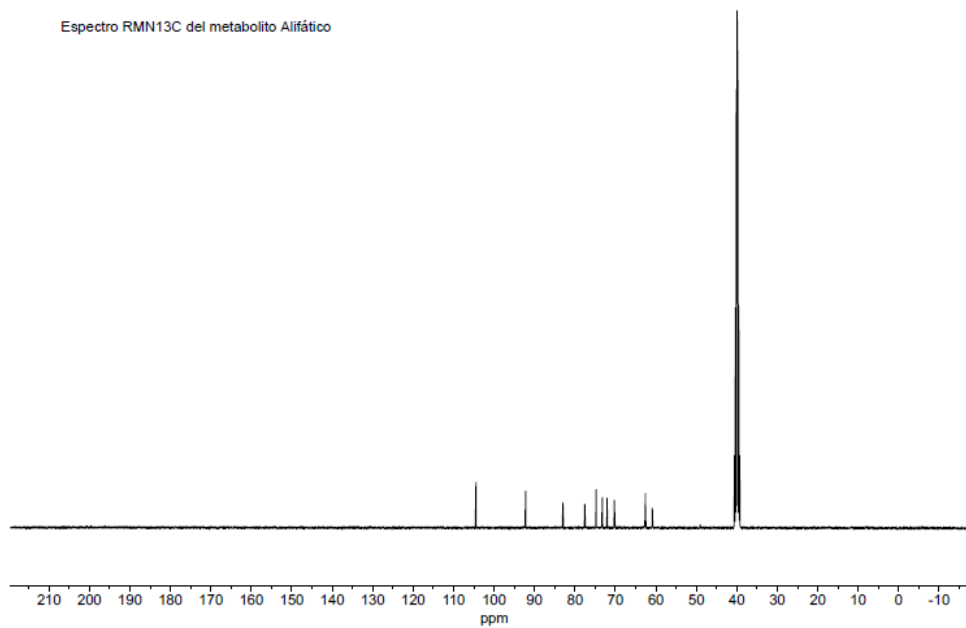
Espectro RMN1H del metabolito alifático

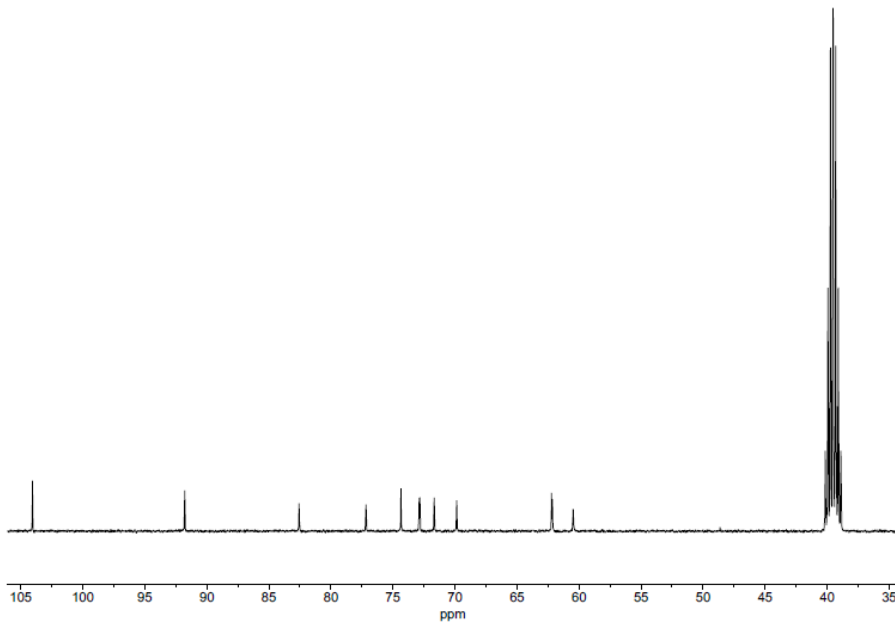




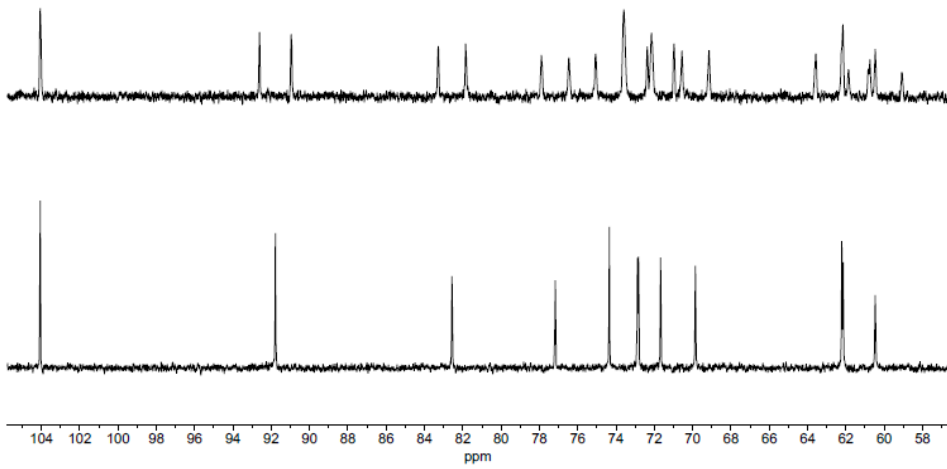
RMR EM 19-43
25mg

Espectro RMN13C del metabolito Alifático

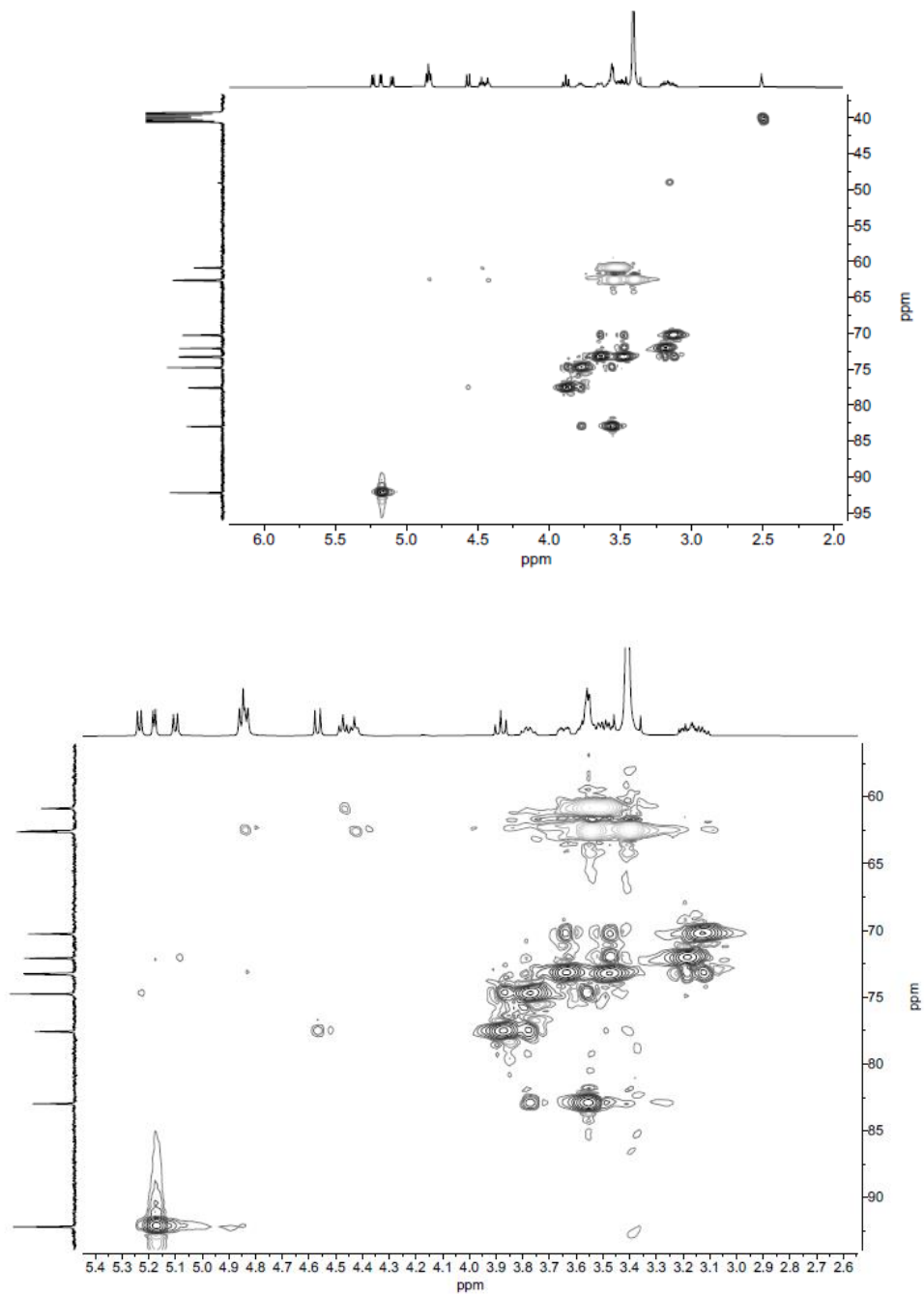




Espectro de RMN13C acoplado a 1H del metabolito alifático



Espectro HSQC del metabolito alifático



Espectro HMBC del metabolito alifático

