



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOMEDICINA

EVALUACIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTINOCICEPTIVA DE *Salvia circinata*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

BIOMEDICINA

PRESENTA:

GABRIEL FERNANDO MORENO PÉREZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. EVA AGUIRRE HERNÁNDEZ

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. MARIA EVA GONZÁLEZ TRUJANO

INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA JUAN RAMÓN DE LA FUENTE

DRA. MARTHA JUANA MARTÍNEZ GORDILLO

EFACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOMEDICINA

EVALUACIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTINOCICEPTIVA DE *Salvia circinata*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

BIOMEDICINA

PRESENTA:

GABRIEL FERNANDO MORENO PÉREZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. EVA AGUIRRE HERNÁNDEZ

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. MARIA EVA GONZÁLEZ TRUJANO

INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA JUAN RAMÓN DE LA FUENTE

DRA. MARTHA JUANA MARTÍNEZ GORDILLO

EFACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO 2017



COORDINACIÓN

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/782/2016

ASUNTO: Oficio de Jurado

Lic. Ivonne Ramirez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 31 de octubre de 2016 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** del (la) alumno (a) **MORENO PÉREZ GABRIEL FERNANDO** con número de cuenta **302869394** con la tesis titulada "**Evaluación química y actividad antinociceptiva de *Salvia circhinata***", realizada bajo la dirección del (la) **DRA. EVA AGUIRRE HERNÁNDEZ**:

- Presidente: DRA. ROSA VENTURA MARTINEZ
- Vocal: M. EN C. FRANCISCO ALBERTO BASURTO PEÑA
- Secretario: DRA. MARTHA JUANA MARTINEZ GORDILLO
- Suplente: M. EN C. RUBEN SAN MIGUEL CHAVEZ
- Suplente: DRA. MARIA EVA GONZALEZ TRUJANO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 2 de diciembre de 2016


DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



MCAA/MJFM/ASR/pp

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT, por la beca numero 385789 (CVU 631351).

A los miembros del comité tutor:

Dra. Eva Aguirre Hernández

Dra. Maria Eva González Trujano

Dra. Martha Juana Martínez Gordillo.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Dolor.....	5
2.1.1 Definición de dolor	5
3.7.2 Epidemiología del dolor en México.....	5
2.2 Dolor, nocicepción, sufrimiento y conductas de dolor	6
2.3 Clasificación del dolor.	7
2.4 Dolor visceral.....	9
2.5 Aspectos terapéuticos del dolor	10
2.5.1 Antiinflamatorios no esteroideos.....	11
2.5.2 Ketorolaco	12
2.5.3 Efectos adversos de los AINES.....	13
2.5.4 Importancia del estudio de las plantas medicinales como alternativa terapéutica contra el dolor	14
2.6 Etnobotánica y etnofarmacología en México	14
2.7 Género Salvia.....	15
2.7.1 Distribución del género Salvia en México.	16
2.8 Usos etnobotánicos y farmacológicos del género Salvia en México.....	16
2.9 Compuestos con actividad antinociceptiva en el género Salvia	18
2.10 Composición química	19
2.10.1 Terpenos	19
2.11 COMPUESTOS FENÓLICOS.....	22
2.11.1 Ácidos fenólicos.....	22
2.11.2 Flavonoides	23
2.12 Salvia circinata Cav.	25
2.12.1 Descripción botánica de Salvia circinata	25
2.12.4 Química y farmacología de Salvia circinata.....	26
3. HIPOTESIS	27
4. OBJETIVOS	27
4.1 Objetivo general.	27
4.2 Objetivos particulares.....	27

5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
5.1	Material vegetal	28
	FITOQUÍMICA	28
5.2	Diseño experimental en fitoquímica	28
5.3	Obtención de los extractos	30
5.4	Identificación preliminar de los compuestos presentes en los extractos.....	30
5.5	Análisis mediante cromatografía de líquidos de alta resolución	31
5.5.1	Análisis de terpenos.....	31
5.5.2	Análisis de ácidos fenólicos	31
5.5.3	Análisis de flavonoides	32
5.5.4	Elaboración de curvas de calibración	32
5.5	Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas del extracto de hexano.....	32
5.6	Fraccionamiento y obtención de compuestos puros del extracto de acetato de etilo y metanol	33
5.6.1	Cromatografía en columna de la fracción de acetato de etilo obtenida de la partición del extracto de acetato de etilo	34
5.6.2	Cromatografía en columna de la fracción de acetato de etilo obtenida del extracto metanólico.....	35
	EVALUACION FARMACOLÓGICA	37
5.7	Animales.....	37
5.9	Administración de los tratamientos.....	37
5.10	Prueba de estiramiento abdominal (Writhing)	37
5.11	Determinación del margen de seguridad.....	38
5.12	Análisis estadístico	38
6.	RESULTADOS	39
	Fitoquímica.....	39
6.1	Rendimiento de los extractos	39
6.2	Identificación por CCF de terpenos de <i>S. circinata</i>	40
6.3	Análisis fitoquímico del extracto de hexano	40
6.3.1	Identificación de compuestos por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM).....	40
6.3.2	Análisis mediante CLAR del extracto de hexano	43
6.4	Análisis del extracto de acetato de etilo	43

6.4.1 Identificación y cuantificación de terpenoides mediante CLAR.....	43
6.4.2 Identificación y cuantificación de ácidos fenólicos	44
6.4.3 Identificación y cuantificación de flavonoides	45
6.4.4 Aislamiento del amarisolide	45
6.5 Análisis del extracto de metanol.....	46
6.5.1 Identificación y cuantificación de terpenoides mediante CLAR.....	46
6.5.2 Identificación de ácidos fenólicos	47
6.5.3 Identificación y cuantificación de flavonoides	47
6.5.4 Aislamiento de la pedalitina.....	48
6.6 Análisis fitoquímico del extracto acuoso	48
6.6.1 Identificación y cuantificación de terpenoides mediante CLAR	48
6.6.2 Identificación y cuantificación de ácidos fenólicos	49
6.6.3 Identificación y cuantificación de flavonoides	49
6.7 concentración de metabolitos en los extractos de <i>S. circinata</i>	50
Evaluación farmacológica.....	51
6.7.1 Evaluación farmacológica del extracto de hexano.....	51
6.7.2 Evaluación farmacológica del extracto de acetato de etilo	52
6.7.3 Evaluación farmacológica del amarisolide	55
6.7.4 Evaluación farmacológica del extracto de metanol	56
6.7.5 Evaluación farmacológica de la pedalitina	58
6.7.6 Evaluación farmacológica del extracto acuoso	60
7. DETERMINACIÓN DEL MARGEN DE SEGURIDAD	61
8. DISCUSIÓN.....	62
9. CONCLUSIONES	67
10. REFERENCIAS.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vías neurales que transmiten la información dolorosa desde los órganos viscerales	10
Figura 2. Dos representantes de esqueletos de saponina ácido oleanólico (triterpeno) y diosmina (esteroidal)	20
Figura 3. Estructuras químicas de los ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico (A) y el ácido benzoico (B)	22
Figura 4. Ejemplar fresco de <i>Salvia circinata</i>	26
Figura 5. Diagrama general del diseño experimental para la parte fitoquímica.....	29
Figura 6. (A) Método para la separación, aislamiento y purificación del Amarisolide en el extracto de acetato de etilo; (B) procedimiento para la separación, purificación e identificación del flavonoide pedaltina. 34	
Figura 7. Detección de terpenos en extractos no polares de <i>Salvia circinata</i> : Extracto hexánico (A y B), Extracto de acetato de etilo (C). Placa A: carril 1. Extracto de hexano, 2. Ácido ursólico y 3. Ácido oleanólico. Placa B, carril 1. Extracto de hexano, 2. α -amirina y 3. β - amirina. Placa C, carril 1. Extracto de hexano, 2: Extracto de acetato de etilo, 3. α -amirina y 4. β - amirina.	40
Figura 8. Cromatograma de gases -masas del extracto de hexano de <i>S. circinata</i>	41
Figura 9. Identificación por CLAR de terpenos presentes en el extracto de hexano de <i>S. circinata</i>	43
Figura 10. Identificación por CLAR de terpenos presentes en el extracto de acetato de etilo de <i>S. circinata</i> . 44	
Figura 11. Identificación por CLAR de ácidos fenólicos presentes en el extracto de acetato de etilo de <i>S. circinata</i>	44
Figura 12. Identificación por CLAR de flavonoides presentes en el extracto de acetato de etilo de <i>S. circinata</i>	45
Figura 13. Identificación por CLAR de terpenos presentes en el extracto metanólico de <i>S. circinata</i>	46
Figura 14. Identificación por CLAR de ácidos fenólicos presentes en el extracto de metanol de <i>S. circinata</i> . 47	
Figura 15. Identificación por CLAR de flavonoides presentes en el extracto metanólico de <i>S. circinata</i>	47
Figura 16. Identificación de terpenos presentes en el extracto acuoso de <i>S. circinata</i>	48
Figura 17. Identificación de ácidos fenólicos presentes en el extracto acuoso de <i>S. circinata</i>	49
Figura 18. Identificación de los flavonoides presentes en el extracto acuoso de <i>S. circinata</i>	49
Figura 19. Efecto antinociceptivo del extracto de hexano de <i>S. circinata</i> : curso temporal (A), estiramientos totales (B). K= ketorolaco (1 mg/kg, i.p., fármaco de referencia antinociceptiva). Las barras representan la media \pm el error estándar de seis animales. Los asteriscos indican diferencias significativas $p < 0.05$ con respecto al vehículo, ANADEVa seguida de la prueba de Dunnett.....	51
Figura 20. Porcentaje de antinocicepción del extracto de hexano en las dosis evaluadas K= ketorolaco 1 mg/kg	52

Figura 21. Efecto antinociceptivo del extracto de acetato de etilo de <i>S. circinata</i> : curso temporal (A), estiramientos totales (B). K= ketorolaco (1 mg/kg, i.p., fármaco de referencia antinociceptiva). Las barras representan la media \pm el error estándar de seis animales. Los asteriscos indican diferencias significativas $p < 0.05$ con respecto al vehículo, ANADEVA seguida de la prueba de Dunnett	53
Figura 22. Porcentaje de antinocicepción del extracto de acetato de etilo en las dosis evaluadas K= ketorolaco 1 mg/kg.....	54
Figura 23. Efecto antinociceptivo del amarisolide de <i>S. circinata</i> : curso temporal (A), estiramientos totales (B). K= ketorolaco (1 mg/kg, i.p., fármaco de referencia antinociceptiva). Las barras representan la media \pm el error estándar de seis animales. Los asteriscos indican diferencias significativas $p < 0.05$ con respecto al vehículo, ANADEVA seguida de la prueba de Dunnett	55
Figura 24. Porcentaje de antinocicepción del amarisolide en las dosis evaluadas.	56
Figura 25. Efecto antinociceptivo del extracto de metanol de <i>S. circinata</i> : curso temporal (A), estiramientos totales (B). K= ketorolaco (1 mg/kg, i.p., fármaco de referencia antinociceptiva). Las barras representan la media \pm el error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas $p < 0.05$ con respecto al vehículo, ANADEVA seguida de la prueba de Dunnett.	57
Figura 26. Porcentaje de antinocicepción del extracto de metanol en las dosis evaluadas, K = ketorolaco (1 mg/kg).....	57
Figura 27. Efecto antinociceptivo de la pedalitina de <i>S. circinata</i> : curso temporal (A), estiramientos totales (B). K= ketorolaco (1 mg/kg, i.p., fármaco de referencia antinociceptiva). Las barras representan la media \pm el error estándar de seis animales. Los asteriscos indican diferencias significativas $p < 0.05$ con respecto al vehículo, ANADEVA seguida de la prueba de Dunnett	58
Figura 28. Porcentaje de antinocicepción de la pedalitina en las dosis evaluadas.	59
Figura 29. Efecto antinociceptivo del extracto acuoso de etilo de <i>S. circinata</i> : curso temporal (A), estiramientos totales (B). K= ketorolaco (1 mg/kg, i.p., fármaco de referencia antinociceptiva). Las barras representan la media \pm el error estándar, Los asteriscos indican diferencias significativas $p < 0.05$ con respecto al vehículo, ANADEVA seguida de la prueba de Dunnett.	60
Figura 30. Porcentaje antinocicepción del extracto acuoso en las dosis evaluadas.	61
Figura 31. Curso temporal de la ganancia de peso de los grupos tratados contra un grupo control	61

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Efectos adversos de los AINES modificado de Goodman y Gilman, 2011-----	13
Cuadro 2. Uso de salvas en México -----	16
Cuadro 3. Terpenos con actividad antinociceptiva y antiinflamatoria -----	21
Cuadro 4. Ácidos fenólicos con actividad antinociceptiva y antiinflamatoria -----	23
Cuadro 5. Flavonoides con actividad antinociceptiva y antiinflamatoria -----	24
Cuadro 6. Subfracciones obtenidas de la columna cromatográfica de la fracción de acetato de etilo -----	35
Cuadro 7. Subfracciones obtenidas de la columna cromatográfica de la fracción de acetato de etilo. -----	35
Cuadro 8. Rendimiento de los extractos obtenidos de la parte aérea de <i>S. circinata</i> -----	39
Cuadro 9. Identificación de compuestos por CG-EM en el extracto de hexano de <i>S. circinata</i> -----	42
Cuadro 10. Concentración de los metabolitos de los extractos de <i>S. circinata</i> expresada en $\mu\text{g}/\text{mg}$ -----	50

RESUMEN

Salvia circinata Cav. una especie nativa de México, que se utiliza en la medicina tradicional de Santiago Huauclilla Oaxaca como remedio para patologías del tracto gastrointestinal que cursan con dolor. El objetivo del presente estudio fue realizar el análisis químico y evaluar la posible actividad antinociceptiva de los extractos orgánicos y acuoso de *S. circinata* utilizando un modelo murino de dolor visceral. Los extractos fueron obtenidos mediante maceración de la parte aérea a temperatura ambiente; la determinación del margen de seguridad sugiere que la dosis letal (DL) se encuentra por arriba de los 2000 mg/kg. La evaluación farmacológica se realizó mediante el modelo de estiramiento abdominal “Writhing”, donde se contabilizaron el número de estiramientos abdominales realizados cada 5 min durante 30 min utilizando las dosis de 1, 10, 30, 100 y 300 mg/kg de cada extracto. El análisis fitoquímico se llevó a cabo mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para el extracto de hexano y cromatografía líquida de alta resolución para el resto para identificar compuestos de naturaleza triterpénica, flavonoides y ácidos fenólicos como posibles constituyentes bioactivos en el extracto. Los resultados mostraron efecto antinociceptivo significativo no dependiente de la dosis en comparación al control, donde se lograron identificar compuestos con reconocida actividad antinociceptiva y anti-inflamatoria: ácido ursólico, β -amirina, ácido oleanólico, ácido ferúlico, ácido clorogénico, ácido caféico, rutina, quercetina y florizina. Los compuestos puros amarisolide y pedalitina se aislaron mediante la técnica de separación por cromatografía en columna y recristalización de los extractos de acetato de etilo y metanol respectivamente y evaluaron. Se observó que inhibieron la nocicepción en más de 50% a dosis de 1 mg/kg. El presente estudio sustenta el uso de *Salvia circinata* en la medicina tradicional para el tratamiento del dolor de tipo visceral.

ABSTRACT

Salvia circinata Cav. Is a Mexican native species used in traditional medicine in Santiago Huaucilla Oaxaca as a remedy for diseases of the gastrointestinal tract involving pain. The aim of this study was to perform chemical analysis and to evaluate the possible antinociceptive activity of the organic and aqueous extracts of *S. circinata* using a murine model of visceral pain. The extracts were obtained by macerating the aerial part at room temperature. The safety margin was determined which was superior of 2000 mg / kg. The pharmacological evaluation was performed using the model of abdominal stretch Writhing, where the number of abdominal stretches performed every 5 min for 30 min using doses of 1, 10, 30 and 100 and 300 mg / kg were recorded. Phytochemical analysis was carried out using the technique of gas chromatography-mass spectrometry for the hexane extract and high performance liquid chromatography to identify compounds of triterpene nature, flavonoids and phenolic acids as potential bioactive constituents in the extract. The results showed significant antinociceptive effect ($P < 0.05$) in a non dose-dependent manner compared to the control, in which were identified compounds with antinociceptive activities and anti-inflammatory: ursolic acid, β -amyrin, oleanolic acid, ferulic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, rutin, quercetin and florizin. Pure compounds like amarisolide and pedaltin were also isolated from the ethyl acetate and methanol respectively and evaluated, These compounds inhibited nociception in more than 50% from a dosage of 1 mg / kg. This study reinforces the use of *Salvia circinata* in traditional medicine for the treatment of visceral pain.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente la medicina tradicional es un recurso fundamental para la salud humana. Las plantas y árboles empleados son la base para el desarrollo de la medicina moderna, y en algunas zonas rurales e indígenas son el único recurso del que se dispone a falta de instituciones médicas y recursos monetarios para la adquisición de servicios médicos. En México se cuenta con un acervo de conocimientos etnobotánicos muy extenso, especialmente en referencia a las plantas medicinales, esto a pesar de los cambios y pérdida de conocimientos en las nuevas generaciones. La eficacia y la demanda de dichas plantas es lo que ha permitido que su uso se mantenga. Un ejemplo de ello es Santiago Huaucilla, Oaxaca, donde la práctica de la medicina con plantas es cotidiana. De acuerdo al conocimiento de los informantes destacan las plantas utilizadas para su uso medicinal en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, del corazón, diabetes y dolor siendo este último padecimiento el interés de este estudio.

El dolor es la causa más común por la cual las personas acuden al médico, lo que representa un problema de salud que impacta la calidad de vida de quien lo padece. La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor lo define como "una experiencia sensitiva y emocional desagradable, asociada a una lesión tisular real o potencial) (IASP Taxonomy - IASP, 2014). Se estima que de 25 a 29 % de la población mexicana sufre este padecimiento o síntoma en algunas enfermedades, estas tasas de morbilidad aunada a los efectos adversos provocados por los analgésicos han dado como resultado que la población busque métodos alternativos para el tratamiento del dolor. Es así que en México más de 90% de la población utiliza las plantas medicinales para el tratamiento de diversas enfermedades (Taddei-Bringas *et al.*, 1999). No obstante, la gran mayoría de las especies utilizadas carece de la investigación básica y clínica que confirme sus propiedades y en consecuencia su uso tradicional. De lo anterior, resulta imprescindible reconocer aquellas fuentes naturales que permitan obtener recursos terapéuticos y certificar mediante la investigación científica su eficacia y seguridad.

En varias comunidades de la República Mexicana utilizan especies del género *Salvia* para diversos fines terapéuticos, tales como aliviar dolor de estómago, cólicos menstruales, males del corazón, neumonía, asma, tos, susto, espanto, epilepsia, insomnio, diarrea,

indigestión, tensión nerviosa, estrés, entre otros (Jenks y Kim, 2013). Estudios fitoquímicos han demostrado que algunas especies del género *Salvia* sintetizan ácidos fenólicos, terpenos y flavonoides (Rodríguez-Hahn *et al.*, 1989; Jenks *et al.*, 2013; Orhan *et al.*, 2013) compuestos con reconocida actividad antinociceptiva

A pesar de la gran importancia que tiene *Salvia circinata* como planta medicinal en Santiago Huaucuililla, Oaxaca, no existe información científica sobre sus efectos en el sistema nervioso central y periférico, así como de su composición química (Nambo, 2015). Es por ello, que en esta investigación se pretende aislar, analizar y purificar los metabolitos secundarios presentes en los extractos de *S. circinata* y evaluar su efecto antinociceptivo en modelos experimentales murinos. Asimismo, se pretende conocer el margen de seguridad de los extractos en ratones y comparar la eficacia de la terapia herbolaria con la alopática.

2. ANTECEDENTES

2.1 Dolor

El término dolor, derivado del latín *-oris-*, define dos conceptos diferentes, el primero se refiere a una «sensación molesta de una parte del cuerpo», es decir se trata de un dolor físico. En segundo lugar, puede expresar también un sentimiento de pena y congoja, así como el «pesar y arrepentimiento de haber hecho u omitido una cosa”, de manera que se convierte en una aflicción o sufrimiento interno. El dolor es uno de los temas más fecundos, pues el ser humano, en algún momento de su vida ha conocido de cerca o de lejos el dolor.

La naturaleza se ha asegurado de que el dolor sea una señal que no se puede ignorar, ya que la información de los nociceptores es transmitida al sistema nervioso central (SNC) mediante tres vías principales (Nacgun Dafny, 1997).

2.1.1 Definición de dolor

La definición más aceptada actualmente es la de la Asociación Mundial para el Estudio del Dolor (IASP): «es una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada con un daño tisular, real o potencial, o descrita en términos de dicho daño (D’Mello y Dickenson, 2008).

3.7.2 Epidemiología del dolor en México

En México, las principales causas de morbimortalidad se encuentran asociadas a la presencia de dolor. Entre las principales causas de mortalidad de la población destacan: las enfermedades del corazón, la diabetes mellitus y el cáncer. Se estima que esta manifestación del dolor afecta a 15% de la población general. Debido a que el dolor es un síntoma frecuentemente observado en la población y en la actualidad es considerado un problema de salud pública, en la década de 1970s diversos médicos se dieron a la tarea de consolidar clínicas del dolor en varios estados de la Republica (Covarrubias-Gómez, *et al.*, 2010).

Se conoce que el dolor crónico afecta de 25 a 29% de la población en general, a pesar de las dificultades metodológicas que enfrentan los estudios epidemiológicos que tratan de estimar la prevalencia de los síndromes dolorosos. Los 20 principales motivos de consulta en las unidades de medicina familiar del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), durante el

período de 1991 a 2002, al menos 5% de los usuarios presentaron una enfermedad claramente dolorosa (dorsalgias 2%, otras artrosis 2% y enfermedad pélvica inflamatoria 1%). Dentro de la población geriátrica del país 42% de ese grupo manifiesta dolor crónico. La Asociación mexicana para el estudio y tratamiento del dolor (AMETD) ha estimado que al menos 21% de la población adulta presentó dolor crónico del músculo esquelético. Esta serie de datos sugiere que la frecuencia del dolor en los mexicanos es similar a la observada internacionalmente.

Esto pone en manifiesto la necesidad de generar programas educacionales para formar recursos humanos con conocimientos suficientes para atender a esta necesidad. De igual forma, estas cifras sugieren que es prioritario establecer mecanismos regulatorios eficientes que promuevan la disponibilidad de medicamentos analgésicos para las poblaciones vulnerables y es de suma importancia la validación científica del uso que estas poblaciones hacen mediante sus costumbres, de las plantas que son utilizadas para el tratamiento del dolor. Especialmente cuando se considera que, en el 2011, los tumores malignos ocuparon la tercera causa de muerte en el país además que la Ley General de Salud los contempla como materia de salubridad general el «tratamiento integral del dolor» (Secretaría de Salud, 2015), y que el dolor en el enfermo con cáncer se presentará en 75% de los casos avanzados (Covarrubias-Gómez *et al.*, 2014; Cabrera Nava, 2013).

2.2 Dolor, nocicepción, sufrimiento y conductas de dolor

Para entender la existencia de varios tipos de dolor clínico, es necesario precisar cuatro categorías que están relacionadas estrechamente: nocicepción, dolor, sufrimiento y conductas de dolor.

Nocicepción se refiere a la activación de las neuronas nociceptoras y la transmisión de potenciales de acción de las diferentes sinapsis a lo largo de las vías ascendentes. Debe tenerse presente que no siempre la nocicepción da lugar a la percepción de dolor.

Dolor es la percepción que el sujeto experimenta, con todos sus componentes sensoriales, emocionales y discriminativos. El dolor habitualmente es el resultado de una actividad nociceptiva, pero puede haber casos de dolor sin nocicepción, es decir, sin la presencia de una lesión o de un estímulo nocivo.

Sufrimiento es una reacción afectiva negativa inducida por varios estados psicológicos como dolor, miedo, ansiedad y estrés. No todo sufrimiento es causado por dolor, pero en medicina frecuentemente describimos el sufrimiento como dolor.

Las conductas de dolor surgen como consecuencia del dolor mismo y del sufrimiento y, son aquellas cosas que el paciente hace o deja de hacer cuando hay una lesión tisular, por ejemplo, gritar, llorar, solicitar incapacidad, etc. Estas conductas de dolor junto con la historia clínica y el examen físico permiten precisar la existencia de nocicepción, dolor, y sufrimiento (Moreno y Prada, 2004).

El dolor abdominal es catalogado como una de las principales causas de las consultas en los servicios de urgencias, las causas de este pueden tener orígenes muy variados, sin embargo, los pacientes presentan signos bastante parecidos, ya que las vías de señalización nociceptiva son comunes a varios órganos internos y por esto las personas refieren su dolor como un dolor sordo y difuso (Ochoa Barajas, 2012).

2.3 Clasificación del dolor.

La clasificación del dolor puede hacerse en función de diversos criterios:

Según su duración

- **Dolor agudo.** Es un fenómeno de corta duración que generalmente se asocia a un daño tisular y desaparece con la curación de este último. Suele estar claramente localizado y su intensidad se relaciona con el estímulo que lo produce. Se acompaña de reflejos protectores, como la retirada de la extremidad dañada o espasmos musculares y produce un estado de excitación y estrés que conlleva un incremento de la presión arterial.

- **Dolor crónico.** Tiene una duración desde los 3 meses, se prolonga más allá de la curación de la lesión que originó el estímulo en primer lugar. Tanto la intensidad como la causa y el patrón de evolución son muy variables. No tiene una acción protectora y está especialmente influenciado por los factores psicológicos, ambientales y afectivos (del Arco, 2015).

Según su origen

- **El dolor nociceptivo** Causado por la activación de los nociceptores en respuesta a un estímulo (lesión, inflamación, infección, enfermedad). Como ocurre con el dolor agudo, suele haber una relación directa entre su intensidad y la gravedad de la agresión.
- **El dolor neuropático** Se origina por un estímulo directo del SNC o una lesión de los nervios periféricos. No se relaciona, por tanto, con la estimulación de las terminales sensitivas y suele acompañarse de disestesias y parestesias. Es habitual que sea desproporcionado para el estímulo que lo produce (hiperalgesia) y que aparezca sin que haya una causa identificable. Se considera un dolor patológico, ya que no tiene ninguna utilidad como mecanismo de alerta o defensa. Aunque se debe a causas muy diferentes, presenta características comunes a la mayoría de los pacientes, como hormigueo, picazón, quemazón, opresión, punzadas o descargas eléctricas (Besson, 1999).

Según su localización

El dolor se divide en:

- **Dolor somático.** Cuando se estimulan los receptores de la piel, el sistema músculo esquelético o vascular. Se caracteriza por estar bien localizado y aunque con frecuencia es punzante, su tipología varía de unos pacientes a otros.
- **Dolor visceral.** Se debe a lesiones o disfunciones de los órganos internos, aunque hay vísceras que no duelen, como el hígado o el pulmón. Es profundo, continuo y mal localizado e irradia incluso a zonas alejadas del punto de origen. Suele acompañarse de síntomas vegetativos (náuseas, vómitos, sudoración) (Besson, 1999).

2.4 Dolor visceral

En los órganos viscerales, los nociceptores responden a la estimulación, los cuales pueden ser: presión, daño tisular, así como la estimulación por sustancias químicas.

La mayoría de los estímulos nociceptivos llevados por las vías aferentes viscerales no provocan una sensación consciente, el dolor visceral es difuso, generalmente sin una intensidad identificable y normalmente acompañado de los siguientes signos: descenso en el ritmo cardíaco, baja de la presión sanguínea, sudoración fría y náuseas. Este tipo de dolor también presenta irregularidades en el sistema respiratorio y circulatorio. Varios de estos signos alcanzan al SNC de manera bilateral.

En los órganos viscerales, terminaciones nerviosas libres se dispersan, y cualquier estímulo que excita estas terminaciones nerviosas causa dolor visceral (**Figura 1**). Tales estímulos incluyen espasmo del músculo liso en una víscera hueca, o distensión o estiramiento del ligamento, tal como una piedra bloqueando el uréter o los conductos biliares. El estiramiento de los tejidos como la obstrucción intestinal también puede provocar dolor visceral. El dolor visceral es causado también por medios químicos como resultado de lesiones gastrointestinales y tumores, así como la trombosis de una arteria. En muchos casos, el dolor visceral no se localiza en el sitio de su causa, más bien en un sitio distante (Nachun, 1997).

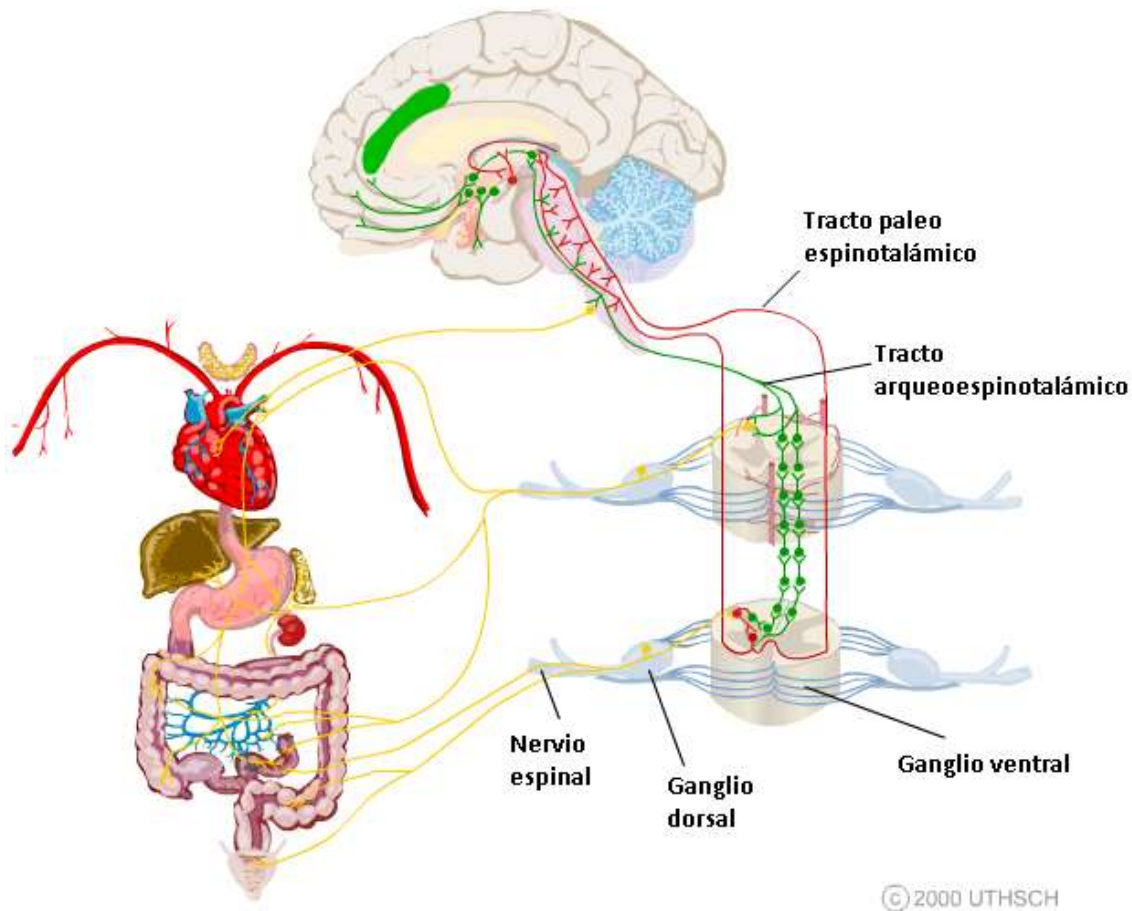


Figura 1. Vías neurales que transmiten la información dolorosa desde los órganos viscerales

2.5 Aspectos terapéuticos del dolor

La analgesia, definida como ausencia de dolor en respuesta a una estimulación, la cual normalmente habría sido dolorosa, se puede producir desde el punto de vista farmacológico en tres niveles distintos:

1. A nivel de la conducción del estímulo doloroso: Anestésicos locales: fármacos que interrumpen la transmisión del impulso nervioso en forma reversible. Ej.: lidocaína y procaína (Jacquier, 1997).
2. A nivel central: mediante analgésicos que actúan a nivel del neuro-eje, como son los opioides. Actualmente estos fármacos son los más efectivos para la inhibición del dolor, pero su gran defecto son las reacciones adversas, como la tolerancia.

3. A nivel periférico: representados por los analgésicos anti-inflamatorios no esteroidales (AINEs), que corresponden a fármacos que pueden ejercer un efecto ya sea antiinflamatorio, analgésico y /o antipirético (Burke *et al.*, 2011). Varios fármacos inducen analgesia o antinocicepción por interferencia con las vías neuronales involucradas en la recepción y la transmisión desde la periferia hasta los más altos centros en el SNC. Varios receptores, incluyendo α -adrenoreceptores, subtipos de receptores de serotonina: 5-HT-1, 5-HT2 y 5-HT3, receptores muscarínicos, receptores nicotínicos, son expresados pre y postsinápticamente en neuronas en los niveles espinal y supra espinal, y pueden modular la información nociceptiva. Existe una gran variedad de agentes capaces de producir un poderoso y selectivo efecto en la inhibición de la neurotransmisión dolorosa. Así, se pueden mencionar los fármacos α -adrenérgicos, serotoninérgicos, colinérgicos, nitridérgicos, antidepresivos, antiepilépticos, anestésicos locales, cannabinoides, anti-inflamatorios no esteroidales, opioides (Cashman, 1996; Caterina y Julius, 1999).

2.5.1 Antiinflamatorios no esteroidales

Los analgésicos antiinflamatorios no esteroidales (AINEs) son los más usados en los diferentes tipos de dolor, tanto agudo como crónico, y por lo tanto también los más estudiados. Sin embargo, independientemente de su eficacia, presentan una serie de reacciones adversas que limitan su uso. Los AINEs han sido conocidos por muchos años por actuar periféricamente reduciendo la producción de prostaglandinas, potentes mediadores hiperalgésicos, los cuales modulan múltiples sitios a lo largo de la vía nociceptiva e intensifican tanto el proceso de transducción: efecto de sensibilización periférica, como el de transmisión: efecto de sensibilización central (Burian y Geisslinger, 2005).

Los AINEs actúan inhibiendo las ciclooxygenasa (COXs), enzimas que convierten el ácido araquidónico liberado desde los fosfolípidos de membrana por fosfolipasas, a prostanoides tales como las prostaglandinas (PGS). Dos formas de COX están bien caracterizadas: COX-1, considerada una enzima constitutiva involucrada en la protección de la mucosa gástrica, en la manutención del flujo sanguíneo renal y en promover la agregación plaquetaria. La enzima COX-2, con 60% de homología con la COX-1, pero que es codificada por un gen

diferente, y que es inducida por estímulos inflamatorios y citoquinas liberadas por células migratorias y otras, y por el estrés en las células vasculares endoteliales (Patrekar *et al.*, 2014). Ambas COX-1 y COX-2 contribuyen a la producción espinal y supra espinal de prostanoïdes que siguen al daño de los tejidos (KuKanich *et al.*, 2012). Clínicamente la significativa actividad anti-inflamatoria de los AINEs es enriquecida con un 80% o más de inhibición de la COX-2; los diferentes perfiles de efectos adversos de los AINEs son determinados por la magnitud en la que ellos inhiben la COX-1, en relación a la dosis. Sin embargo, la tasa de riesgo-beneficio de los AINEs no está determinada solamente por sus efectos en el tracto gastrointestinal, puesto que la inhibición de la COX-2 está también asociada con una reducción en la síntesis de prostaglandinas importantes en la preservación de la función renal. Existe evidencia que los AINEs tienen un mecanismo de acción central agregado a los mecanismos periféricos. Este efecto puede ser el resultado de la interferencia en la formación de prostaglandinas en el SNC. Alternativamente, la acción central puede estar mediada por péptidos opioides endógenos o bloqueo de la liberación de 5-HT. Además, un mecanismo que involucra la inhibición de la activación del receptor NMDA o aminoácido excitatorio, ha sido también propuesto. Recientemente, se ha identificado una variante de isoforma COX, llamada COX-3, está compuesta por el RNAm de COX-1 que retiene el intron-1. La proteína posee reducida actividad en la síntesis de prostaglandinas relativa a COX-1, pero fármacos analgésicos/antipiréticos, tales como paracetamol y metamizol preferencialmente inhiben su actividad (Willoughby *et al.*, 2000).

2.5.2 Ketorolaco

La marcada eficacia analgésica del Ketorolaco en humanos, comparada con otros AINEs, ha llevado a la especulación de que mecanismos de tipo no AINE contribuyen a su actividad analgésica ya que este ha mostrado ser más eficaz al ser comparado *in vivo* e *in vitro* con inhibidores no selectivos de la COX como indometacina y diclofenaco sódico, así como inhibidores selectivos como el celecoxib en la prueba de estiramiento abdominal inducida con ácido acético en ratones; se ha demostrado que parte de su efecto está ligado a la activación de la vía del GMP cíclico dependiente del óxido nítrico (ON), seguida de la apertura de canales de potasio K⁺, lo cual hiperpolariza a los nociceptores impidiendo que

la señal dolorosa llegue a los ganglios dorsales, disminuyendo así la interpretación de dolor en la corteza somato sensorial (Jett *et al.*, 1999; Lázaro-Ibáñez *et al.*, 2001).

2.5.3 Efectos adversos de los AINES

Los AINES están asociados con diversos efectos adversos, entre estos se incluyen la modificación de la función renal, efectos sobre la presión sanguínea, daño hepático y la inhibición de la agregación plaquetaria. Sin embargo entre los efectos más importantes de los AINES selectivos y no selectivos están los efectos gastrointestinales y los cardiovasculares (Ong *et al.*, 2007). La **Cuadro 1** muestra los principales efectos adversos relacionados con el uso de este tipo de fármacos.

Cuadro 1. Efectos adversos de los AINES modificado de Goodman y Gilman, 2011

APARATO O SISTEMA	MANIFESTACIONES
Sistema gastrointestinal	Dolor abdominal Náusea Anorexia Erosiones o úlceras gástricas Anemia Hemorragia en las vías GI Perforación Diarrea
Riñones	Retención de sodio y agua Edema, complicaciones de la función renal en sujetos con nefropatía o cardiopatía y cirrosis Disminución de la eficacia de los antihipertensores Disminución de la eficacia de los diuréticos Disminución de la excreción de ácido úrico (en particular con la aspirina) Hipertensiemia
Sistema nervioso central	Cefalalgia Vértigo Mareos Confusión Depresión Disminución del nivel umbral de convulsiones Hiperventilación (salicilatos)
Plaquetas	Inhibición de la activación de plaquetas

	Propensión a la aparición de hematomas Mayor riesgo de hemorragia
Útero	Inhibición del parto Prolongación de la gestación
Hipersensibilidad	Rinitis vasomotora Edema angioneurótico Asma Urticaria Hiperemia Hipotensión Choque
Vasos sanguíneos	Cierre del conducto arterioso

2.5.4 Importancia del estudio de las plantas medicinales como alternativa terapéutica contra el dolor

El uso de plantas medicinales es una de las prácticas humanas más antiguas y comunes en la población. Durante el siglo XX esta práctica ganó popularidad en la sociedad ya que distintos esfuerzos por recuperar la sabiduría indígena fueron puestos en marcha mediante estudios etnobotánicos (Bernardes de Andrade Carli *et al.*, 2013). Se ha demostrado que muchas de las fitoterapias usadas en la medicina tradicional son tanto o más eficaces y seguras que la medicina basada en fármacos alopáticos.

2.6 Etnobotánica y etnofarmacología en México

La etnobotánica es un campo de estudio de carácter científico que involucra las relaciones entre personas y plantas, la cual es realizada con un enfoque multidisciplinario donde intervienen ciencias como la antropología, arqueología, botánica, economía, medicina, e incluso la religión entre otras (Popović *et al.*, 2016).

La historia del uso de las plantas medicinales por los indígenas mexicanos está ampliamente documentada, un ejemplo es el *Libellus de medicinalibus indorum herbis*, el cual es una recopilación del conocimiento de remedios de origen natural de la cultura azteca donde se enlistan 227 plantas, sus propiedades medicinales y su forma de uso. La investigación de productos naturales y etnofarmacología juegan un papel clave en el desarrollo de una base

de evidencia adecuada para este tipo de productos derivados de los conocimientos locales y tradicionales en México (Heinrich *et al.*, 2014).

Durante muchas décadas, la investigación de productos naturales ha sido un campo de investigación muy activa en México, y también existen trabajos de investigación etnofarmacológicas en curso. Las plantas se han evaluado por sus efectos sobre el sistema nervioso central, diabetes, síndrome metabólico, procesos inflamatorios y trastornos gastrointestinales. Actualmente especies de *Opuntia* se utilizan cada vez más para controlar la diabetes y el síndrome metabólico y representan un ejemplo de fitomedicamentos.

2.7 Género *Salvia*

El nombre *Salvia* proviene del latín “*salvare*”, que significa curar. El género *Salvia* es el género más diverso de la familia Lamiaceae, con cerca de 1000 especies, distribuidas alrededor del mundo. En América existen cerca de 500 especies (Epling, 1940; Topçu, 2006). México es una de las áreas con mayor diversidad del género en el mundo, con más de 300 especies (Cornejo-Tenorio e Ibarra-Manríquez, 2011). Este género se divide en cuatro subgéneros: *Calosphace*, *Leonia*, *Salvia* y *Sclarea*, siendo el primero el más diverso en México, donde se distribuye, principalmente, en las zonas montañosas (Cornejo-Tenorio e Ibarra-Manríquez, 2011).

Las formas de crecimiento en *Salvia* incluyen hierbas anuales y perennes, arbustos y raramente arbustos trepadores; las flores son pediceladas; el cáliz es zigomorfo, bilabiado; la tonalidad de las flores puede ser blanca, amarilla, púrpura, roja, violeta o azul (Martínez-Gordillo *et al.*, 2013).

2.7.1 Distribución del género *Salvia* en México.

Fernald (1900) fue el primero en hacer un compendio de las salvias de México y Centroamérica. La obra clásica que ofrece una revisión completa del subgénero *Calosphace* es la de Epling (1940), en la cual se citan 229 especies para México, agrupadas en 52 secciones.

Para el año 2014 el número de salvias endémicas del país era de 232 (Martínez-Gordillo *et al.*, 2013). Los estados con mayor riqueza de salvias son Oaxaca (63 especies), Guerrero (51), Puebla (50), Jalisco(49) y Michoacán (48) (Ramamoorthy y Elliott, 1998). Adicionalmente se han descrito otras especies en Zacatecas y Durango (González-Gallegos y Aguilar-Santelises, 2014).

2.8 Usos etnobotánicos y farmacológicos del género *Salvia* en México

En el pasado y en la actualidad varias plantas del género *Salvia* han sido utilizadas en México, por sus virtudes alimenticias, tal es el caso de *Salvia hispanica* L. (Chía) así como especias aromáticas, por ejemplo *Salvia officinalis* L. (Islas-Gómez y Navarro-Ocaña, 2013), también diversas especies de este género han sido utilizadas en la medicina tradicional mexicana para curar distintas enfermedades, tanto del cuerpo como del alma. En la **Cuadro 2** se muestran los usos y las propiedades biológicas de distintas especies de *Salvia* distribuidas en México.

Cuadro 2. Uso de salvias en México

Especie	Nombre común y parte usada	Usos etnobotánicos y medicinales	Fitoquímica y/o farmacología	Referencia
<i>Salvia microphylla</i> Kunth.	Mirto hojas	Susto, espanto, Maldeaire, nervios, mal de ojo. Dolor de estómago, diarrea, cólicos, indigestión, disentería, inflamación estomacal, vómito. Insomnio, calambres premenstruales, dismenorreas,	Aislamiento de dos neo-clerodanos Diterpeno microphyliandolide	Bautista Redonda y Ortega Hernández, 2012 (Bautista <i>et al.</i> , 2013)

		infertilidad, reumatismo, y problemas de la piel.		
<i>Salvia coccinea</i> Juss. ex Murr.	Mirto, Cimarrón hojas	Aire, espanto, mal de viento. inapetencia, dolor de estómago, disentería, diarrea. Sedativo, relajante muscular, dolor de cabeza. Regular la menstruación sangrado vaginal abundante, arrebol, sangrado de nariz, para lavar los ojos.	7,8-β- dihidrosalvia-coccina	Jenks <i>et al.</i> , 2013 Jassbi <i>et al.</i> , 2015
<i>Salvia elegans</i> Vahl.	Mirto Hojas y tallos	Espanto, aire Dolor de estómago, insomnio, llanto. Dolor postnatal, heridas, edemas. Baño para recién nacidos.	Isosakuranetina-5-O-rutinoside, antidepresivo.	González-Cortazar <i>et al.</i> , 2013 Jenks y Kim, 2013
<i>Salvia fulgens</i> Cav.	Mirto	Dolor de estómago, insomnio e inquietud. Baño para recién nacidos.	Dehidrokerlina 10β- hidroxibacchotricuneatina salvifulgenólida	Bautista Redonda y Ortega Hernández, 2012 Martínez-Gordillo <i>et al.</i> , 2013
<i>Salvia involucrata</i> Cav.		aire		Jenks y Kim, 2013 Martínez-Gordillo <i>et al.</i> , 2013
<i>Salvia inconspicua</i> Benth.		Mal de ojo		Cornejo-Tenorio e Ibarra-Manríquez, 2011
<i>Salvia circinata</i> Cav.	Bretonica Hojas y tallos	Dolor estomacal, diarrea, infecciones		Nambo, 2015
<i>Salvia apiana</i> Jeps.	Salvia blanca hojas	Diurética	Hassananos Terpenos con esqueleto ursano y oleano	Martínez-Gordillo <i>et al.</i> , 2013 Luis <i>et al.</i> , 1996

<i>Salvia aspera</i> M. Martens & Galeotti.		Antidiarreico	Salviasperanol y 5,6-dihidro-6~thydroxysalviasperanol	Esquivel <i>et al.</i> , 1995
<i>Salvia ballotiflora</i> Benth.			19-desoxicetexona	Pérez-Gutiérrez <i>et al.</i> , 2013
<i>Salvia polystachya</i> Ort.	Chía Hojas y tallos	Purgante, antigastrálgico, antipirético, y tratamiento contra disentería Antiprotozoaria	Polystaquina A Linearolactona Polystaquina B Polystaquina D	Calzada <i>et al.</i> , 2015 Gheno-Heredia <i>et al.</i> , 2011
<i>Salvia purpurea</i> Sessé & Moc.		Problemas gastrointestinales y dermatológicos		Domínguez-Vázquez y Castro-Ramírez, 2002
<i>Salvia reptans</i> Jacq.	Hojas y tallos	Antibiótico	8 α 9a-epoxi-7-cetoroileanona Horminona	Martínez-Vázquez <i>et al.</i> , 1998
<i>Salvia serótina</i> L.	Hojas	Antitumoral	Extracto de metanol Extracto de etanol	Fiore <i>et al.</i> , 2006 Zihlif <i>et al.</i> , 2013
<i>Salvia texana</i> (Scheele) Torr.	Planta completa	Antibacterial	Extracto de metanol	Gonzalez <i>et al.</i> , 1989
<i>Salvia thymoides</i> Benth.	Hojas	Antiinflamatorio	Extracto de acetona Eupatorina Dihirdo quercetina	Bustos Brito y Esquivel Rodríguez, 2011
<i>Salvia tilifolia</i> Vahl.	Planta completa	Antioxidante e inhibidor de la acetilcolinesterasa	Extracto de diclorometano/etanol	Adewusi <i>et al.</i> , 2011

2.9 Compuestos con actividad antinociceptiva en el género *Salvia*

Dentro del género *Salvia* se han llevado a cabo estudios donde se ha evaluado el efecto antinociceptivo mediante diferentes pruebas (Le Bars *et al.*, 2001). Estos modelos de evaluación de la nocicepción han demostrado que este género tiene compuestos de interés farmacológico para aliviar el dolor. Se encontró que el extracto de metanol de *Salvia aegyptica* actúa como un agente antinociceptivo ya que reduce significativamente las contracciones abdominales del grupo experimental de ratones en el que fue probado (Al-Yousuf *et al.*, 2002); la salvinatorina A de *Salvia divinorum* Epling, ha sido propuesta como un agonista no alcaloide de los receptores opioides κ , su efecto sobre el dolor de tipo visceral fue comprobado mediante la prueba de estiramiento abdominal, y su mecanismo de acción

de tipo opioide fue revelado al usar norbinaltorfimina, un antagonista de los receptores opioides κ (McCurdy *et al.*, 2006).

2.10 Composición química

Un gran número de metabolitos secundarios han sido aislados de las especies de *Salvia*. Estos incluyen ácidos fenólicos (tales como el ácido caféico, rosmarínico, ferúlico, gálico y clorogénico), taninos, aceites esenciales, flavonoides y terpenoides (diterpenos, triterpenos). También han sido estudiados los compuestos antioxidantes en las salvias, tales como ácido rosmarínico y ácido carnósico. La riqueza y diversidad fitoquímica aunada a la abundancia de especies de este género alrededor mundo, ha alentado a la búsqueda de compuestos con propiedades biológicas interesantes en plantas de este género (Martínez *et al.*, 2012; Song y Li, 2015).

Las partes aéreas de las salvias sintetizan aceites esenciales, mono, di y triterpenos. Mientras que los diterpenoides son el principal compuesto en las raíces, en las especies de *Salvia* americanas contienen diterpenoides en las partes aéreas (Kintzios, 2000).

2.10.1 Terpenos

Dentro de los metabolitos secundarios de especies del género *Salvia* se encuentran principalmente terpenos y terpenoides. Los terpenos son hidrocarburos de origen natural producidos por una amplia variedad de plantas, estos se clasifican en base a sus unidades de isopreno (de 5 carbonos): Más de 55,000 moléculas se conocen hasta la fecha. Diferentes terpenos incluyen, monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterterpenos (C25), triterpenos (C30) y politerpenos (> C30).

La actividad biológica de éstos les ha dado un papel importante en las industrias farmacéuticas y agrícolas. En este género los diterpenoides son ubicuos y usualmente característicos de una o algunas especies estrechamente relacionadas (Jenks y Kim, 2013). El frecuente uso de especies de este género en la medicina tradicional de México ha motivado

esta y otras investigaciones con el fin de conocer los metabolitos responsables de los efectos que se han reportado.

El término "saponina" define un grupo de compuestos naturales que consiste en una aglicona derivada del isopreno, denominada sapogenina. Su nombre se deriva de la palabra latina *sapo* (jabón) lo que refleja su amplia capacidad para formar espumas estables en solución acuosa (**Figura 2**).

El papel biológico de las saponinas no se entiende completamente. En plantas, por lo general se consideran como parte de los sistemas de defensa debido a actividad antimicrobiana, fungicidas, alelopático, insecticida, molusquicida, etc. En la terapéutica humana y animal se le ha dado usos como antimicrobianos, anti fúngicos, antivirales, hipoglucemiantes, anti-inflamatorios, antioxidantes, antiparasitario, e inmunomoduladores (Brahmkshatriya y Brahmkshatriya, 2013).

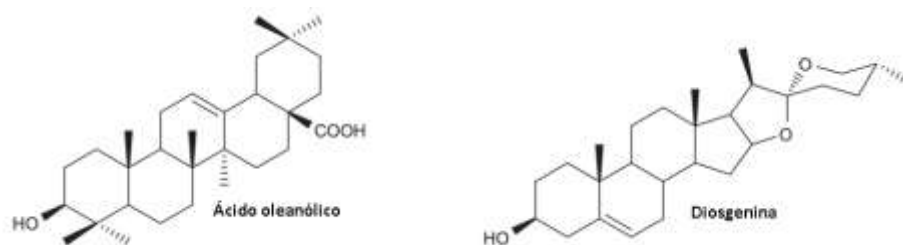
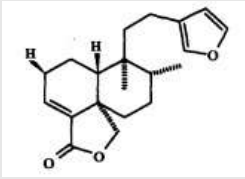
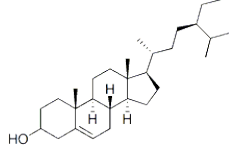
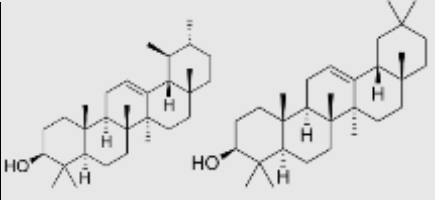
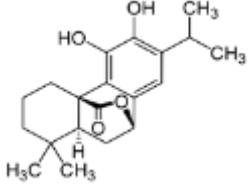
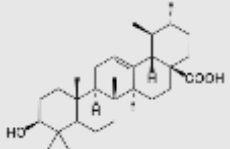
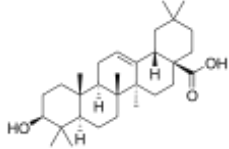


Figura 2. Dos representantes de esqueletos de saponina ácido oleanólico (triterpeno) y diosmina (esteroidal)

La nomenclatura utilizada comúnmente distingue entre triterpenos y saponinas esteroides, esta diferenciación está basada en la estructura y las rutas biosintéticas de estas. Se presume que ambas saponinas son derivadas del 2,3-oxidoescualeno, un metabolito central en la síntesis de esteroides. En el anabolismo del fitosterol el 2,3-oxidoescualeno es principalmente ciclado en cicloartenol, la rama de las saponinas triterpenoides se separa de esta vía mediante una ciclación alternativa del 2,3-oxidoescualeno (Augustin *et al.*, 2011)

En la **Cuadro 3** se enlistan terpenoides de tipo diterpeno y triterpeno dentro del género *Salvia* que han sido reportados por poseer efecto antinociceptivo y antiinflamatorio, así como su fórmula química y el mecanismo de acción mediante el cual causan tal efecto.

Cuadro 3. Terpenos con actividad antinociceptiva y antiinflamatoria

Compuesto	Estructura	Mecanismo de acción	Referencias
Amarisolide		Sin información	
β -sitosterol		Inhibición del proceso migratorio de los macrófagos. Reducción en la producción de ROS.	Bustos Brito, 2011 Ambavade <i>et al.</i> , 2014
α , β -amirina		Inhibición de la migración de neutrófilos. Inhibición de protein cinasa A- y protein cinasa C.	Lins <i>et al.</i> , 2014 Otuki <i>et al.</i> , 2005
Carnosol		Antioxidante Supresión de la transcripción de COX2. Inhibidor de la prostaglandina E2 sintetasa.	Rodrigues <i>et al.</i> , 2012 Subbaramaiah <i>et al.</i> , 2002 Bauer <i>et al.</i> , 2012
Ácido ursólico		Modulador de calcio vía trpa-1. Antioxidante. Agonista del receptor 5-HT _{1A} .	Rodríguez <i>et al.</i> , 2012 Verano <i>et al.</i> , 2013 Martínez <i>et al.</i> , 2012
Ácido oleanólico		Sistema opioide. Agonista del receptor 5-HT _{1A} .	Park <i>et al.</i> , 2013 Brandão <i>et al.</i> , 2013

2.11 COMPUESTOS FENÓLICOS.

2.11.1 Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos se pueden dividir en dos grupos principales, ácidos hidroxibenzoico y ácidos hidroxicinámicos, que se derivan de moléculas no fenólicas de ácido benzoico y ácido cinámico, respectivamente. Químicamente, estos compuestos tienen al menos un anillo aromático en que al menos un hidrógeno está sustituido por un grupo hidroxilo (Heleno *et al.*, 2015) (**Figura 3**).

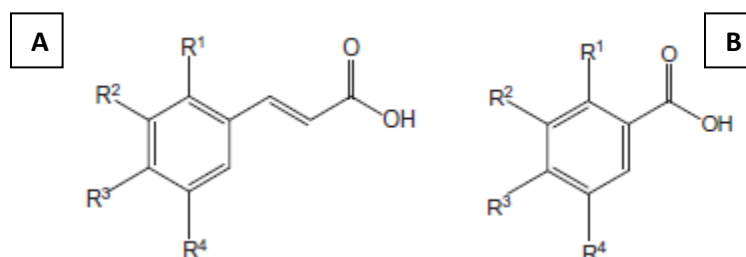
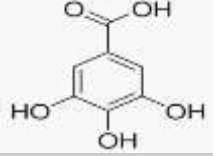
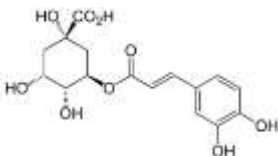
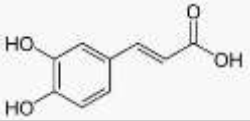
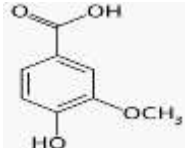
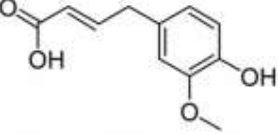


Figura 3. Estructuras químicas de los ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico (A) y el ácido benzoico (B)

La importancia del uso de los ácidos fenólicos derivados de las plantas en la medicina tradicional ha sido descrita extensamente. En la literatura es posible encontrar estudios del ácido vainillínico (4-hidroxi-3-ácido metoxibenzoico), un ácido fenólico presente en varias plantas y frutas; se han caracterizado sus propiedades farmacológicas, tales como los beneficios que brinda en los procesos inflamatorios agudos (Leal *et al.*, 2011).

En la **Cuadro 4** Se muestran ácidos fenólicos presentes en el género *Salvia* los cuales han mostrado actividad farmacológica antiinflamatoria y antinociceptiva (Orhan *et al.*, 2012).

Cuadro 4. Ácidos fenólicos con actividad antinociceptiva y antiinflamatoria

Compuesto	Estructura	Efecto farmacológico	Referencias
Ácido gálico		Reducción de COX-2 e iNOS. Inhibición de la apertura del poro mitocondrial para la salida del citocromo c.	Pandurangan <i>et al.</i> , 2015 Sun <i>et al.</i> , 2014
Ácido clorogénico		Inhibición del FNTa y especies reactivas de oxígeno. Estimulación del sistema opioide	Shin <i>et al.</i> , 2015 Yasar <i>et al.</i> , 2013
Ácido cafeico		Inhibición de la calmodulina	(Martínez-Luis <i>et al.</i> , 2007)
Ácido vainillínico		Supresión de mediadores de la inflamación como : TNF- α , IL-6 y IL-1 β	Kim <i>et al.</i> , 2011
Ácido ferúlico		Inhibición de factores pro inflamatorios y decremento del estrés oxidativo.	Cao <i>et al.</i> , 2015

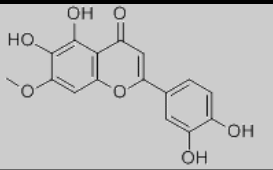
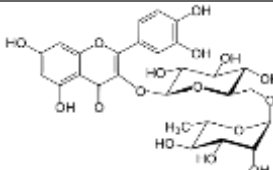
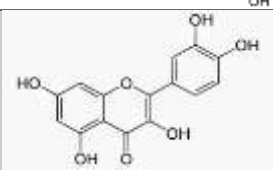
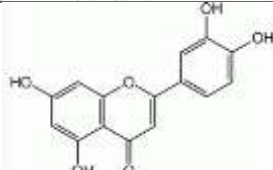
2.11.2 Flavonoides

Los flavonoides (del latín *flavus*, "amarillo"). Son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y 3 de malonil-CoA, la estructura base se cicla gracias a una enzima isomerasa. La estructura base es un esqueleto de C6-C3-C6 . Los flavonoides que conservan su esqueleto pueden clasificarse, según las isomerizaciones y los grupos

funcionales que les son adicionados, en seis clases principales: las chalconas, las flavonas, los flavonoles, los flavandioles, las antocianinas, y los taninos condensados.

Se ha establecido que los compuestos de tipo flavonoide tienen varias e importantes acciones farmacológicas, entre ellas se pueden destacar: efectos cardioprotector por su actividad antioxidante, ya que la quercetina incrementa la producción y la actividad de enzimas antioxidantes tales como la glutatión peroxidasa (GSH-Px), glutatión reductasa (GR), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) (Liu *et al.*, 2014). El consumo de catequina aumenta dramáticamente las funciones del endotelio y estimula la producción de la sintasa endotelial de óxido nítrico (eCON) la cual contribuye en la vasodilatación (Gómez-Guzmán *et al.*, 2011). Se han propuesto los efectos neuroprotectores y antiinflamatorios de la luteolina, debido a sus propiedades antioxidantes (Nabavi *et al.*, 2015). La **Cuadro 5** enlista algunos flavonoides con actividad antinociceptiva y antiinflamatoria.

Cuadro 5. Flavonoides con actividad antinociceptiva y antiinflamatoria

Compuesto	Estructura	Efecto farmacológico	Referencias
Pedalitina		Sin información	
Rutina		Antiinflamatorio, inmunomodulador	Mascaraque <i>et al.</i> , 2015
Quercetina		Inhibidor de la prostaglandina f2α Bloquea la entrada de Ca ⁺⁺	Wu <i>et al.</i> , 2015
Luteolina		Reducción significativa de TNF-α, IL-6, IL-1β e IL-17	Jeon <i>et al.</i> , 2014

2.12 *Salvia circinata* Cav.

Salvia circinata es una hierba ampliamente distribuida en México, conocida con los nombres comunes de Bretonica en Oaxaca, hierba del cáncer en Querétaro y como mirto en el estado de Puebla. Se reconocen como sinónimos: *Salvia amarissima* Ortega, *Salvia amara* Jacq, *Salvia circinata* Cav. y *Salvia nepetoides* Kunth (Instituto de Biología, 2010; Tropicos, 2016)

2.12.1 Descripción botánica de *Salvia circinata*

Hierba perenne, de 0.3-1.5 m de altura, tallos cuadrados, frecuentemente tornándose purpura. Hojas 3-10 x 1.2-4.5 cm, ovadas a triangulares, membranáceas, rugosas, con tricomas blancos sobre ambas superficies, el haz verde oscuro, el envés verde pálido, la base cordata, los márgenes crenado-serrados, el ápice acuminado; peciolo 0.5-3 cm. Inflorescencias terminales de hasta 10 cm; verticilastros laxos con 3-6 flores, separados por 20 mm; brácteas 6-11 x 2-3 mm, lanceoladas u ovadas, caducas antes de la anthesis, el ápice caudado. Flores 13-18 mm. Cáliz florífero 5.5-6.5 x 2.5-3 mm, 12-nervio (las 5 nervaduras prolongándose al labio superior no prominentes), campanulado, verde oscuro tornándose azul apicalmente, peloso como los ejes de las inflorescencias; labio inferior 1.5-2.5 mm, 2-partido por 1.5-2.5 mm, los ápices caudados; labio superior 1.5-2.5 mm, triangular; cáliz fructífero no acrescente. Corola 12-17 mm, azul brillante o lila, o el tubo blanco y los lobos lila o azules; tubo 5-7 mm, invaginado y con 2 papilas a c. 3 mm desde la base; labio inferior 3-lobado, 7-10 x 7-10 mm, reflexo, el lobo central redondeado, más grande que los laterales; labio superior 4-5 mm, cuculado, peloso con tricomas rayados blanco/azul. Floración (jul.) sep.-nov. (abr.). Habita en bosques de pinus-quercus y en laderas abiertas (Cavanilles, 1797) (**Figura 4**).



Figura 4. Ejemplar fresco de *Salvia circinata*

2.12.4 Química y farmacología de *Salvia circinata*

Maldonado y colaboradores (1996) identificaron la presencia del ácido ursólico, ácido oleanólico y pedalitina, en este trabajo se identificó un metabolito exclusivo de esta especie, siendo éste el diterpeno amarisolide.

Se han realizado evaluaciones de su actividad biológica como moduladora de la actividad del diterpeno teotihuacanina en células cancerosas resistentes a múltiples fármacos (Bautista *et al.*, 2015).

3. HIPOTESIS

Si los extractos de *Salvia circinata*, tienen compuestos con actividad antinociceptiva, entonces disminuirá las conductas de nocicepción en el modelo de estiramiento abdominal en ratones.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

Aislar y caracterizar los metabolitos secundarios de los extractos de *Salvia circinata* y evaluar el efecto antinociceptivo en ratones

4.2 Objetivos particulares

- ▶ 1. Aislar los compuestos presentes en los extractos de *Salvia circinata*.
- ▶ 2. Determinar la estructura de dichos metabolitos secundarios, mediante métodos cromatográficos, espectroscópicos y espectrométricos convencionales.
- ▶ 3. Determinar el margen de seguridad producido por la administración vía oral e intraperitoneal de los extractos activos
- ▶ 4. Evaluar el efecto antinociceptivo de los extractos y compuestos puros mediante el modelo de estiramiento abdominal.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material vegetal

Salvia circinata fue recolectada en la localidad de Santiago Huaucilla Oaxaca en julio de 2014. Esta localidad se localiza en los paralelos 17°25' y 17°34' de latitud norte y los meridianos 96°56' y 97°08' longitud oeste y a una altitud entre 1200 y 2700 m (INEGI, 2010).

La Dra. Martha J. Martínez Gordillo corroboró la identificación de *S. circinata*. El ejemplar de herbario fue depositado en el Herbario del Instituto de Biología (MEXU).

FITOQUÍMICA

5.2 Diseño experimental en fitoquímica

La **Figura 5** muestra un diagrama general del diseño experimental seguido en la parte fitoquímica para la obtención de extractos y la separación e identificación de los compuestos puros.

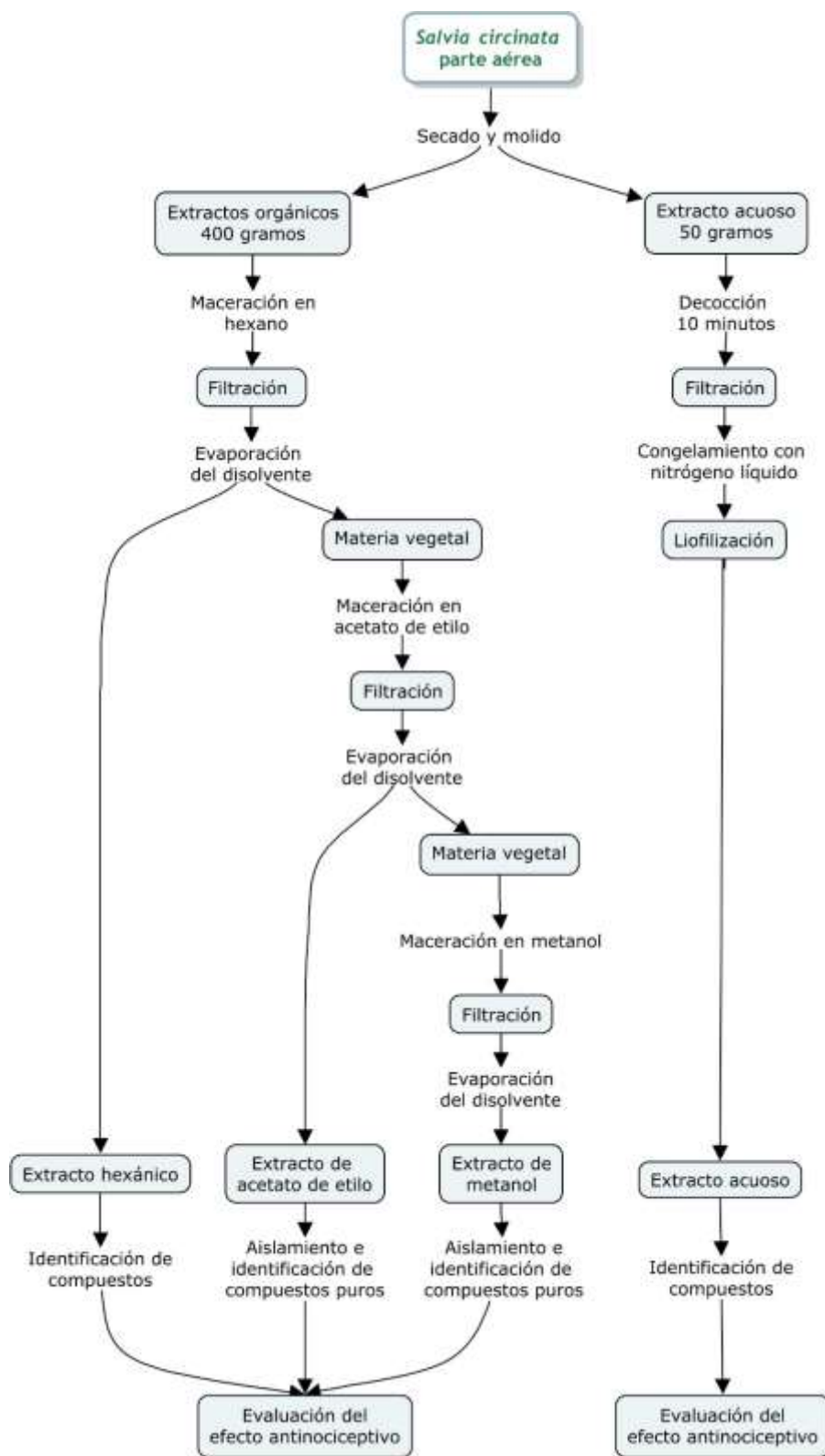


Figura 5. Diagrama general del diseño experimental para la parte fitoquímica

5.3 Obtención de los extractos

Para la obtención de los extractos orgánicos de *S. circinata* se utilizaron 400 g de la parte aérea, los cuales se secaron a temperatura ambiente y molieron finamente. Dicho material se sometió a tres extracciones sucesivas mediante maceración durante 24 horas cada una, utilizando tres disolventes orgánicos de polaridad creciente (hexano, acetato de etilo y metanol). El exceso de disolvente se eliminó en un rota evaporador Büchi bath B-490 y finalmente, una vez obtenido el extracto, se pesó para calcular su rendimiento.

Para la obtención del extracto acuoso, 50 g del material vegetal seco fueron utilizados para preparar una decocción con la siguiente proporción: por cada 10 g de material vegetal se le adicionaron 90 ml de agua destilada, los cuales se pusieron en ebullición durante 5 minutos. El extracto acuoso se separó de sus residuos mediante filtración por gravedad y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido para proceder a eliminar el agua en un liofilizador Heto FD3.

5.4 Identificación preliminar de los compuestos presentes en los extractos

Los terpenos presentes en los extractos de *S. circinata* se identificaron por medio de cromatografía en capa fina (CCF). Para ello se utilizaron placas de sílica gel (Merck) de 3.5 x 5 cm y 0.1 mm de espesor. Las muestras de cada uno de los extractos se aplicaron en las placas de cromatografía y éstas se eluyeron en una cámara de vidrio con 5 ml de una mezcla de hexano-acetato de etilo (8:2) para detectar α -amirina y β -amirina y la misma mezcla en proporción (6:4) para identificar los ácidos ursólico y oleanólico. Posteriormente, las placas se observaron en una cámara de luz UV (onda corta 254 y onda larga 365 nm) y finalmente fueron reveladas con el Reactivo de Anisaldehído para identificar terpenoides (Poole y Poole, 1994, Kinghorn, 1997).

El revelador fue preparado mediante una solución con los siguientes reactivos: anisaldehído, ácido sulfúrico y ácido acético glacial, se mezclaron en una proporción 10:0.2:0.1 ml, se asperjó sobre la placa y se calienta durante 5-10 minutos.

5.5 Análisis mediante cromatografía de líquidos de alta resolución

La determinación y cuantificación de terpenos, ácidos fenólicos y flavonoides de *S. circinata* se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con un cromatógrafo marca Agilent serie 1100 equipado con un detector de arreglo de diodos.

Para los análisis se pesaron 4 mg de muestra, los cuales fueron disueltos en 1 ml de metanol grado CLAR, se eliminaron impurezas mediante acrodiscos con membrana de nylon con una apertura de poro de 0.45 μ m, posteriormente se inyectaron 15 μ l de la solución de cada extracto en el equipo

5.5.1 Análisis de terpenos.

Para la identificación y cuantificación de terpenos se utilizó una columna Zorbax Eclipse XDB-C8(125 x 4.0 mm de diámetro interno y 5 μ m de tamaño de partícula) con una fase móvil de acetonitrilo-agua (80:20), el flujo fue de 1 ml/min y una temperatura de 40 °C. El equipo se calibró a una longitud de onda de 215 y 220 nm, el tiempo de análisis fue de 21 minutos. Los terpenos de los extractos de *S. circinata* fueron identificados y cuantificados al compararlos con estándares de carnosol, ácido ursólico, ácido oleanólico, α -amirina, β -amirina, β -sitosterol y estigmasterol de los laboratorios Sigma-Aldrich. Adicionalmente se realizó la curva de concentración del diterpeno amarisolide para su identificación y cuantificación en los extractos.

5.5.2 Análisis de ácidos fenólicos

Las muestras de los extractos fueron preparadas siguiendo la metodología anteriormente mencionada.

La identificación y cuantificación de ácidos fenólicos fue realizada con una Columna Nucleosil 100 A (125 x 4.0 mm de diámetro interno y 5 μ m de tamaño de partícula). El flujo de la fase móvil fue de 1 ml/min, se utilizó un gradiente de agua a pH 2.5 con ácido trifluoroacético y acetonitrilo. Siendo la programación: T(0 min) 85% agua, 15% acn; T(0.10 min) 85% agua, 15 % acn; T (20 min) 65%agua 34% acn; T (23 min) 65% agua, 35% acn. La temperatura fue de 30 °C. la longitud de onda fue fijada a 280 nm y el tiempo de análisis

fue de 23 minutos. Para ello se utilizaron estándares de ácidos fenólicos: clorogénico, caféico, ferúlico, gálico, siringico y vainillínico, obtenidos de los laboratorios Sigma-Aldrich.

5.5.3 Análisis de flavonoides

La identificación de flavonoides se llevó a cabo con el método anteriormente descrito. Con una columna C18 Hypersil ODS (125 mm x 4 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula). El flujo de la fase móvil se mantuvo a 1 ml/min y consistió de un gradiente de agua a pH 2.5 con ácido trifluoroacético y acetonitrilo. Siendo la programación: T(0 min) 85% agua, 15% acn; T (0.10 min) 85% agua, 15 % acn; T (20 min) 65%agua 34% acn; T (25 min) 65% agua, 35% acn. La temperatura fue de 30 °C. El equipo se calibró para detectar longitud de onda de 365, 316 y 254 nm. El tiempo de análisis para este método fue de 25 minutos. Para identificar y cuantificar los flavonoides presentes en los extractos se usaron estándares de kaempferol, quercetina, rutina, luteolina, naringina y naringenina marca Sigma-Aldrich y la pedalitina aislada e identificada en el presente estudio.

5.4.4 Elaboración de curvas de calibración

Para la determinación de la concentración de los compuestos presentes en los extractos orgánicos y acuoso de *S. circinata* se realizaron las curvas de calibración para cada uno de los estándares, así como de los compuestos puros aislados.

Para la obtención de las curvas de calibración se aplicaron cinco inyecciones de cada estándar con concentraciones desde 14.24 hasta 231 µg, la variación del área en unidades de absorbancia de cada inyección fue utilizada para construir el modelo matemático de regresión lineal con la fórmula $Y=mX+b$, la cual se comparó posteriormente con los extractos y de esta manera se determinó la concentración de cada compuesto.

5.5 Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas del extracto de hexano.

Debido al bajo peso molecular y la naturaleza no polar de los componentes del extracto la identificación y cuantificación se realizó utilizando un cromatógrafo de gases Hewlett-

Packard 5890 II acoplado a un espectrómetro de masas, equipado con una columna capilar (25mm x 0.2mm), con un diámetro interno de 0.33 μm . el volumen de inyección fue de 1 μl . La identificación de los compuestos se basó en la comparación de los patrones de fragmentación de los espectros de masas de la biblioteca del Instituto nacional de estándares y tecnología (NIST 3.0) y estándares de la base de datos 69.

5.6 Fraccionamiento y obtención de compuestos puros del extracto de acetato de etilo y metanol

Los extractos de acetato de etilo y metanol se sometieron por separado a una partición con hexano, acetato de etilo y metanol, obteniéndose las fracciones con hexano, acetato de etilo y metanol. La separación de los compuestos presentes en las fracciones de acetato de etilo de ambos extractos se realizó por cromatografía en columna, la cual fue empacada con sílica gel para cromatografía en capa fina de la marca Macherey-Nagel (**Figura 6**)

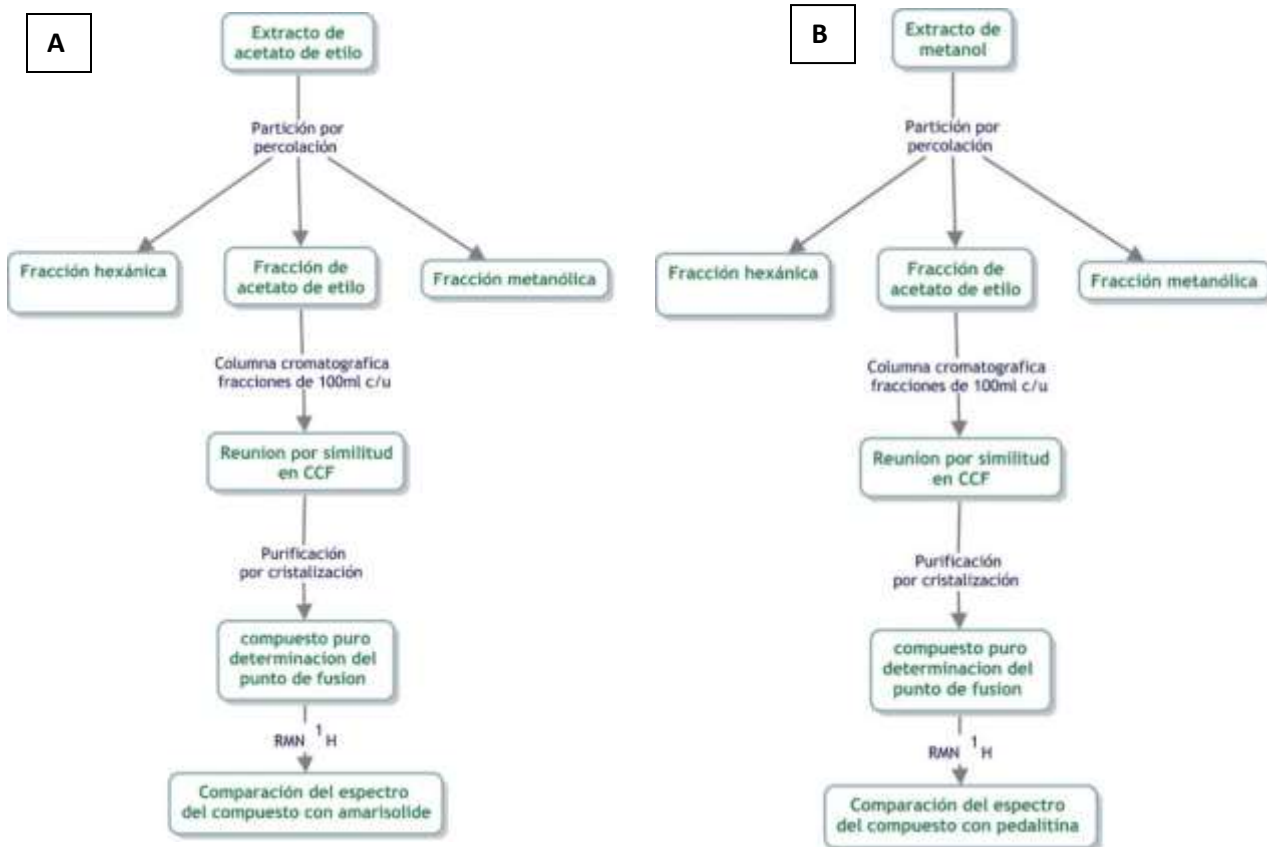


Figura 6. (A) Método para la separación, aislamiento y purificación del Amarisolide en el extracto de acetato de etilo; (B) procedimiento para la separación, purificación e identificación del flavonoide pedalitina.

5.6.1 Cromatografía en columna de la fracción de acetato de etilo obtenida de la partición del extracto de acetato de etilo

La fracción de acetato de etilo (7.7 g) se separó por cromatografía en columna de gel de sílice. Ella se inició eluyendo con hexano, posteriormente se utilizaron mezclas de hexano y cantidades crecientes de acetato de etilo, hasta llegar a 100% de acetato de etilo y finalizó con metanol. En total se obtuvieron 58 subfracciones de 100 mL cada una (**Cuadro 6**), las cuales fueron reunidas en grupo de acuerdo a sus perfiles cromatográficos. De las subfracciones 51-56 (1.24 g) se purificó por cristalización un compuesto, al cual se le determinó el p.f. en un equipo Fisher Johns y 10 mg de dicho compuesto fueron enviados al Instituto de Química de la UNAM para realizar un análisis de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN-¹H) en un espectrómetro Bruker, Avance DPX400.

Cuadro 6. Subfracciones obtenidas de la columna cromatográfica de la fracción de acetato de etilo

Sistema de elución	Proporción de los disolventes	Fracciones obtenidas
Hexano	100%	1-3
Hexano: acetato de etilo	9:1	4-6
Hexano : acetato de etilo	8:2	7-9
Hexano :acetato de etilo	7-3	10-12
Hexano : acetato de etilo	6:4	13-15
Hexano :acetato de etilo	1:1	16-18
Hexano : acetato de etilo	4:6	19-21
Hexano : acetato de etilo	3:7	22-24
Hexano: acetato de etilo	2:8	25-28
Hexano :acetato de etilo	1:9	29-31
Acetato de etilo	100	32-39
Acetato de etilo : metanol	9:1	40-42
Acetato de etilo : metanol	8:2	42-47
Acetato de etilo : metanol	7:3	48-49
Acetato de etilo : metanol	6:4	50
Acetato de etilo : metanol	1:1	51
Acetato de etilo : metanol	4:6	52
Acetato de etilo : metanol	3:7	53
Acetato de etilo : metanol	2:8	54-56
Acetato de etilo : metanol	1:9	57
metanol 70%	100 %	58

5.6.2 Cromatografía en columna de la fracción de acetato de etilo obtenida del extracto metanólico

La fracción de acetato de etilo (3.09 g) obtenida de la partición del extracto metanólico, se separó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice, usando mezclas de hexano y acetato de etilo de polaridad creciente, como eluyente. Dieciocho subfracciones de 100 ml cada una (**Cuadro 7**). De acuerdo a los patrones obtenidos por cromatografía en capa fina se reunieron las subfracciones 5-10. De éstas se obtuvo un precipitado amarillo pálido (20 mg), al cual se le determinó el p.f. y RMN-¹H

Cuadro 7. Subfracciones obtenidas de la columna cromatográfica de la fracción de acetato de etilo.

Sistema de elución	Proporción de los disolventes	Fracciones obtenidas
Acetona: hexano	1:1	1-5
Acetona : hexano	7:3	5-10
Acetona : hexano	8:2	11
Acetona	100	12-14
Acetona metanol	8:2	15-18

EVALUACION FARMACOLÓGICA

5.7 Animales

Ratones machos de la cepa CD1 provenientes del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, con un peso de 25-30 g. Se colocaron en cajas de acrílico en grupos de seis, con agua y alimento *ad libitum*; mantenidos a una temperatura controlada de 22°C y con ciclo de luz/oscuridad de 12 h. Para el manejo adecuado de los animales se siguieron los lineamientos éticos establecidos en la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). Dicha norma contiene especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Todos los protocolos experimentales fueron realizados de acuerdo a las guías éticas para investigaciones de dolor experimental en animales conscientes (Zimmermann, 1983).

5.9 Administración de los tratamientos

El extracto de hexano se resuspendió mediante emulsificación con polisorbato 80 (Tween 80) y para los extractos de acetato de etilo, metanol y acuoso, el grupo control negativo ácido acético (Baker) y el fármaco de referencia (Ketorolaco SupraDol®) se utilizó solución salina fisiológica a 0.9%. Tanto los extractos y el fármaco de referencia utilizados fueron de reciente preparación, las dosis evaluadas para cada extracto fueron de 1, 10, 30, 100 y 300 mg/kg de peso y el volumen de administración fue de 10 ml/kg la administración de todos los tratamientos fue por vía intra peritoneal (i.p.) (Hedrich, 2012).

5.10 Prueba de estiramiento abdominal (Writhing)

Esta prueba consiste en la administración vía i.p. de ácido acético a 1%, este químico provoca irritación en la cavidad peritoneal, que a su vez ocasiona una conducta estereotipada donde son característicos los estiramientos de los miembros posteriores y las contracciones abdominales (Collier *et al.*, 1968). La prueba se realizó administrando a cada grupo (n=6) con las dosis a evaluar 30 minutos antes de la administración del ácido acético, los estiramientos fueron contabilizados en bloques de 5 minutos, la prueba tuvo una duración de 30 minutos y el efecto antinociceptivo se estableció al comparar a los grupos tratados con el

grupo control; también se determinó el porcentaje de inhibición de la nocicepción mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición de la nocicepción} = \left(\frac{\text{control} - \text{tratamiento}}{\text{tratamiento}} \right) \times 100$$

5.11 Determinación del margen de seguridad

El margen de seguridad se calculó siguiendo los protocolos de toxicidad oral establecidos por la organización para la cooperación y el desarrollo económico (OCDE). Este método consistió en administrar la mayor dosis recomendada (2000 mg/kg) de los extractos a tres ratones vía i.p., los ratones fueron observados por dos horas posteriores a la administración en busca de signos tóxicos como pérdida de la conciencia, postración, ataxia o dificultada para respirar y muerte en los ratones (toxicidad aguda). El seguimiento del peso corporal de los ratones administrados con los extractos y de un grupo control administrado con solución salina se realizó por el peso durante 14 días, posterior a los cuales se realizó la eutanasia de los ratones y se les realizó la necropsia en busca de alteraciones macroscópicas de los órganos internos (OCDE, 2002).

5.12 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza de un factor (ANADEVA) seguido de la prueba comparación múltiple de medias de Dunnett para la comparación de los tratamientos contra el grupo control. Se utilizó el programa Graphpad Prism 6 (Zar, 2010). Los datos de nocicepción se describen como el curso temporal, el número de estiramientos totales y presentados como promedio \pm el error estándar, la inhibición de la nocicepción se expresa en puntos porcentuales.

6. RESULTADOS

Fitoquímica

6.1 Rendimiento de los extractos

El rendimiento de cada uno de los extractos fue calculado con base al peso del extracto con respecto al peso de la materia vegetal seca del que se partió. Para los extractos orgánicos 400 gramos y 50 gramos para el extracto acuoso. En la **Cuadro 8** se presentan los rendimientos de los cuatro extractos obtenidos de *S. circinata* expresados en peso y porcentaje. Unidades y porcentaje del extracto acuoso

Cuadro 8. Rendimiento de los extractos obtenidos de la parte aérea de *S. circinata*

Hojas (parte aérea)	E X T R A C T O S							
	HEXANO PESO (g) (%)		ACETATO DE ETILO PESO (g) (%)		METANOL PESO (g) (%)		ACUOSO Peso (g) (%)	
<i>S. circinata</i>								
Extractos orgánicos (400 g)	5.9	1.47	18.2	4.55	32.7	8.12		
Extracto acuoso (50 g)							10.6	21.2

6.2 Identificación por CCF de terpenos de *S. circinata*

El perfil cromatográfico permite ver que solamente en el extracto de hexano y el de acetato de etilo se identificaron compuestos de tipo terpenoide. También dicho perfil químico muestra la presencia de α y β amirina en el extracto de hexano y los ácidos ursólico y oleanólico en los extractos no polares (hexano y acetato de etilo) (**Figura 7**).

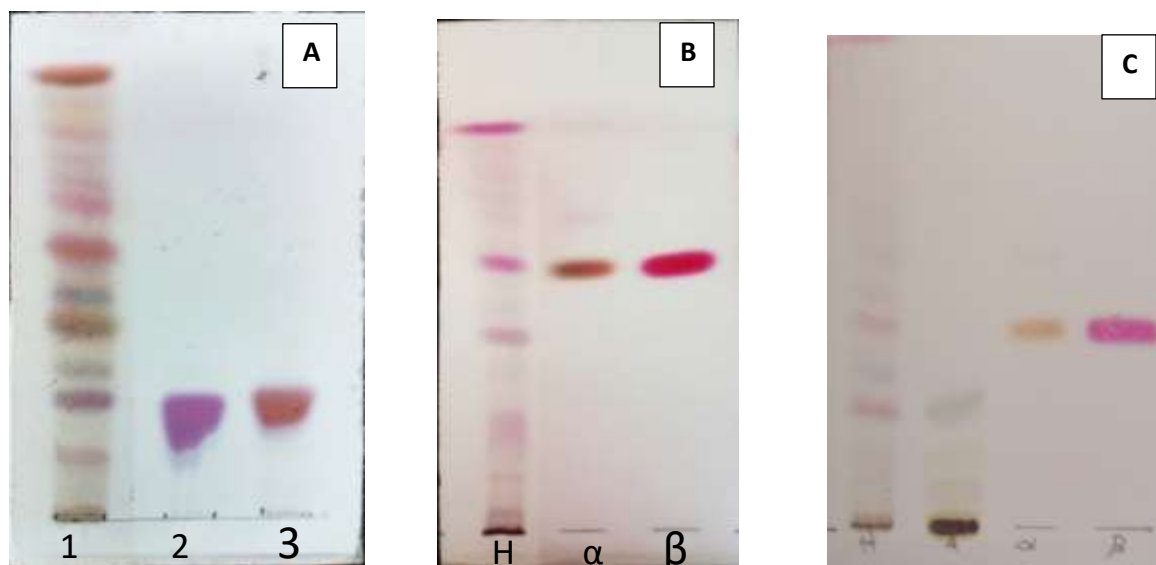


Figura 7. Detección de terpenos en extractos no polares de *Salvia circinata*: Extracto hénanico (**A y B**), Extracto de acetato de etilo (**C**). Placa A: carril 1. Extracto de hexano, 2. Ácido ursólico y 3. Ácido oleanólico. Placa B, carril 1. Extracto de hexano, 2. α -amirina y 3. β - amirina. Placa C, carril 1. Extracto de hexano, 2: Extracto de acetato de etilo, 3. α -amirina y 4. β - amirina.

6.3 Análisis fitoquímico del extracto de hexano

6.3.1 Identificación de compuestos por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM)

Los resultados obtenidos por esta técnica permitieron la identificación de 27 compuestos de los cuales los mayoritarios fueron: β sitosterol (3.17 $\mu\text{g}/\text{mg}$), ácido palmítico (2.04 $\mu\text{g}/\text{mg}$) y la mezcla α y β amirina (1.68 $\mu\text{g}/\text{mg}$) (**Figura 8, Cuadro 9**).

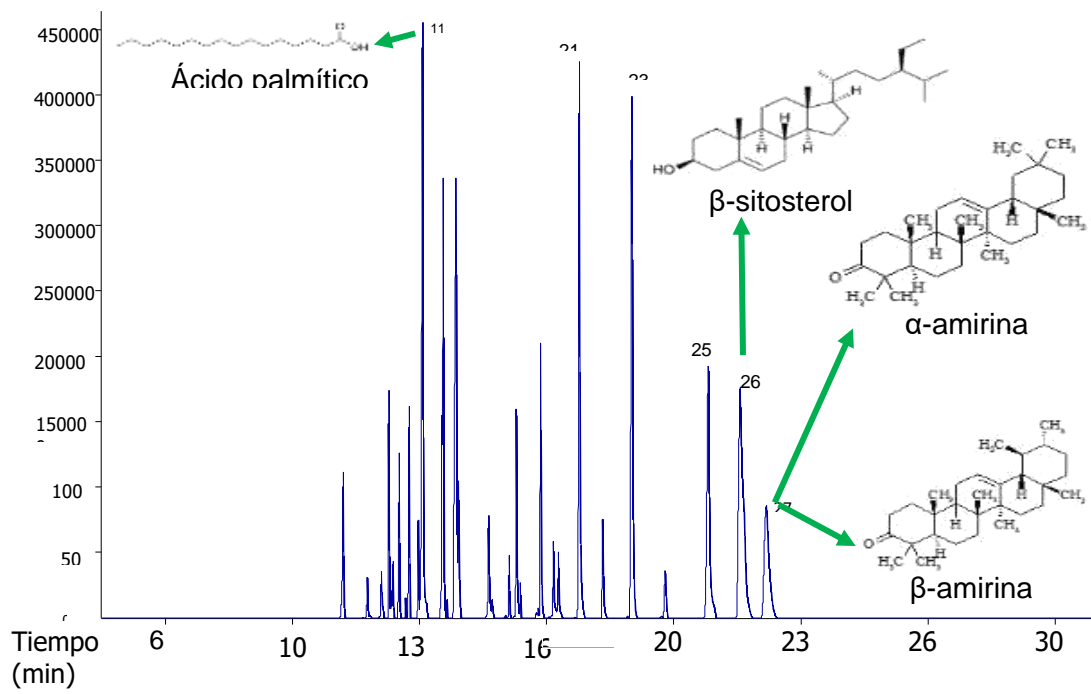


Figura 8. Cromatograma de gases -masas del extracto de hexano de *S. circinata*

Cuadro 9. Identificación de compuestos por CG-EM en el extracto de hexano de *S. circinata*

No. pico	Nombre	Área %	R.T. (min)	Formula	Peso molecular
1	(-)-Spatulenol	2.6403	11.33	C ₁₅ H ₂₄ O	220
2	Acido metil ester ciclopentaundecanoico	0.63016	11.97	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	268
3	Ácido tetradecanoico	0.94125	12.33	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228
4	Octadecanal	1.5061	12.53	C ₁₈ H ₃₆ O	268
5	2-Pentadecanona, 6,10,14-trimetil-	0.62537	12.63	C ₁₈ H ₃₆ O	268
6	1,2-Ácido bencenodicarboxilico, butil 2-metilpropil ester	1.9915	12.8	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278
7	2-Pentadecanona	0.60788	12.97	C ₁₅ H ₃₀ O	226
8	Ácido tridecanoico, metil ester	2.5812	13.06	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228
9	1,2-Ácido bencenodicarboxilico, dihexil ester	1.6886	13.3	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	334
10	Ácido etil ester undecanoico	8.6976	13.39	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	214
11	Ácido palmítico	8.7888	13.41	C₁₆H₃₂O₂	256
12	11,14,17-Ácido eicosatrienoico, metil ester	5.9447	13.95	C ₂₁ H ₃₆ O ₂	320
13	Ácido tridecanoico, metil ester	0.28565	14.05	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228
14	9,12,15-Octadecatrienal	8.1488	14.29	C ₁₈ H ₃₀ O	262
15	4,8,12,16-Tetrametilheptadecan-4-olido	1.6731	15.14	C ₂₁ H ₄₀ O ₂	324
16	7-hexil- Eicosano	0.72889	15.68	C ₂₆ H ₅₄	366
17	1,2-Ácido bencenodicarboxilico, mono(2-etilhexil) ester	2.7056	15.87	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278
18-21	7-hexil- Eicosano	3.1418	16.50	C ₂₆ H ₅₄	366
22-25	11-decil-Tetracosano	1.2600	18.13	C ₃₄ H ₇₀	478
26	β-Sitosterol	12.707	21.73	C₂₉H₅₀O	414
27	Mezcla α, β amirina	6.7320	22.42	C₃₀H₄₈O	424

6.3.2 Análisis mediante CLAR del extracto de hexano

El análisis mediante CLAR del extracto de hexano de *S. circinata* mostró la presencia de seis terpenos donde la α -amirina (833.33 $\mu\text{g}/\text{mg}$) es el compuesto con mayor concentración, se identificó a los siguientes metabolitos: ácido ursólico (96.33 $\mu\text{g}/\text{mg}$), ácido oleanólico (67.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$), amarisolide (55.66 $\mu\text{g}/\text{mg}$), carnosol (30.33 $\mu\text{g}/\text{mg}$) y al β -sitosterol (3.86 $\mu\text{g}/\text{mg}$) (**Figura 9**).

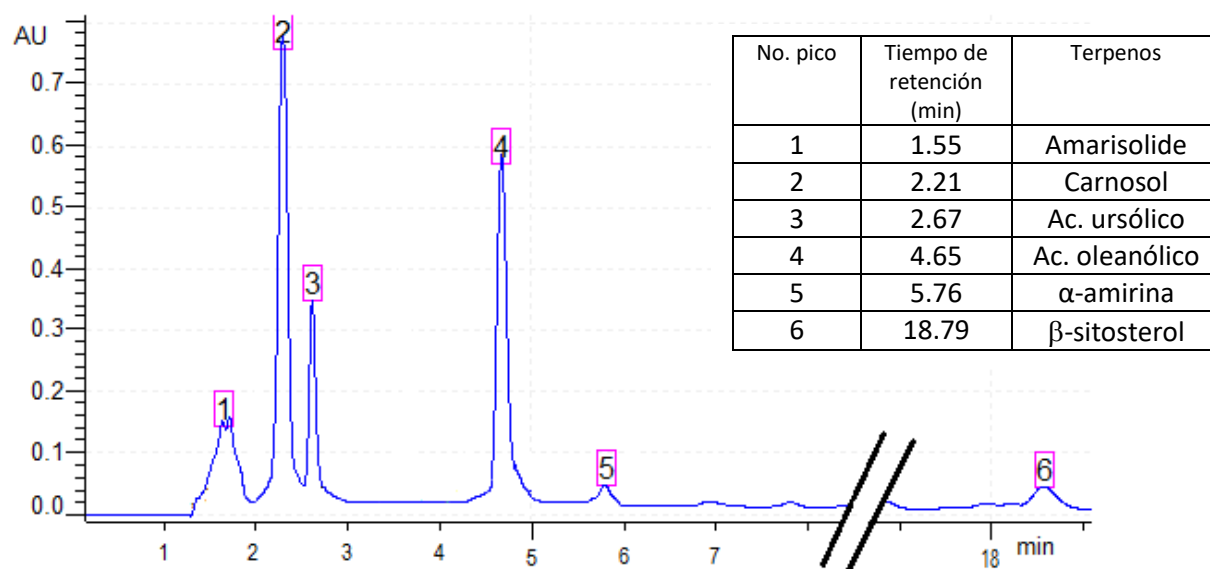


Figura 9. Identificación por CLAR de terpenos presentes en el extracto de hexano de *S. circinata*

6.4 Análisis del extracto de acetato de etilo

6.4.1 Identificación y cuantificación de terpenoides mediante CLAR

En este extracto el terpeno más abundante fue el amarisolide con 802 $\mu\text{g}/\text{mg}$ seguido por β -sitosterol (31.66 $\mu\text{g}/\text{mg}$) y carnosol (18.83 $\mu\text{g}/\text{mg}$) (**Figura 10**).

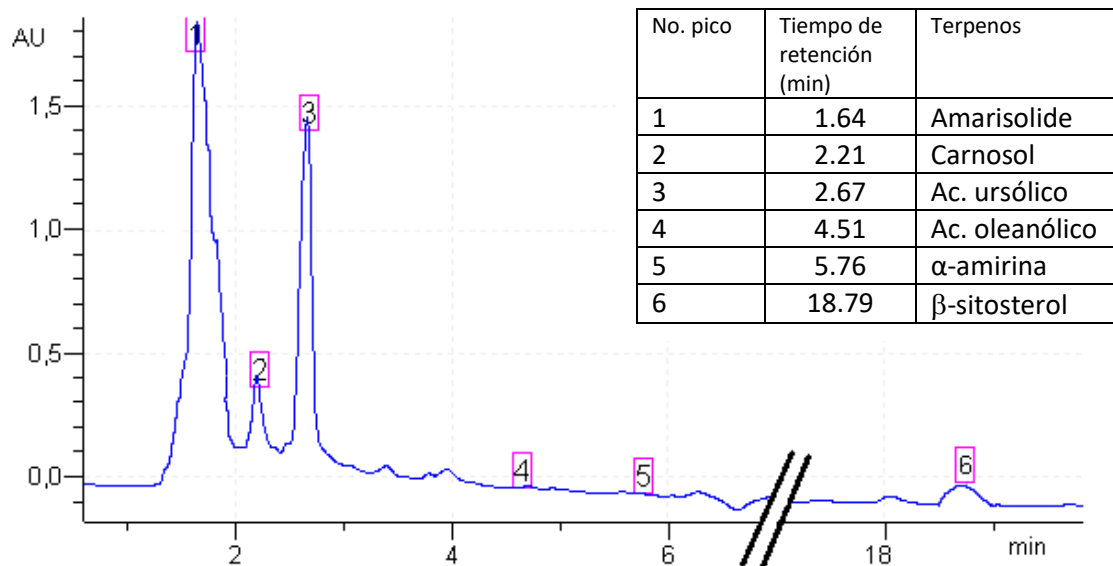


Figura 10. Identificación por CLAR de terpenos presentes en el extracto de acetato de etilo de *S. circinata*

6.4.2 Identificación y cuantificación de ácidos fenólicos

En este extracto se identificaron tres ácidos fenólicos el más abundante fue el ácido ferúlico (32.91 $\mu\text{g}/\text{mg}$), seguido de ácido clorogénico (14 $\mu\text{g}/\text{mg}$) y ácido caféico (0.43 $\mu\text{g}/\text{mg}$) (Figura 11).

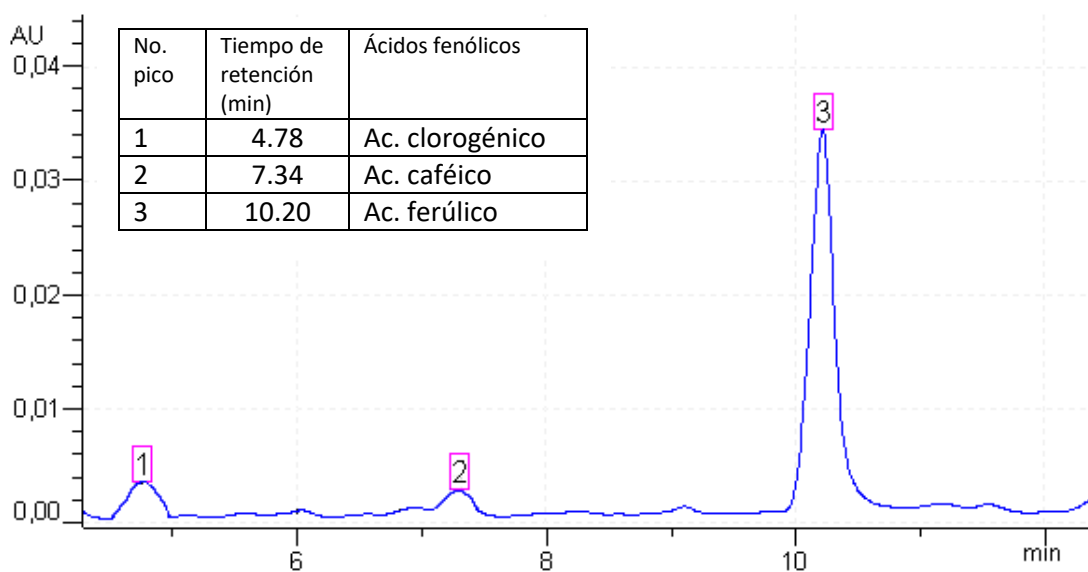


Figura 11. Identificación por CLAR de ácidos fenólicos presentes en el extracto de acetato de etilo de *S. circinata*

6.4.3 Identificación y cuantificación de flavonoides

El análisis cromatográfico permitió identificación de 13 picos, de los cuales solamente fueron caracterizados la quercetina (23.33 $\mu\text{g}/\text{mg}$) y a la floretina (8.24 mg/kg) (**Figura 12**).

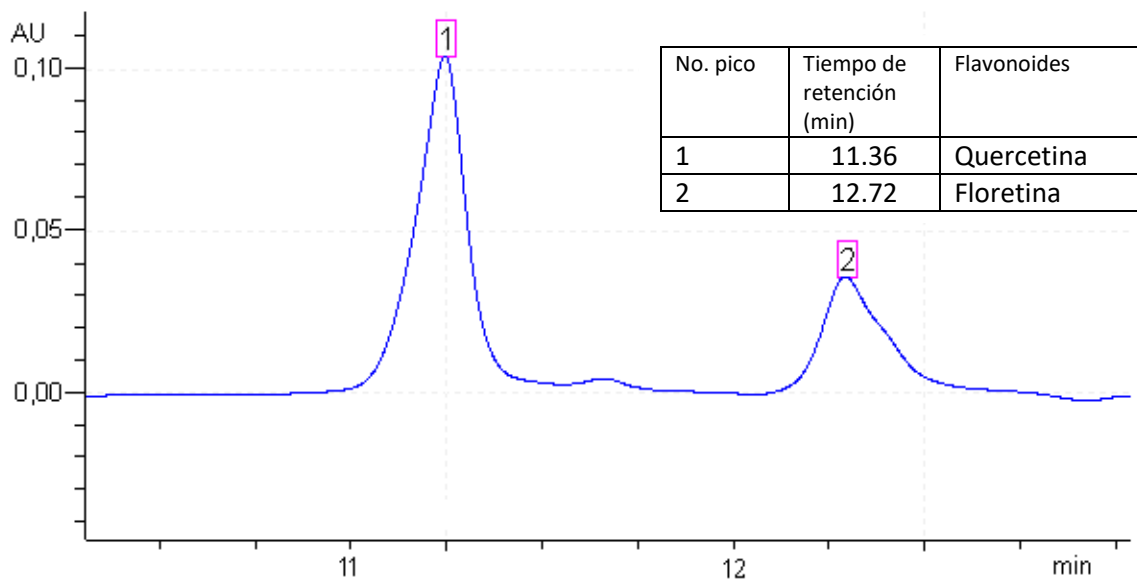


Figura 12. Identificación por CLAR de flavonoides presentes en el extracto de acetato de etilo de *S. circinata*

6.4.4 Aislamiento del amarisolide

El fraccionamiento cromatográfico del extracto de acetato de etilo permitió la obtención de una mezcla del ácido ursólico y oleanólico, así como el amarisolide. La mezcla de los triterpenos se identificó por CCF en comparación con los respectivos estándares. La identificación del amarisolide se realizó por su punto de fusión (140-142 °C) y su determinación estructural por los datos obtenidos del espectro de RMN-¹H con los reportados en la literatura (Maldonado *et al.* 1996).

6.5 Análisis del extracto de metanol

6.5.1 Identificación y cuantificación de terpenoides mediante CLAR

En este extracto se identificaron los terpenos amarisolide (820 $\mu\text{g}/\text{mg}$), ácido oleanólico (197.83 $\mu\text{g}/\text{mg}$), estigmasterol (64.16 $\mu\text{g}/\text{mg}$), β -sitosterol (40.33 $\mu\text{g}/\text{mg}$), carnosol (18.83 $\mu\text{g}/\text{mg}$) y ácido ursólico (12.76 $\mu\text{g}/\text{mg}$) (**Figura 13**).

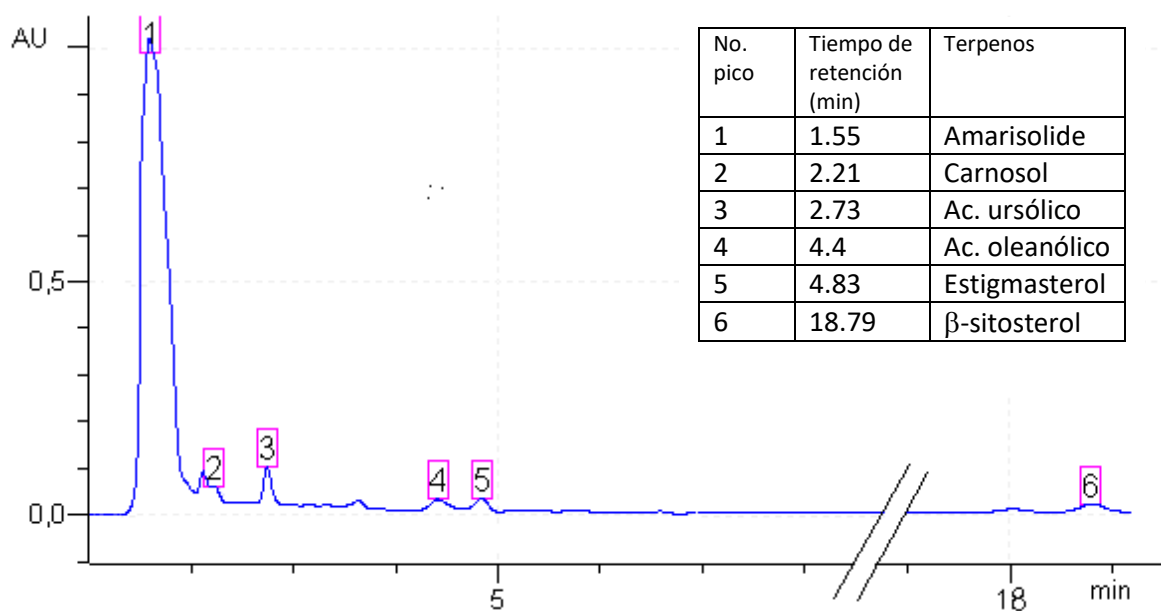


Figura 13. Identificación por CLAR de terpenos presentes en el extracto metanólico de *S. circinata*

6.5.2 Identificación de ácidos fenólicos

El método de ácidos fenólicos de extracto de metanol de *S. circinata* permitió la identificación y cuantificación del ácido clorogénico y ácido caféico con concentraciones de 40.33 y 5.79 $\mu\text{g}/\text{mg}$ respectivamente (**Figura 14**).

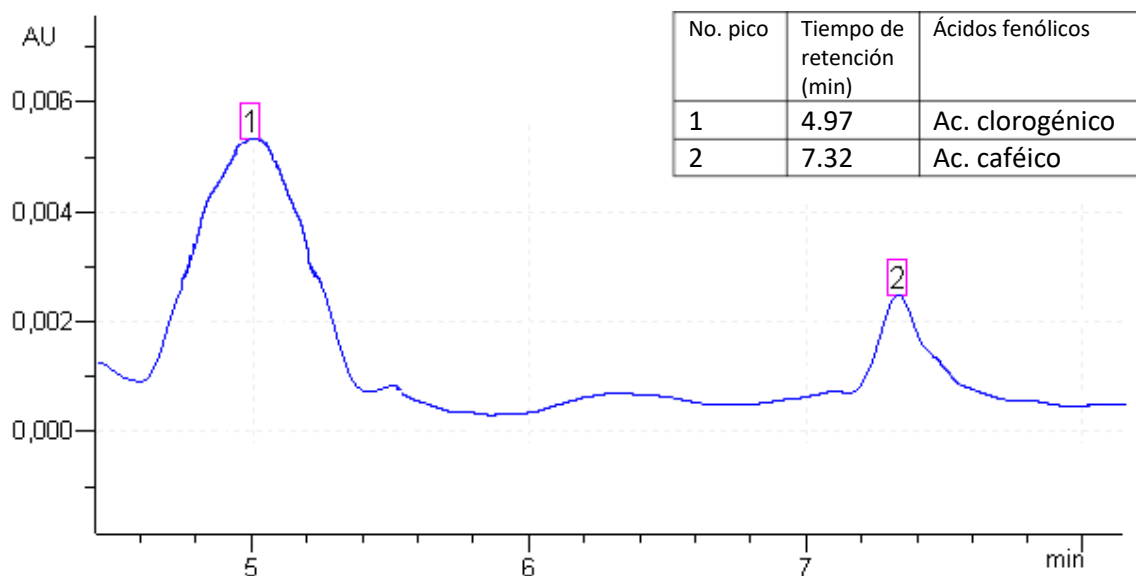


Figura 14. Identificación por CLAR de ácidos fenólicos presentes en el extracto de metanol de *S. circinata*

6.5.3 Identificación y cuantificación de flavonoides

Se identificaron y cuantificaron los flavonoides: pedalitina (134.06 $\mu\text{g}/\text{mg}$), florizina (27.16 $\mu\text{g}/\text{mg}$) y rutina (18.31 $\mu\text{g}/\text{mg}$) (**Figura 15**).

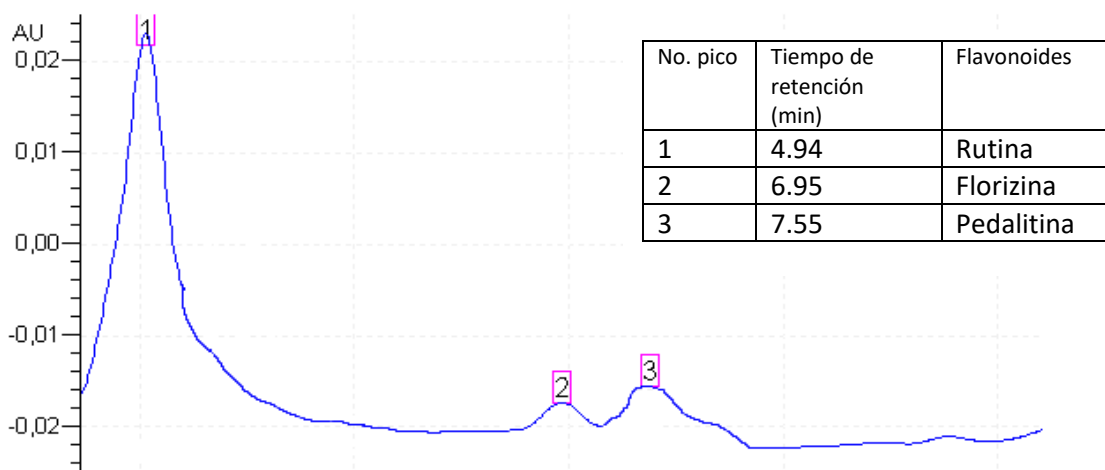


Figura 15. Identificación por CLAR de flavonoides presentes en el extracto metanólico de *S. circinata*

6.5.4 Aislamiento de la pedalitina

La separación por cromatografía en columna de la fracción de acetato de etilo de extracto metanólico permitió el aislamiento de la pedalitina, sólido amarillo pálido, con punto de fusión de 263° C. La determinación de este flavonoide se realizó por la comparación de los datos físicos antes mencionados y las señales de RMN-¹H mencionados en la literatura (Maldonado *et al.*, 1997) .

6.6 Análisis fitoquímico del extracto acuoso

6.6.1 Identificación y cuantificación de terpenoides mediante CLAR

En el análisis por CLAR para terpenos del extracto acuoso se identificaron amarisolide (116.08 µg/mg), ácido ursólico (7.35 µg/mg), estigmasterol (7.15 µg/mg), carnosol (1.04 µg/mg) y β- sitosterol (0.05 µg/mg) (**Figura 16**).

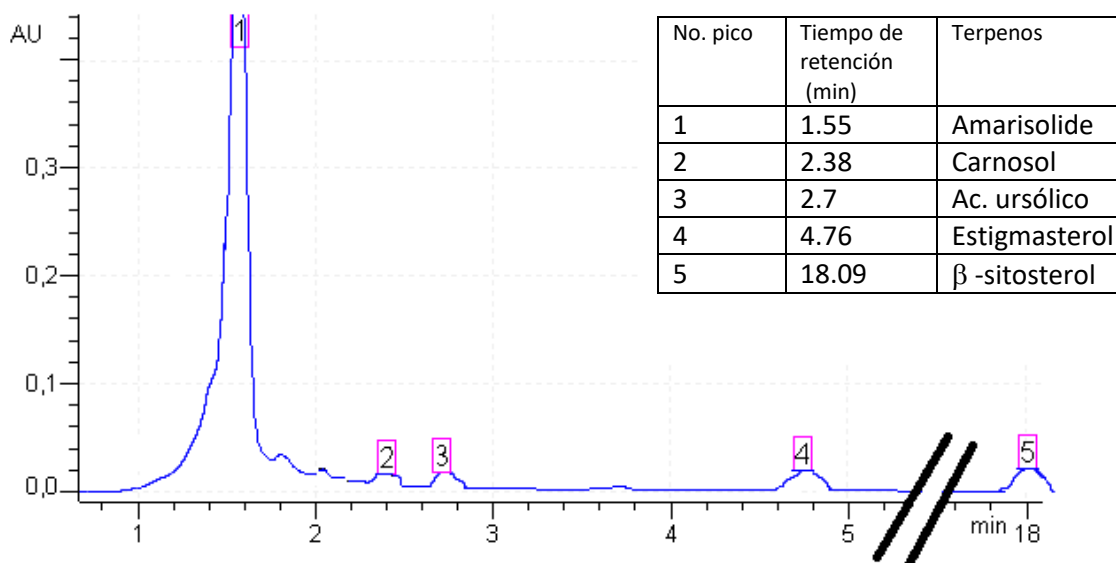


Figura 16. Identificación de terpenos presentes en el extracto acuoso de *S. circinata*

6.6.2 Identificación y cuantificación de ácidos fenólicos

El análisis de ácidos fenólicos permitió identificar al ácido clorogénico (40.33 $\mu\text{g}/\text{mg}$), ácido ferúlico (12.25 $\mu\text{g}/\text{mg}$) y al ácido cafeico (5.78 $\mu\text{g}/\text{mg}$) (**Figura 17**).

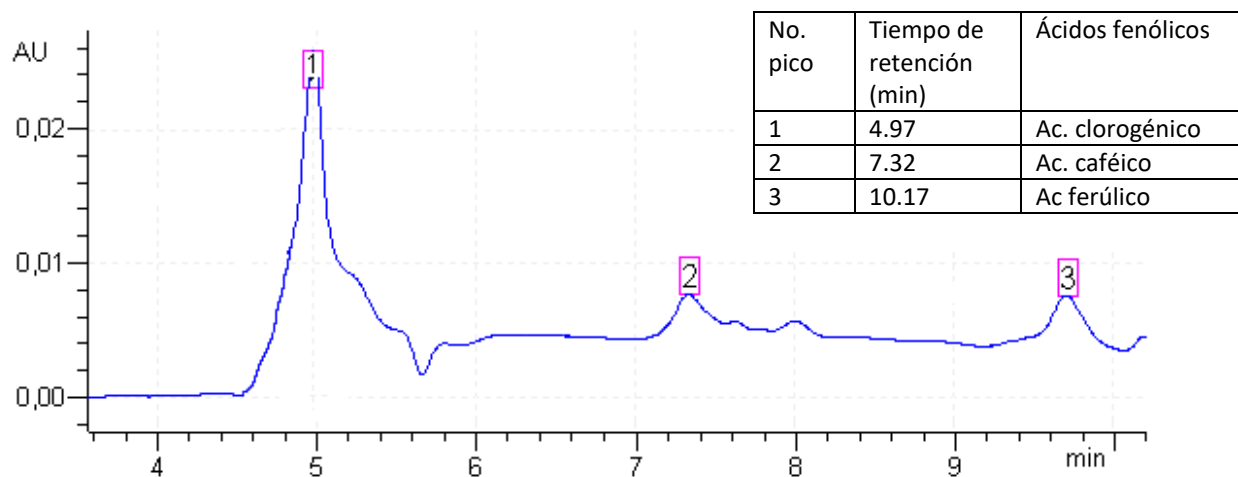


Figura 17. Identificación de ácidos fenólicos presentes en el extracto acuoso de *S. circinata*

6.6.3 Identificación y cuantificación de flavonoides

Los flavonoides identificados en el extracto acuoso fueron Rutina (21.33 $\mu\text{g}/\text{mg}$), Florizina (10.38 $\mu\text{g}/\text{mg}$) y pedalitina (5.16 $\mu\text{g}/\text{mg}$) (**Figura 18**).

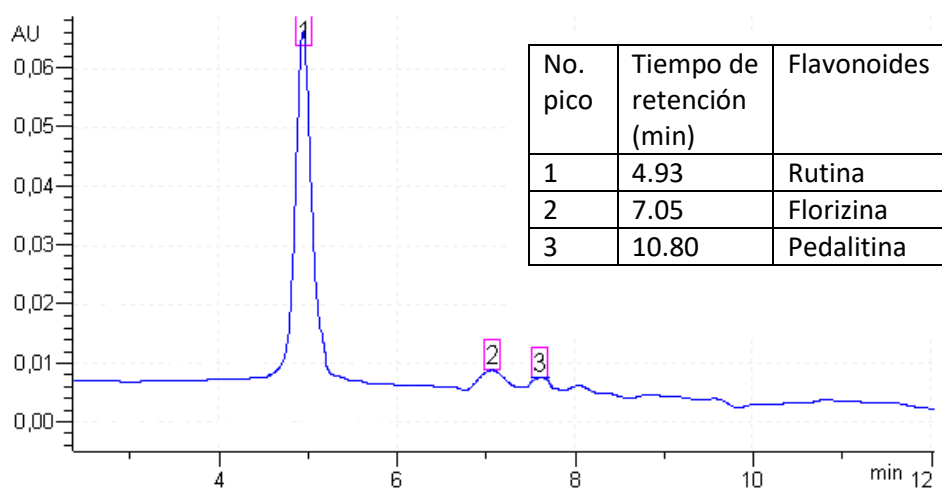


Figura 18. Identificación de los flavonoides presentes en el extracto acuoso de *S. circinata*

6.7 concentración de metabolitos en los extractos de *S. circinata*

En el **Cuadro 10** se muestran las concentraciones de los metabolitos presentes en los extractos orgánicos y acuoso de *S. circinata*.

Cuadro 10. Concentración de los metabolitos de los extractos de *S. circinata* expresada en $\mu\text{g}/\text{mg}$

CLAR CONCENTRACION ($\mu\text{g}/\text{mg}$)					
	Compuesto	Extracto de hexano	Extracto de acetato de etilo	Extracto de metanol	Extracto acuoso
Terpenos	α -amirina	833.33	62.6		
	Ác. Ursólico	96.33	250	12.76	7.35
	Ác. Oleanólico	67	67	197.83	
	Amarisolide	56.66	802	820	116.08
	Carnosol	30.33	18.83	18.83	1.04
	β -sitosterol	3.86	31.66	40.33	0.05
	Estigmasterol			64.16	7.15
	Ácidos fenólicos	Ác. Ferúlico		32.91	
Ác. Clorogénico			14	40.33	40.33
Ác. Caféico			0.43	5.79	5.78
Quercetina			23.33		
Flavonoides	Floretina		8.24		
	Pedalitina			134.06	5.16
	Florizina			27.16	10.38
	Rutina			18.31	21.33

Evaluación farmacológica

6.7.1 Evaluación farmacológica del extracto de hexano

Las dosis del extracto de hexano evaluadas (1-300 mg/kg) en comparación con el grupo control son mostradas mediante cursos temporales (**Figura 19 A**). Se observa que todas las dosis se comportan con una disminución significativa similar al grupo que recibió el fármaco de referencia, siendo la dosis de 300 mg/kg la que redujo el número de estiramientos de forma más significativa. Se realizó la gráfica de estiramientos totales donde se aprecia que todas las dosis administradas se comportan de manera similar entre sí y existen diferencias significativas con respecto al grupo control (**Figura 19 B**).

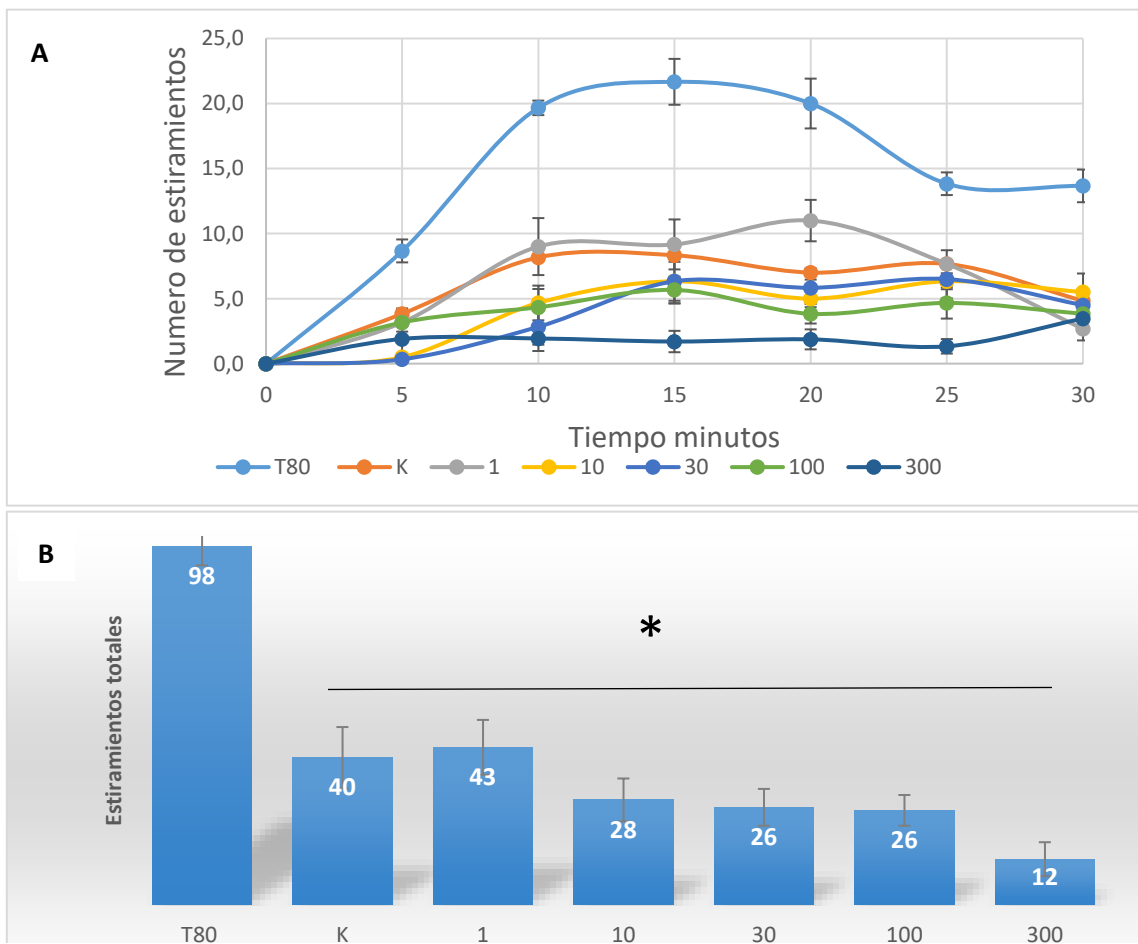


Figura 19. Efecto antinociceptivo del extracto de hexano de *S. circinata*: curso temporal (A), estiramientos totales (B). K= ketorolaco (1 mg/kg, i.p., fármaco de referencia antinociceptiva). Las barras representan la media \pm el error estándar de seis animales. Los asteriscos indican diferencias significativas $p < 0.05$ con respecto al vehículo, ANADEVa seguida de la prueba de Dunnett

La inhibición de la nocicepción del extracto de hexano, expresada en porcentaje muestra que todas las dosis probadas inhiben la conducta nociceptiva en un rango que va desde 55.86 % en la dosis de 1 mg/kg hasta el 77.62% para la dosis de 10 mg/kg y como se aprecia (**figura 20**) el comportamiento de las dosis evaluadas es similar al ketorolaco (farmaco de referencia).

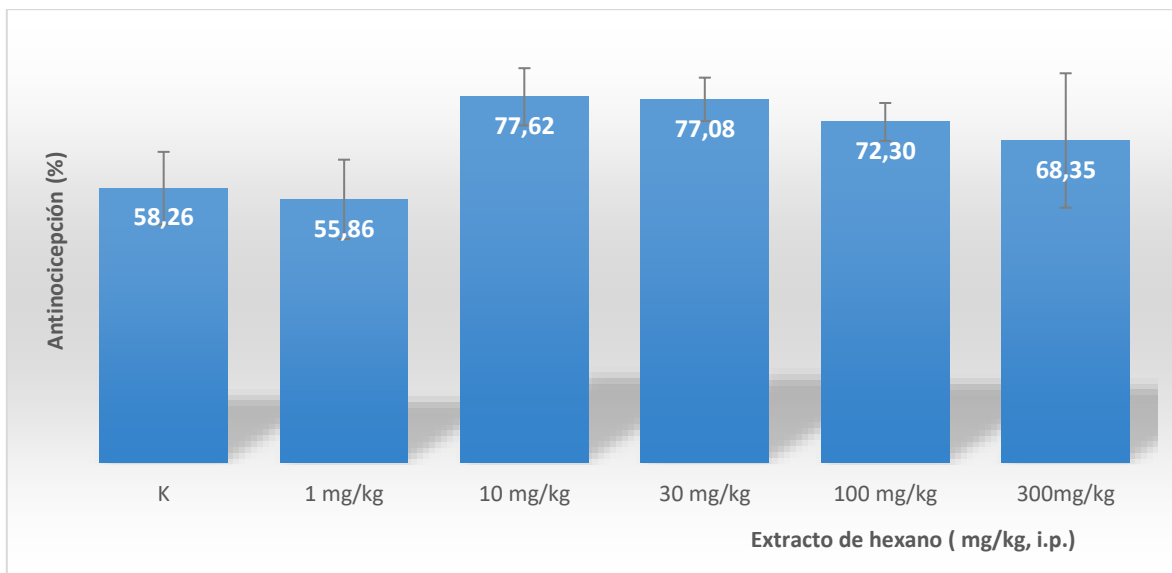


Figura 20. Porcentaje de antinocicepción del extracto de hexano en las dosis evaluadas K= ketorolaco 1 mg/kg

6.7.2 Evaluación farmacológica del extracto de acetato de etilo

El número de estiramientos máximo que presentó el grupo control fue de 25 al transcurrir 10 min después de la administración del ácido acético a 1%. El extracto de acetato de etilo de *S. circinata* produce efecto antinociceptivo significativo en un rango de dosis de 1-300 mg/kg. Las curvas de las dosis de 30 y 300 mg/kg retardan el máximo de estiramientos a 15 y 20 min, además de reducir significativamente la conducta nociceptiva con respecto a la curva del fármaco de referencia. Después de este tiempo, el número de estiramientos se mantiene hasta finalizar la prueba (**Figura 21 A**). El extracto de acetato de etilo en todas las dosis

evaluadas (1-300 mg/kg) disminuye significativamente el número de estiramientos totales de los ratones (**Figura 21B**).

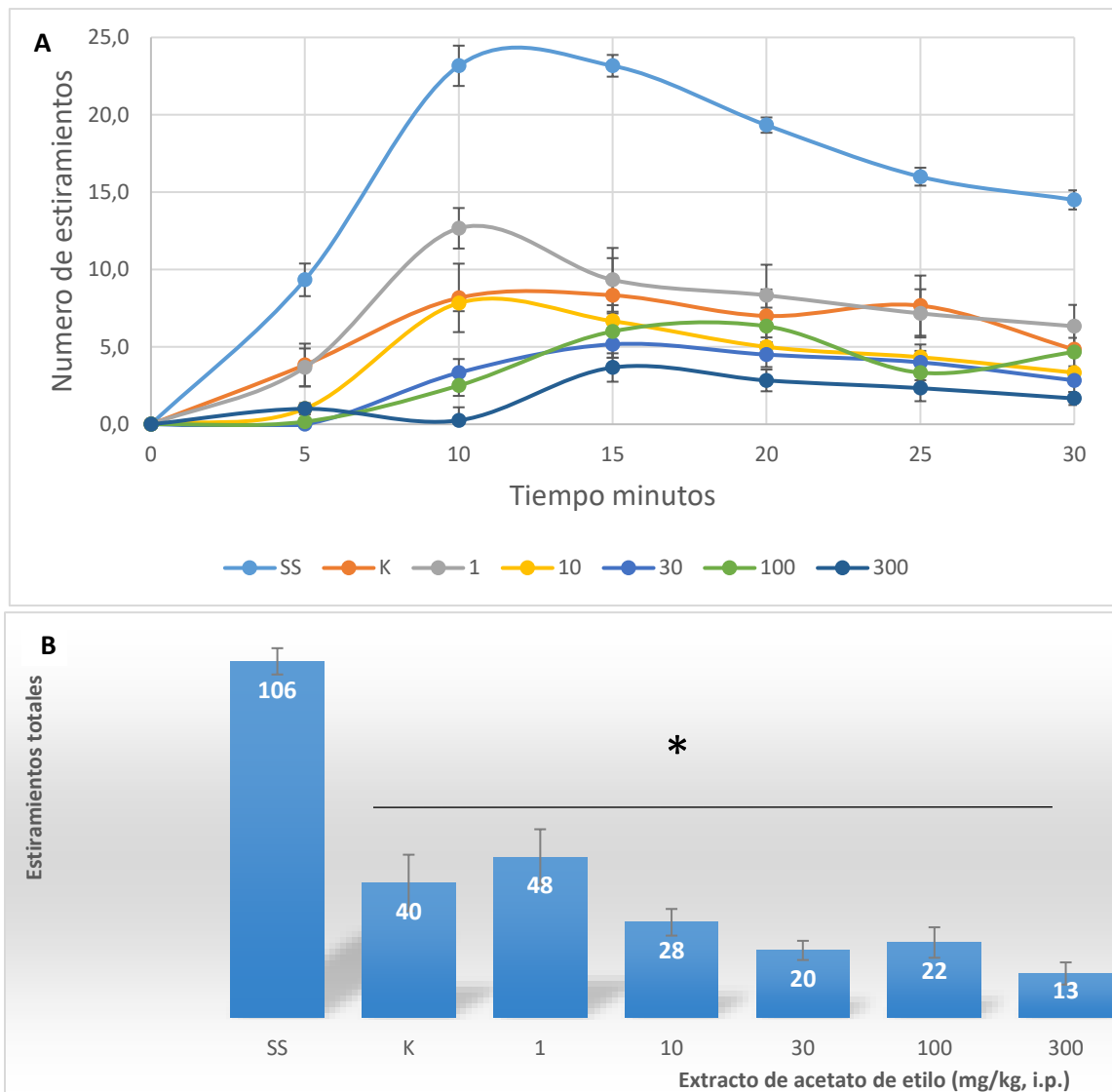


Figura 21. Efecto antinociceptivo del extracto de acetato de etilo de *S. circinata*: curso temporal (A), estiramientos totales (B). K= ketorolaco (1 mg/kg, i.p., fármaco de referencia antinociceptiva). Las barras representan la media \pm el error estándar de seis animales. Los asteriscos indican diferencias significativas $p < 0.05$ con respecto al vehículo, ANADEVa seguida de la prueba de Dunnett.

En la **Figura 22** se muestra el porcentaje de inhibición de la conducta nociceptiva observándose que los extractos del acetato de etilo en todas las dosis evaluadas inhiben la conducta nociceptiva en un rango de 55.81- 87.88 %. Las dosis de 10, 30, 100 y 300 mg/kg fueron las más eficaces en la disminución del dolor con respecto al ketorolaco.

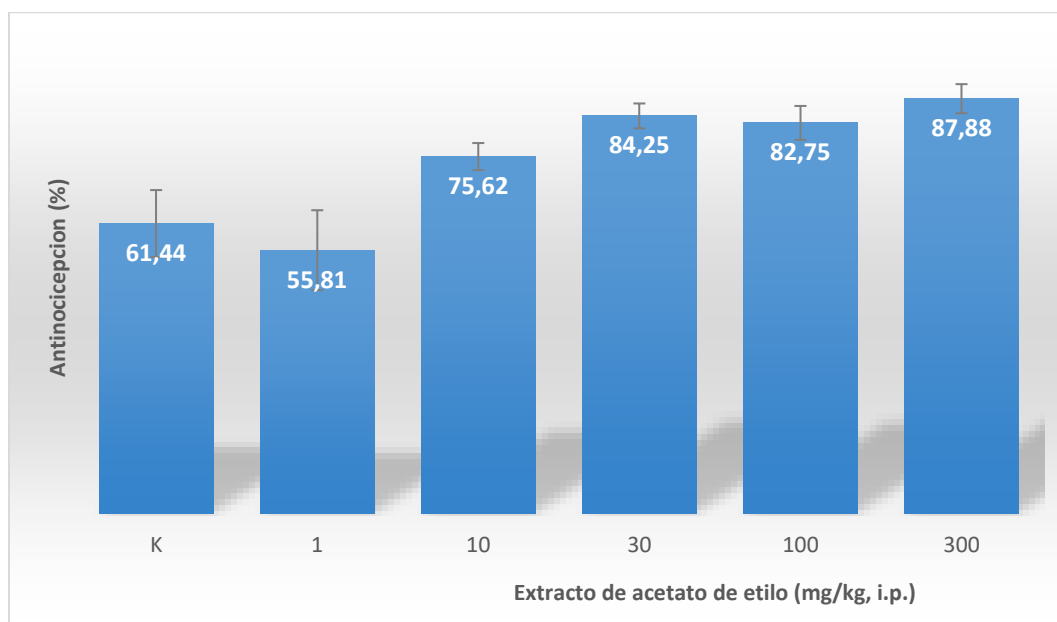


Figura 22. Porcentaje de antinocicepción del extracto de acetato de etilo en las dosis evaluadas K= ketorolaco 1 mg/kg.

6.7.3 Evaluación farmacológica del amarisolide

El diterpeno amarisolide fue evaluado en la prueba de estiramiento abdominal. Las dosis de 1, 5 y 10 mg/kg se evaluaron del mismo modo que en las pruebas de los extractos orgánicos y acuoso se utilizó al Ketorolaco (1mg/kg) como fármaco de referencia. La **Figura 23 A** muestra los cursos temporales de las dosis evaluadas donde es posible observar un comportamiento similar del fármaco de referencia. en la **Figura 23 B** se observan los estiramientos totales de las dosis evaluadas. Es posible apreciar que la conducta nociceptiva fue reducida significativamente en todos los grupos ($P > 0.05$).

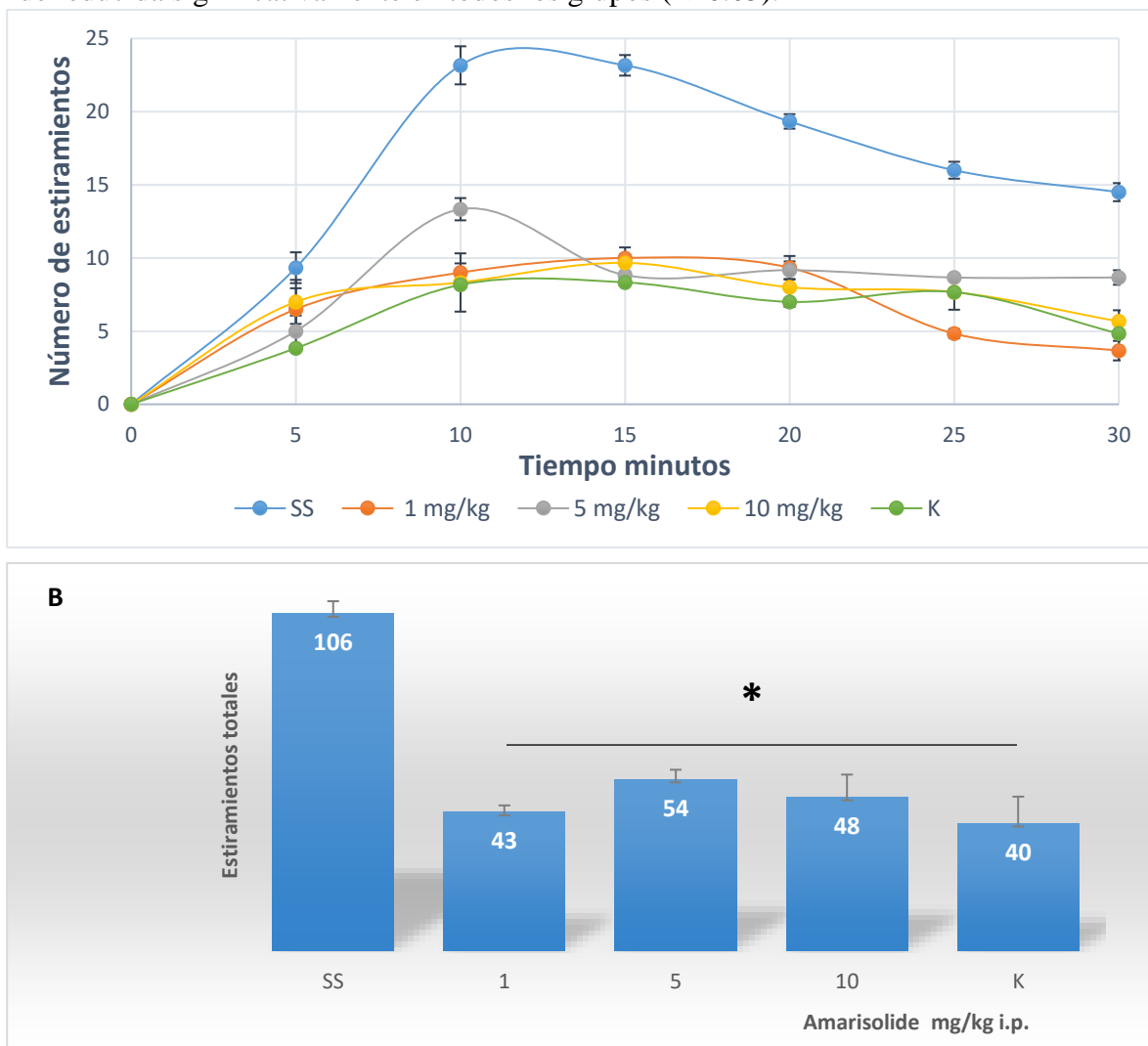


Figura 23. Efecto antinociceptivo del amarisolide de *S. circinata*: curso temporal (A), estiramientos totales (B). K= ketorolaco (1 mg/kg, i.p., fármaco de referencia antinociceptiva). Las barras representan la media \pm el error estándar de seis animales. Los asteriscos indican diferencias significativas $p < 0.05$ con respecto al vehículo, ANADEV seguida de la prueba de Dunnett

La inhibición de la nocicepción en la dosis de 1 mg/kg disminuyó 53.39 %, la dosis de 5 mg/kg 49.25 % y la dosis de 10 mg/kg disminuyó en 49.35% los estiramientos en los ratones (**figura 24**).

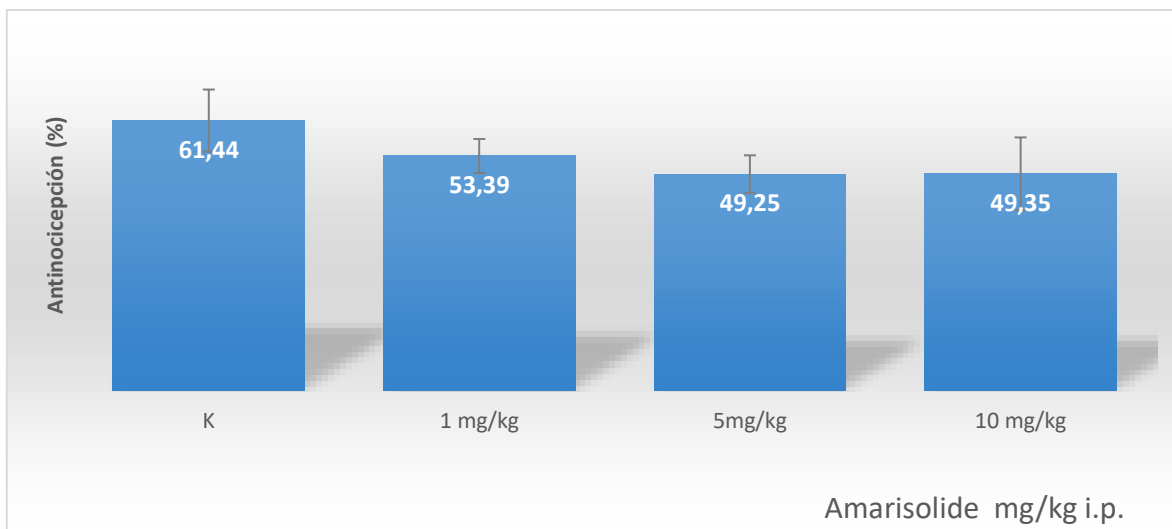
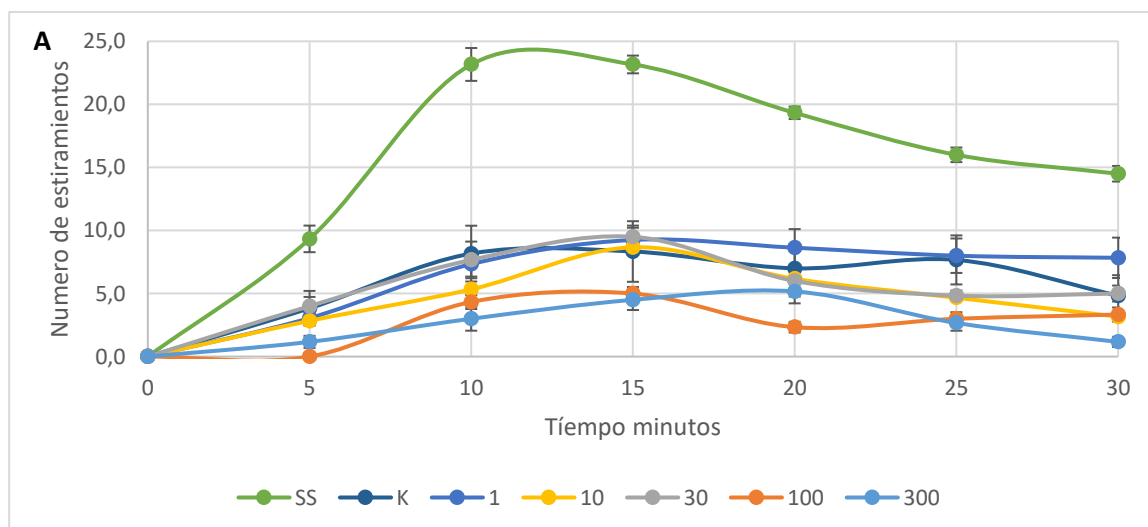


Figura 24. Porcentaje de antinocicepción del amarisolide en las dosis evaluadas.

6.7.4 Evaluación farmacológica del extracto de metanol

En la figura de los cursos temporales (**figura 25 A**) se observa que el extracto de metanol en las dosis de 1-300 mg/kg reducen significativamente la conducta nociceptiva con respecto al vehículo. En los estiramientos totales (**figura 25 B**) se aprecia que la disminución del comportamiento nociceptivo no es dosis dependiente, pero significativo a partir de 1 mg/kg.



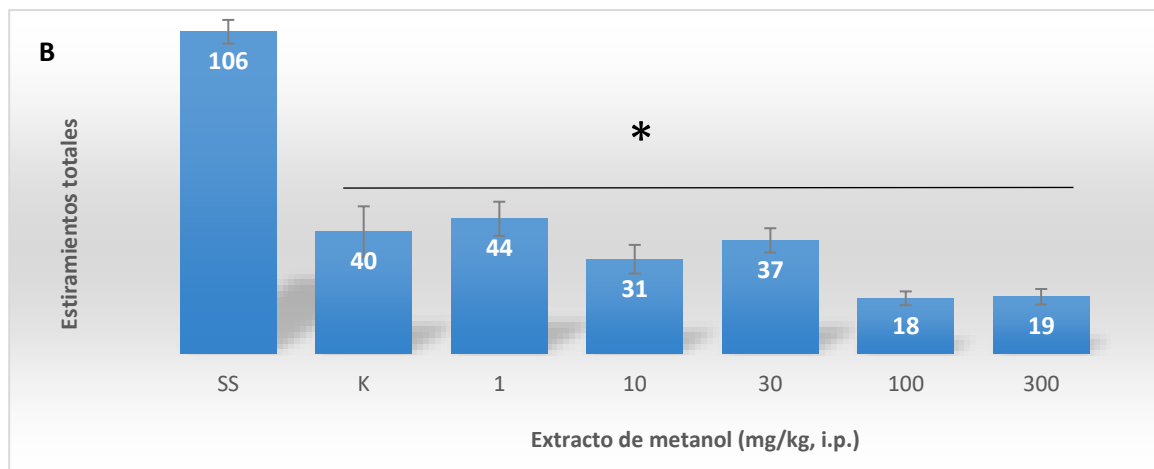


Figura 25. Efecto antinociceptivo del extracto de metanol de *S. circinata*: curso temporal (A), estiramientos totales (B). K= ketorolaco (1 mg/kg, i.p., fármaco de referencia antinociceptiva). Las barras representan la media \pm el error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas $p < 0.05$ con respecto al vehículo, ANADEVa seguida de la prueba de Dunnett.

La inhibición de la nocicepción de las dosis de 1-30 mg/kg muestra un comportamiento similar al ketorolaco. Las dosis de 100 y 300 mg/kg tienen una disminución mayor de la conducta nociceptiva 86.03 y 82.68 % respectivamente con respecto al grupo que recibió el vehículo (**Figura 26**).

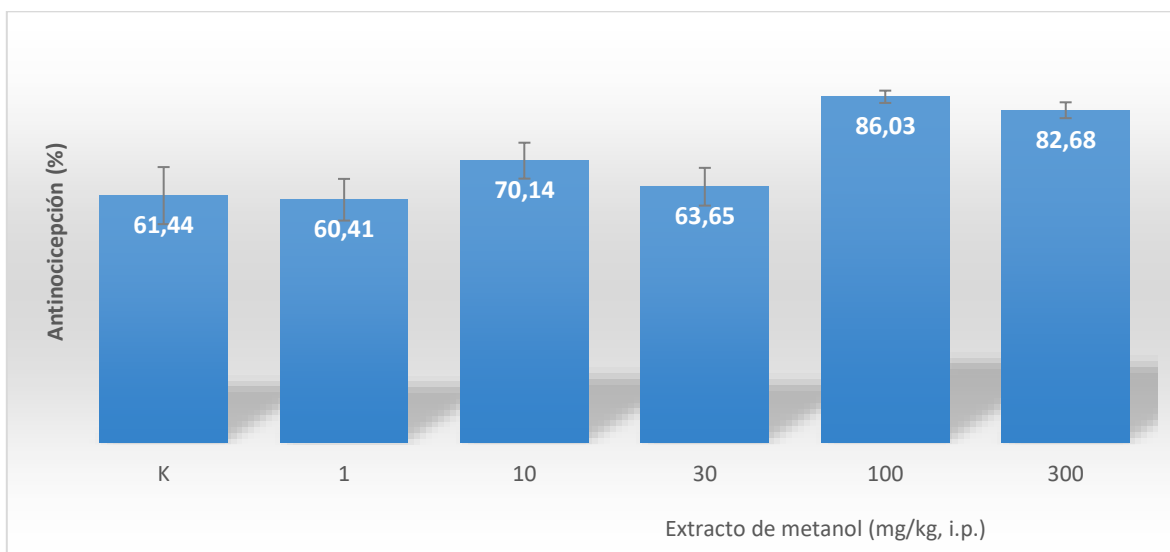


Figura 26. Porcentaje de antinocicepción del extracto de metanol en las dosis evaluadas, K = ketorolaco (1 mg/kg)

6.7.5 Evaluación farmacológica de la pedalitina

El flavonoide pedalitina fue evaluado en el modelo de estiramiento abdominal en dosis de 1, 5 y 10 mg/kg, utilizando al Ketorolaco a 1 mg/kg como fármaco de referencia. La **Figura 27 A** muestra los cursos temporales de las dosis evaluadas donde es posible observar un comportamiento similar al fármaco de referencia. En la **Figura 27 B** se observan los estiramientos totales de las dosis evaluadas, es posible apreciar que la dosis de 10 mg/kg fue la que redujo más el número de estiramientos, así mismo y después de realizar la prueba estadística correspondiente, se comprobó que todas las dosis son significativamente diferentes al grupo control.

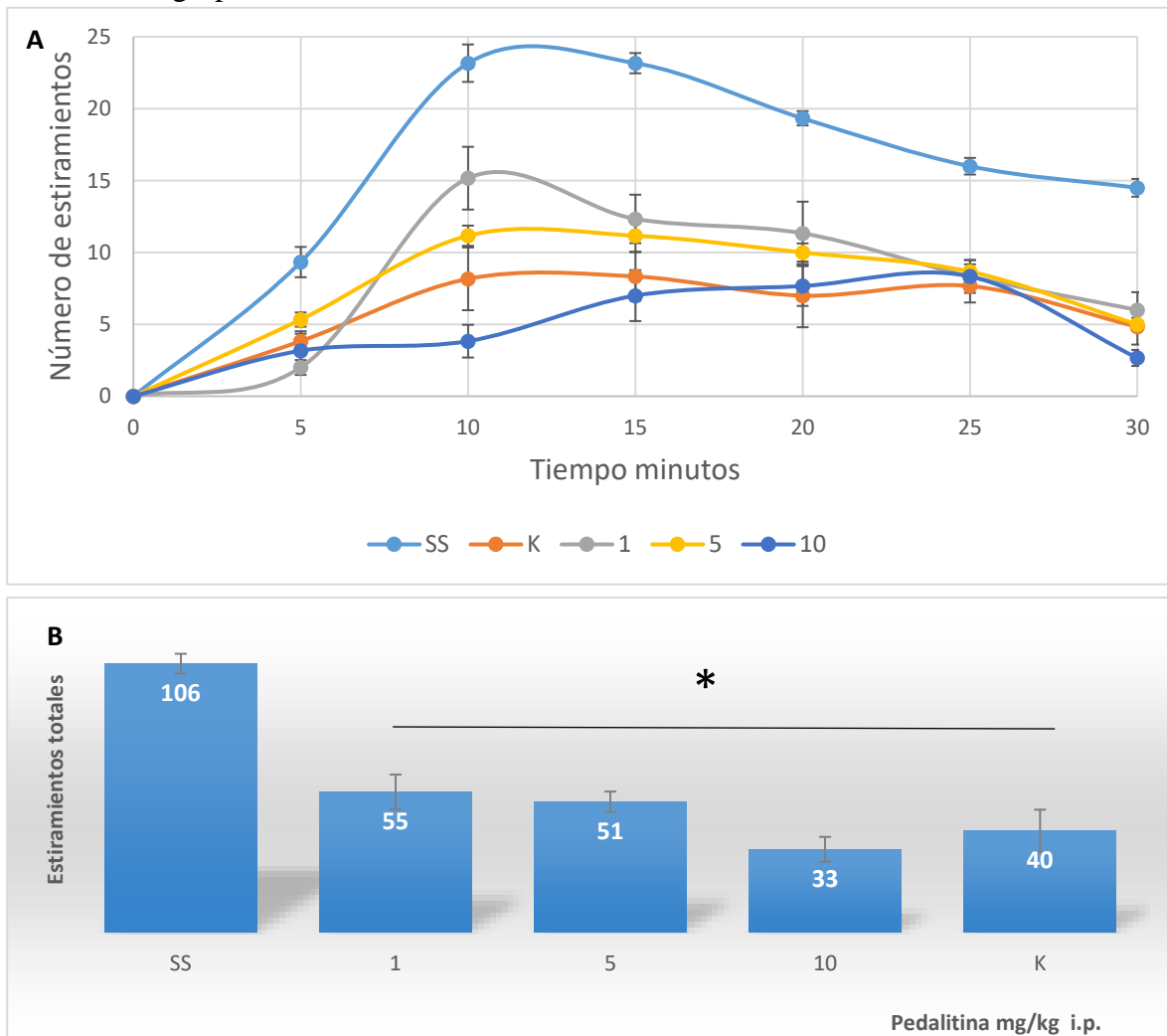


Figura 27. Efecto antinociceptivo de la pedalitina de *S. circinata*: curso temporal (A), estiramientos totales (B). K= ketorolaco (1 mg/kg, i.p., fármaco de referencia antinociceptiva). Las barras representan la media \pm el error estándar de seis animales. Los asteriscos indican diferencias significativas $p < 0.05$ con respecto al vehículo, ANADEVa seguida de la prueba de Dunnett

La inhibición de la nocicepción en la dosis de 1 mg/kg disminuyó 51.96%, la dosis de 5 mg/kg en 49.11 %, la dosis de 10 mg/ml disminuyó 67.78% los estiramientos en los ratones **figura 28**.

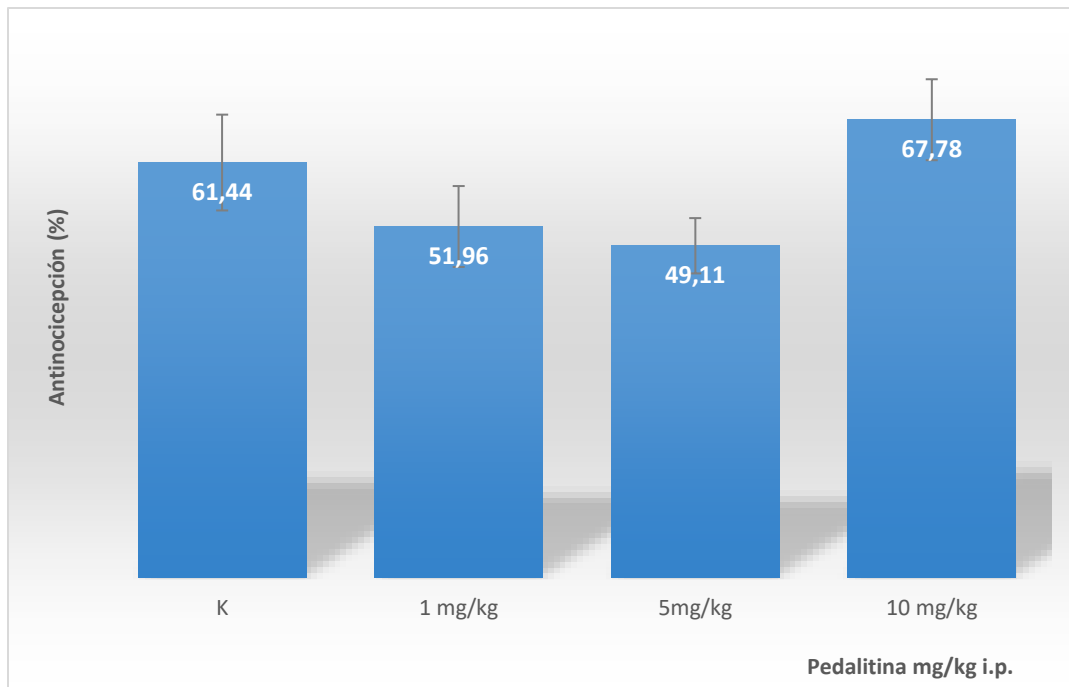


Figura 28. Porcentaje de antinocicepción de la pedalitina en las dosis evaluadas.

6.7.6 Evaluación farmacológica del extracto acuoso

En la figura de los cursos temporales se observa que las dosis de 10-300 mg/kg reducen la conducta nociceptiva con un comportamiento similar al ketorolaco, la mayor cantidad de estiramientos es entre los 5 y 10 minutos, después de este tiempo y a lo largo de la prueba los estiramientos disminuyen tanto en la dosis de 1 mg/kg y el grupo que recibió el vehículo (**Figura 29 A**). Por otro lado, se observa una disminución significativa en los estiramientos totales en las dosis 10-300 mg/kg (**Figura 29 B**).

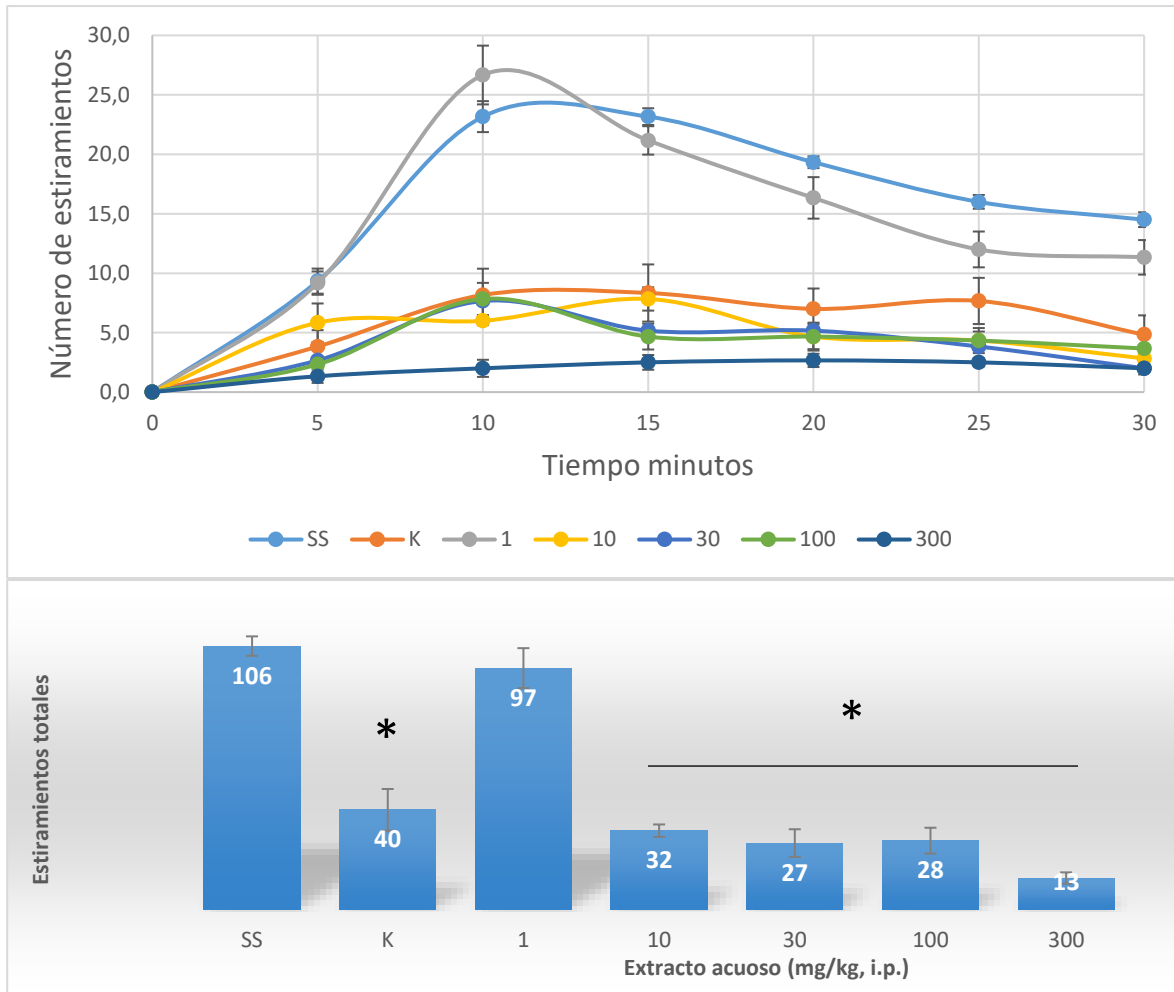


Figura 29. Efecto antinociceptivo del extracto acuoso de etilo de *S. circinata*: curso temporal (A), estiramientos totales (B). K= ketorolaco (1 mg/kg, i.p., fármaco de referencia antinociceptiva). Las barras representan la media \pm el error estándar, Los asteriscos indican diferencias significativas $p < 0.05$ con respecto al vehículo, ANADEVa seguida de la prueba de Dunnett.

La inhibición de la nocicepción en la dosis de 10 mg/ml disminuyó 64.29 %, la dosis de 30 mg/kg en 73.63 %, la dosis de 100 mg/ml disminuyó 74.06 % y la de 300 mg/kg en 87.88 %, los estiramientos en los ratones (**Figura 30**).

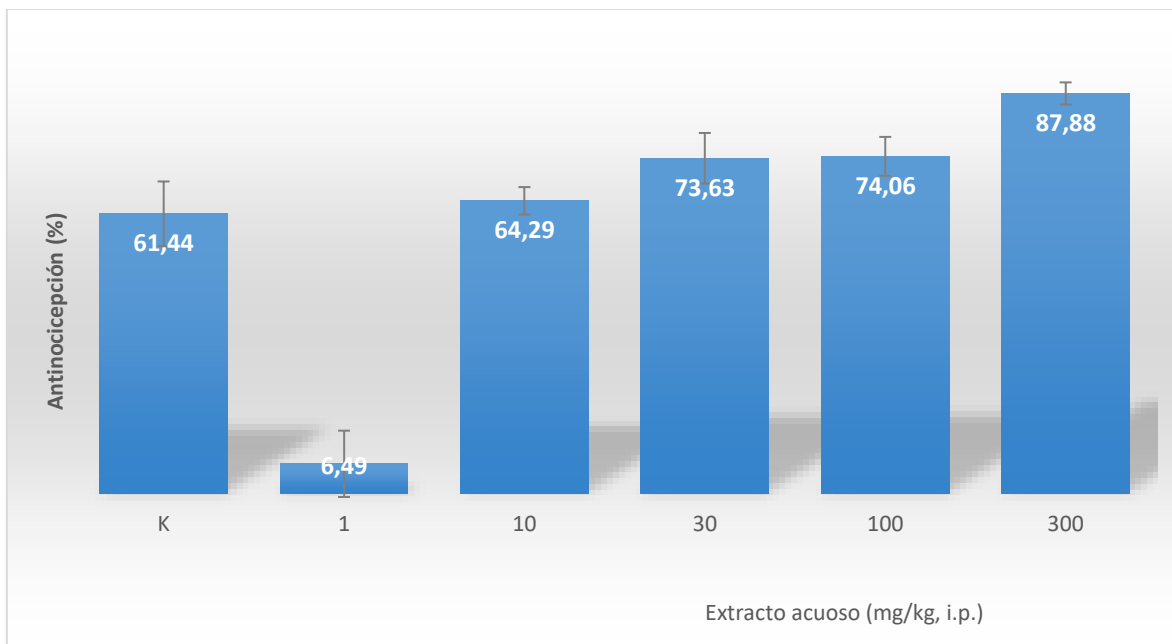


Figura 30. Porcentaje antinocicepción del extracto acuoso en las dosis evaluadas.

7. DETERMINACIÓN DEL MARGEN DE SEGURIDAD

No se observó mortalidad en ninguno de los extractos en la dosis de 2000 mg/kg. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los ratones administrados con solución salina y los que se administraron con los extractos de metanol y acuoso (**Figura 31**).

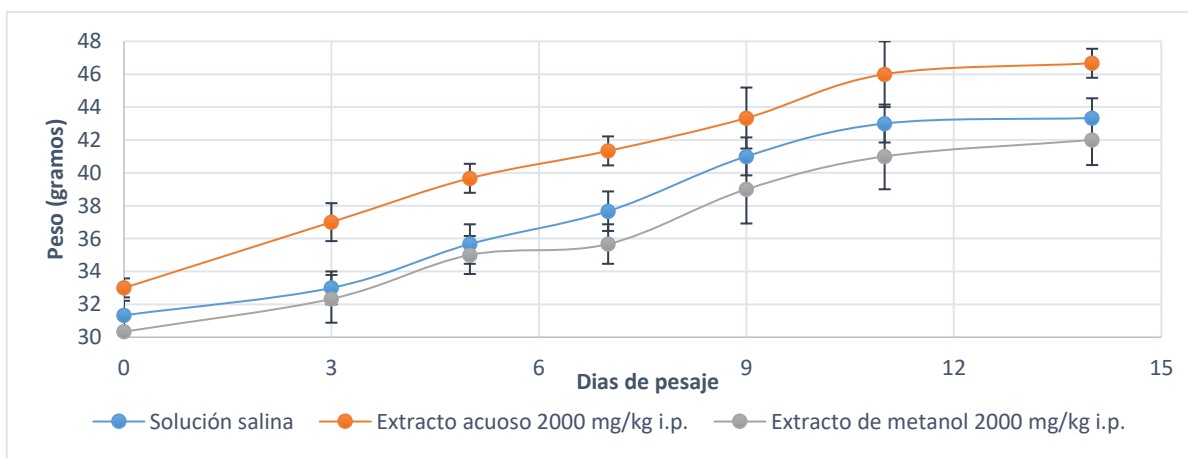


Figura 31. Curso temporal de la ganancia de peso de los grupos tratados contra un grupo control

8. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos del efecto antinociceptivo de *S. circinata* muestran que todos los extractos evaluados disminuyen significativamente el número de estiramientos totales en los ratones en dosis de 1-300 mg/kg, con excepción del extracto acuoso, el cual tuvo actividad a partir de las dosis de 10 mg/kg. También se observa que las dosis de 100 y 300 mg/kg, reducen en mayor medida la conducta nociceptiva. Dicha actividad está estrechamente relacionada con la síntesis productos activos aquí identificados (terpenoides y compuestos fenólicos).

Actividad antinociceptiva de los extractos orgánicos y acuoso

El extracto de hexano y de acetato de etilo tienen un comportamiento similar en la actividad antinociceptiva sobre los ratones, pues ambos disminuyen la conducta nociceptiva de manera que se muestra un efecto techo, es decir, llega un momento que, aunque se aumente la dosis no aumenta el alivio del dolor (analgesia). La relación farmacológica del extracto no polar y medianamente polar se debe a la similitud en su composición química, pues en los dos extractos coincide la presencia de los terpenos: α -amirina, β -sitosterol, ácido ursólico, ácido oleanólico, amarisolide y carnosol. El trabajo de Meira Quintão *et al.* (2014) y Medeiros *et al.* (2007), describe el efecto antinociceptivo de la α -amirina mediante la inhibición de la enzima COX-2 y la disminución de citosinas pro inflamatorias. En este mismo sentido, se menciona a la mezcla de α y β - amirinas con actividad antinociceptiva con participación del sistema opioide (Holanda Pinto *et al.*, 2008). Por otro lado, Medeiros *et al.* (2007) proponen que el mecanismo de acción de la α -amirina es la inhibición de la COX-2, así como la inhibición de la síntesis de mediadores pro inflamatorios, sin embargo y a diferencia de los resultados obtenidos en la presente investigación, los investigadores arriba mencionados definen a la eficacia de este compuesto como dosis dependiente; los cursos temporales obtenidos de las evaluaciones farmacológicas del extracto de hexano no muestran dicho comportamiento en las dosis evaluadas.

El ácido ursólico fue el metabolito con mayor presencia del que se ha descrito produce actividad antinociceptiva, existen varios mecanismos de acción propuestos, entre ellos como un inhibidor de la enzima pro-inflamatoria sPLA2 (secretory phospholipase A 2) (Nataraj *et*

al., 2007), la cual hidroliza a los fosfolípidos que posteriormente serán mediadores inflamatorios. El grupo de Lu *et al.* (2010) mostró evidencias de que el ácido ursólico suprime la expresión de las COX-2 así como las interleucinas IL-1 β , IL-6 y el factor de necrosis tumoral - α . El grupo de Verano *et al.* (2013) determinó que el ácido ursólico es un mediador de la antinocicepción visceral. Este grupo mostró una relación directa entre el ácido ursólico y la cGMP la cual inhibe la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje de larga duración (L-type calcium channel), así dicho estudio demostró también que el ácido ursólico inhibe el efecto de los receptores 5-HT_{1A} generando efecto antinociceptivo.

En el extracto de metanol el terpeno más abundante fue el amarisolide, a su vez tras el fraccionamiento de este extracto se obtuvo a la pedalitina como el flavonoide más abundante en el extracto. La obtención de ambos compuestos concuerda con el trabajo publicado por Maldonado *et al.* (1996) quienes anteriormente lograron su elucidación estructural. Fernandes *et al.* (2008) demuestran que este flavonoide actúa como inhibidor de la mieloperoxidasa y como atrapador de radicales libres haciéndolo un compuesto de interés para el desarrollo de nuevos medicamentos antiinflamatorios.

Los resultados de esta investigación muestran que la dosis de pedalitina más eficaz para disminuir la conducta de nocicepción fue la de 10 mg/kg con 67.78% de disminución en los estiramientos. Para la rutina hay evidencias de que se une a la COX-2 y a receptores opioides de modo que el grupo de Selvaraj *et al.* (2014) postulan que la rutina inhibe el dolor visceral con mecanismos de inhibición periférico y centrales.

La presencia del ácido clorogénico y el ácido caféico es común en especies del género *Salvia* como demuestra el trabajo de análisis e identificación de varias especies de este género conducido por Orhan *et al.* (2012), donde además se les atribuyen propiedades antioxidantes e inhibidoras de la lipooxigenasa impidiendo así la formación de leucotrienos.

El extracto de metanol de *S. circinata* mostró una franca disminución de la conducta de nocicepción visceral, todas las dosis evaluadas fueron significativamente distintas al grupo control, cabe puntualizar que las dosis de 100 y 300 mg/kg fueron las que redujeron en mayor grado esta conducta con inhibición de 86.06 y 82.68 % respectivamente, no obstante, es claro que el comportamiento de este extracto no es dosis dependiente. Rodrigues *et al.* (2012) reportan que el extracto polar de *Salvia officinalis* L. inhibe de manera importante la

nocicepción y la inflamación en la prueba de estiramiento abdominal. El grupo de Ustun y Sezik, (2011) obtuvo promedios de estiramiento de 20.05 ± 4.27 con el extracto polar de *Salvia wiedemannii* Boiss., a una dosis de 500 mg/ kg, mientras que para *S. circinata* se obtuvieron en promedio 18 ± 2.3 , en la dosis de 100 mg/kg; un caso similar es el reportado por el grupo de Peng *et al.* (2010), quienes trabajaron con *Salvia plebeia* R. Br., donde reportan haber logrado una inhibición de 67.2 % con una dosis de 50.4 g/kg, dosis muy superior a la máxima utilizada en este estudio, la cual fue de 300 mg/kg en donde se obtuvo una inhibición de 82.68%. El contraste con las dosis utilizadas en los estudios antes mencionados hace suponer que los componentes del extracto de metanol de *S. circinata* tienen propiedades antinociceptivas que deben ser estudiadas más a fondo y es probable diferenciar entre sus constituyentes activos.

Finalmente, en el extracto acuoso se identificaron en su gran mayoría los terpenos, ácidos fenólicos y flavonoides previamente presentes en los demás extractos, sin alterar de manera significativa los resultados obtenidos en la actividad farmacológica. El extracto mostró efecto antinociceptivo en las dosis de 10, 30, 100 y 300 mg/kg. Todas las dosis presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control, para este extracto las dosis de 100 y 300 redujeron la conducta nociceptiva en 74.06 y 87.88 %, respectivamente, una reducción tan marcada como la observada en la dosis de 300 mg/kg hace suponer que los compuestos de carácter más polar deben unirse de una manera más eficiente a los sitios de acción responsables en la inhibición de la conducta dolorosa además de que estos sitios de acción deben ser de naturalezas variadas, por tanto las propiedades antinociceptivas del extracto son ejercidas tanto a nivel periférico como central y al sumarse los efectos en ambos sistemas se observa una disminución mayor de los estiramientos abdominales. Así lo confirma el estudio realizado por Karami *et al.* (2013), quienes trabajaron con el extracto acuoso de *Salvia hypoleuca* Benth., donde la inhibición de la nocicepción para la dosis de 190 mg/kg es comparable a la producida por la morfina a 30 mg/kg, esta inhibición fue contrarrestada en parte al administrar naloxona a 5 mg/kg, de esta manera se postula que la antinocicepción de *Salvia hypoleuca* está dada en parte a un mecanismo de acción donde está involucrado el sistema opioide. El grupo de Qnais *et al.* (2010) trabajó con el extracto acuoso de *Salvia officinalis* para la prueba de plancha caliente con fin de medir la nocicepción aguda y la prueba de formalina para analizar la nocicepción aguda y sub aguda. Sus resultados muestran

aumento significativo en la latencia a la lamida, estos incrementos en las latencias fueron disminuidos tras la administración del antagonista opioide naloxona 5 mg/kg, este estudio concluye que el extracto acuoso de *Salvia officinalis* posee mecanismos de inhibición de la nocicepción en el SNC. No obstante los resultados antes discutidos el grupo de Akkol *et al.* (2008) quienes trabajaron con *Salvia halophila* Hedge y *Salvia virgata* Jacq., en modelos de antinocicepción visceral, no encontraron diferencias significativas con respecto a los estiramientos del grupo control, el cual tuvo un promedio de 46.9 ± 4.7 y promedio de 53.7 ± 5.7 y 49.6 ± 5.1 para los extractos acuosos de las Salvias analizadas. Tomando en cuenta los resultados obtenidos en la presente investigación, así como los de otros grupos de estudio se hace evidente la necesidad de estudios del extracto acuoso de *S. circinata* los cuales tengan como fin la elucidación de los mecanismos de acción en cuanto a la inhibición de la nocicepción tanto central como periférica.

Efecto antinociceptivo de los compuestos aislados

El amarisolide fue el terpeno más abundante en el extracto de acetato de etilo y metanol. Este es un compuesto con actividades antinociceptivas interesantes ya que actúa desde la dosis de 1 mg/kg e inhibe la respuesta de nocicepción visceral en un 53.39% colocándolo como un terpeno de interés para futuras investigaciones, con estos datos puede suponerse que su contribución a la inhibición de la nocicepción es una de las más importantes para estos dos extractos.

El estudio realizado por el grupo de Rodríguez *et al.* (2008) donde se evaluó la actividad inhibitoria de las enzimas elastasa y mieloperoxidasa en un modelo de inflamación murina, este grupo reporta que el amarisolide posee actividad antiinflamatoria a dosis de 100 μ M, donde inhibió la actividad de estas enzimas en 22 ± 4 % y 16 ± 5 %, respectivamente, sin embargo esta inhibición es modesta al ser comparada con el fármaco de referencia indometacina el cual inhibió 54 ± 11 % a la elastasa y 60 ± 18 %, a la mielo peroxidasa. Esto es contrastante con los resultados obtenidos en la presente investigación, donde la dosis de 10 mg/kg disminuyó la conducta de nocicepción en 53.39 %, en la dosis de 1 mg/kg la dosis de 10 mg/kg redujo la conducta nociceptiva 49.35 %, mostrando un efecto techo, por lo que se supone que este terpeno posee más de un mecanismo de acción, sin embargo, se requieren estudios farmacológicos para dar sustento a esta hipótesis.

El flavonoide pedalitina inhibió la respuesta nociceptiva en un 51.96 %, cuando fue administrado en la dosis de 1 mg/kg, y un 67.78% en la dosis de 10 mg/kg, estos resultados muestran que la pedalitina es un compuesto con posible potencial farmacológico como antinociceptivo. Los estudios que se han realizado acerca de este compuesto se han enfocado en sus propiedades antioxidante, tal es el caso del artículo publicado por Masuoka *et al.* (2006), donde se evalúa a la pedalitina en un modelo de inactivación de especies reactivas del oxígeno *in vitro*, este grupo determinó que la pedalitina actúa como inactivado del anión superóxido, inhibidor de la xantin-oxidasa y quelador de iones metálicos divalentes. Se ha reportado también a la pedalitina como un citotóxico de interés, el grupo de Lin *et al.* (2012), reporta que la pedalitina tiene una moderada actividad citotóxica.

Tanto los extractos como los compuestos aislados, presentan un efecto techo, lo cual se debe posiblemente a las múltiples interacciones químicas entre compuestos del extracto, así como, a que alguno de los metabolitos que intervienen en la inhibición de la nocicepción tenga un ligando, el cual es saturable.

Tomando en cuenta que tanto el amarisolide como la pedalitina son el terpeno y el flavonoide en el extracto de metanol, es posible proponerlos como los metabolitos que mayormente bloquean la transducción de las señales nociceptivas; no obstante, se requieren estudios pertinentes para esclarecer los mecanismos de acción de ambas moléculas.

Finalmente, los resultados de las pruebas del margen de seguridad, o toxicidad aguda mostraron que no existen efectos tóxicos agudos al administrar los extractos de metanol y acuoso de *S. circinata* en dosis de 2000 mg/kg, la cual es la dosis mayor recomendada por la OCDE (2002), y por tanto entran en la categoría 5 del Sistema mundialmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos. Estos resultados son parecidos a los obtenidos por Rodrigues *et al.* (2012), quienes determinaron una DL₅₀ de 44.75 g/kg, cifra casi veinte veces mayor a la evaluada en la presente investigación. El estudio de antinocicepción y anti inflamación llevado a cabo por Hosseinzadeh *et al.* (2003) con *Salvia leriifolia* Benth., determinó una DL₅₀ de 19.5 g/kg. Los resultados anteriormente presentados ponen de manifiesto la poca toxicidad de *Salvia circinata*, cuando es administrada de manera aguda.

9. CONCLUSIONES

- Esta investigación da evidencia científica para el uso de *Salvia circinata* en el dolor abdominal como se menciona en la medicina tradicional de Santiago Huaucilla Oaxaca.
- Este trabajo se describe por primera vez el efecto antinociceptivo del amarisolide (1mg/kg) y la pedalitina (10 mg/kg). Donde amarisolide es el terpeno principal en los extractos de acetato de etilo, metanol y acuoso; y la pedalitina es el flavonoide mayoritario en el extracto de metanol en *S. circinata*,

10. REFERENCIAS

- Adewusi, E.A., Moodley, N., Steenkamp, V., 2011. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activity of selected southern African medicinal plants. *South African J. Bot.* 77, 638–644.
- Akkol, E.K., Göger, F., Koşar, M., Başer, K.H.C., 2008. Phenolic composition and biological activities of *Salvia halophila* and *Salvia virgata* from Turkey. *Food Chem.* 108, 942–9.
- Al-Yousuf, M., Bashir, A., Ali, B., Tanira, M.O., Blunden, G., 2002. Some effects of *Salvia aegyptiaca* L. on the central nervous system in mice. *J. Ethnopharmacol.* 81, 121–127.
- Ambavade, S., Misar, A., Ambavade, P., 2014. Pharmacological, nutritional, and analytical aspects of β -sitosterol: a review. *Orient. Pharm. Exp. Med.* 14, 193.
- Augustin, J.M., Kuzina, V., Andersen, S.B., Bak, S., 2011. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry* 72, 435–57.
- Bauer, J., Kuehnl, S., Rollinger, J.M., Scherer, O., Northoff, H., Stuppner, H., Werz, O., Koeberle, A., 2012. Carnosol and carnosic acids from *Salvia officinalis* inhibit microsomal prostaglandin E2 synthase-1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 342, 169–76.
- Bautista, E., Fragoso-Serrano, M., Toscano, R. a, García-Peña, M.D.R., Ortega, A., 2015. Teotihuacanin, a diterpene with an unusual spiro-10/6 System from *Salvia amarissima* with Potent modulatory activity of multidrug resistance in cancer cells. *Org. Lett.* 9, 76–78.
- Bautista, E., Toscano, R.A., Ortega, A., 2013. Microphyllandioliolide, a new diterpene with an unprecedented skeleton from *Salvia microphylla*. *Org. Lett.* 15, 3210–3213.
- Bautista Redonda, Francisco Elihu., 2012. Elucidación estructural y evaluación de la actividad biológica de diterpenos tipo neo-clerodano aislados de *Salvia Herbacea*, *S. shannoni* Y *S. microphylla*. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Bernardes de Andrade Carli, C., Quilles, M.B., Carlos, I.Z., 2013. Natural products with activity against multidrug-resistant tumor cells, in: fighting multidrug resistance with herbal extracts, essential oils and their components. Sao Paulo State University, Faculdade de Ciências Farmaceuticas, Sao Paulo, Brasil, pp. 237–244.
- Besson, J., 1999. The neurobiology of pain. *Lancet* 353, 1610–1615.
- Brahmkshatriya, P.P., Brahmkshatriya, P.S., 2013. Terpenes: chemistry, biological role, and therapeutic applications, in: Ramawat, G.K., Mérillon, J.-M. (Eds.), *Natural Products*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 2665–2691.
- Brandão, M.S., Pereira, S.S., Lima, D.F., Oliveira, J.P.C., Ferreira, E.L.F., Chaves, M.H., Almeida, F.R.C., 2013. Antinociceptive effect of *Lecythis pisonis* Camb. (Lecythidaceae) in models of acute pain in mice. *J. Ethnopharmacol.* 146, 180–6.
- Burian, M., Geisslinger, G., 2005. COX-dependent mechanisms involved in the

- antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. *Pharmacol. Ther.* 107, 139–54.
- Bustos-Brito, C. 2011. estudio biodirigido de los componentes antiinflamatorios de *Salvia thymoides* Benth. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Burke, A., Smyth, E. and Fitzgerald, G. (2016). Agentes analgésicos-antipiréticos y antiinflamatorios; farmacoterapia de la gota. en: Goodman and Gilman., *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, 11th ed. Laurence L. Brunton, pp.673-680.
- Cabrera Nava, V.M., 2013. Evaluación del grado de satisfacción de los pacientes operados en la Unidad de Terapia Quirúrgica del Hospital General de México, con respecto al tratamiento del dolor postoperatorio agudo. Especialidad. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 36.
- Calzada, F., Bautista, E., Yépez-Mulia, L., García-Hernandez, N., 2015. Antiamoebic and anti-giardial activity of clerodane diterpenes from mexican *Salvia* species used for the treatment of diarrhea. *Phyther. Res.* 29, 1600–1604 5p.
- Cashman, J.N., 1996. The mechanisms of action of NSAIDs in analgesia. *Drugs* 52 Suppl 5, 13–23.
- Caterina, M.J., Julius, D., 1999. Sense and specificity: a molecular identity for nociceptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 525–30.
- Cavanilles, A.J. (Joseph), 1797. *Salvia circinata*, Icones et Descriptiones Plantarum. Typographia regia, Madrid.
- Collier, H.O., Dinneen, L.C., Johnson, C. a, Schneider, C., 1968. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 32, 295–310.
- Cornejo-Tenorio, G., Ibarra-Manríquez, G., 2011. Diversidad y distribución del género *Salvia* (Lamiaceae) en Michoacán, México. *Rev. Mex. Biodivers.* 82, 1279–1296.
- Covarrubias-Gómez, A., Guevara-López, U., De Lille-Fuentes, R., Ayón-Villanueva, H., Gaspar-Carrillo, S.P., Nuche-Cabrera, E., Martínez-Guerrero, N.O., Genis-Rondero, M.A., 2014. Primera cumbre nacional de delegados de la Asociación Mexicana para el Estudio y Tratamiento del Dolor. (Spanish). *Rev. Mex. Anestesiología.* 37, 142–147.
- Covarrubias-Gómez, A., Guevara-López, U., Gutiérrez-Salmerón, C., Betancourt-Sandoval, J.A., Córdova-Domínguez, J.A., 2010. Epidemiología del dolor crónico en México. *Rev. Mex. Anestesiología.* 33, 207–213.
- D’Mello, R., Dickenson, A.H., 2008. Spinal cord mechanisms of pain. *Br. J. Anaesth.* 101, 8–16.
- del Arco, J., 2015. Curso básico sobre dolor. Tema 1. Fisiopatología, clasificación y tratamiento farmacológico. *Farm. Prof.* 29, 36–43.
- Domínguez-Vázquez, G., Castro-Ramírez, A., 2002. Usos medicinales de la familia Labiatae en Chiapas, México. *Etnobiología* 2, 19–31.

- Epling, C., Beihefte., R. 1940. A revision of *Salvia*, subgenus Calosphace. Repertorium specierum novarum regni vegetabilis. Hrsg. Von Friedrich Fedde. Beihefte.bd.
- Esquivel, B., Flores, M., Hernández-Ortega, S., Toscano, R.A., Ramamoorthy, T.P., 1995. Abietane and icetexane diterpenoids from the roots of *Salvia aspera*. *Phytochemistry* 39, 139–143.
- Fernandes, D.C., Regasini, L.O., Velloso, J.C.R., Pauletti, P.M., Castro-gamboa, I., Bolzani, V.S., Oliveira, O.M.M., Silva, D.H.S., 2008. Myeloperoxidase inhibitory and radical scavenging activities of flavones from *Pterogyne nitens*. *Chem. Pharm. Bull.* 56, 723–726.
- Fiore, G., Nencini, C., Cavallo, F., Capasso, A., Bader, A., Giorgi, G., Micheli, L., 2006. *In vitro* antiproliferative effect of six *Salvia* species on human tumor cell lines. *Phyther. Res.* 20, 701–703.
- Gheno-Heredia, Y.A., Nava-Bernal, G., Martínez-Campos, Á.R., Sánchez-Vera, E., 2011. Las plantas medicinales de la organización de parteras y médicos indígenas tradicionales de Ixhuatlancillo, Veracruz, México y su significancia cultural. *Polibotánica* 199–251.
- Gómez-Guzmán, M., Jiménez, R., Sánchez, M., Romero, M., O'Valle, F., Lopez-Sepulveda, R., Quintela, A.M., Galindo, P., Zarzuelo, M.J., Bailón, E., Delpón, E., Perez-Vizcaino, F., Duarte, J., 2011. Chronic (-)-epicatechin improves vascular oxidative and inflammatory status but not hypertension in chronic nitric oxide-deficient rats. *Br. J. Nutr.* 106, 1337–48.
- Gonzalez, A.G., Abad, T., Jimenes, I.A., Ravelo, A.G., Luis, J.G., Aguiar, Z., S, L.S.A.N.A., Plasencia, M., Herrera, J.R., Moujir, L., 1989. A first study of antibacterial activity of diterpenes isolated from some *Salvia* Species (Lamiaceae) 17, 293–296. *Biochem. Syst. Ecol.* 17, 293–296
- González-Cortazar, M., Maldonado-Abarca, A.M., Jiménez-Ferrer, E., Marquina, S., Ventura-Zapata, E., Zamilpa, A., Tortoriello, J., Herrera-Ruiz, M., 2013. Isosakuranetin-5-O-rutinoside: a new flavanone with antidepressant activity isolated from *Salvia elegans* Vahl. *Molecules* 18, 13260–70.
- González-Gallegos, J.G., Aguilar-Santelises, R., 2014. *Salvia tilantongensis* (Lamiaceae), una especie nueva de la Mixteca Alta de Oaxaca, México. *Acta botánica Mex.* 01–22.
- Goodman & Gilman. 2011. las bases farmacológicas de la terapéutica. México: McGraw-Hill Interamericana.
- Hedrich, Hans J and Gillian R Bullock. 2012. *The Laboratory Mouse*. Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- Heinrich, M., Frei Haller, B., Leonti, M., 2014. A perspective on natural products research and ethnopharmacology in Mexico: the eagle and the serpent on the prickly pear cactus. *J. Nat. Prod.* 77, 678–89.
- Heleno, S.A., Martins, A., Queiroz, M.J.R.P., Ferreira, I.C.F.R., 2015. Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parent compounds: a review. *Food Chem.* 173, 501–

13.

- Holanda Pinto, S.A., Pinto, L.M.S., Guedes, M.A., Cunha, G.M.A., Chaves, M.H., Santos, F.A., Rao, V.S., 2008. Antinociceptive effect of triterpenoid alpha,beta-amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. *Phytomedicine* 15, 630–4.
- Hosseinzadeh, H., Haddadkhodaparast, M.H., Arash, A.R., 2003. Antinociceptive, antiinflammatory and acute toxicity effects of *Salvia leriifolia* Benth. seed extract in mice and rats. *Phytother. Res.* 17, 422–425.
- IASP Taxonomy - IASP. 2014. Iasp-Pain.Org. <http://www.iasp-pain.org/Taxonomy#Pain>.
- Instituto de Biología. 2010. "*Salvia amarissima* Ort. - IBUNAM:MEXU:Pvsn39400". UNIBIO: Colecciones Biológicas. <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PVsn39400>.
- Islas Gómez, E. 2013. Determinación del perfil de compuestos bioactivos fenólicos y triterpénicos pentacíclicos en *Salvias* mexicanas. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 93.0
- Jacquier, Carlos. 1997. El Dolor: aspectos básicos y clínicos. Santiago de Chile: Mediterráneo.
- Jassbi, A.R., Zare, S., Firuzi, O., Xiao, J., 2015. Bioactive phytochemicals from shoots and roots of *Salvia* species. *Phytochem. Rev.* 1–39.
- Jenks, A. a., Kim, S.C., 2013. Medicinal plant complexes of *Salvia* subgenus *Calosphace*: An ethnobotanical study of new world sages. *J. Ethnopharmacol.* 146, 214–224.
- Jenks, A. a., Walker, J.B., Kim, S.C., 2013. Phylogeny of New World *Salvia* subgenus *Calosphace* (Lamiaceae) based on cpDNA (psbA-trnH) and nrDNA (ITS) sequence data. *J. Plant Res.* 126, 483–496.
- Jett, M.F., Ramesha, C.S., Brown, C.D., Chiu, S., Emmett, C., Voronin, T., Sun, T., O'Yang, C., Hunter, J.C., Eglen, R.M., Johnson, R.M., 1999. Characterization of the analgesic and anti-inflammatory activities of ketorolac and its enantiomers in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288, 1288–1297.
- Kinghorn, A.D., 1997. Plant drug analysis. a thin layer chromatography atlas. Second Edition By H. Wagner and S. Bladt (Universität München). Photographs by V. Rickl. Springer-Verlag, Brooklyn, New York. 1996. 384 pp.
- Kintzios, S.E., 2000. Sage : the genus *Salvia*., Medicinal and aromatic plants industrial profiles: v. 14. Amsterdam : Overseas Publishers Association : Harwood Academic, c2000.
- KuKanich, B., Bidgood, T., Knesl, O., 2012. Clinical pharmacology of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in dogs. *Vet. Anaesth. Analg.* 39, 69–90.
- Lázaro-Ibáñez, G.G., Torres-López, J.E., Granados-Soto, V., 2001. Participation of the nitric oxide-cyclic GMP-ATP-sensitive K⁺ channel pathway in the antinociceptive action of ketorolac. *Eur. J. Pharmacol.* 426, 39–44.

- Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S.W., 2001. Animal models of nociception. *Pharmacol. Rev.* 53, 597–652.
- Ley General de Salud, 2015. , Diario Oficial de la Federación.México. Secretaria de salud
- Lin, L., Gao, Q., Cui, C., Zhao, H., Fu, L., Chen, L., Yang, B., Luo, W., Zhao, M., 2012. Isolation and identification of ent-kaurane-type diterpenoids from *Rabdosia serra* Maxim. HARA leaf and their inhibitory activities against HepG-2, MCF-7, and HL-60 cell lines. *Food Chem.* 131, 1009–1014.
- Lins, N., Quintão, M., Rocha, L.W., Silva, G.F., Reichert, S., Claudino, V.D., Lucinda-silva, R.M., Malheiros, A., Souza, M.M. De, Filho, V.C., Bresolin, T.M.B., Machado, S., Wagner, T.M., Meyre-silva, C., 2014. Contribution of, α -amyrenone to the anti-inflammatory and antihypersensitivity effects of *Aleurites moluccana* (L.) Willd . 2014.
- Liu, H., Guo, X., Chu, Y., Lu, S., 2014. Heart protective effects and mechanism of quercetin preconditioning on anti-myocardial ischemia reperfusion (IR) injuries in rats. *Gene* 545, 149–55.
- Lu, J., Wu, D., Zheng, Y., Hu, B., Zhang, Z., Ye, Q., Liu, C., Shan, Q., Wang, Y., 2010. Ursolic acid attenuates D-galactose-induced inflammatory response in mouse prefrontal cortex through inhibiting AGEs/RAGE/NF- κ B pathway activation. *Cereb. Cortex* 20, 2540–8.
- Luis, J.G., Lahlou, E.H., Andrés, L.S., 1996. Hassananes: C23 terpenoids with a new type of skeleton from *Salvia apiana* Jeps. *Tetrahedron* 52, 12309–12312.
- M. Karami, M.A. Shamerani, S.H. Alemy, A.R. Gohari, S.E.V., 2013. Comparison antinociceptive activity of the aqueous methanolic extracts of *Salvia Hypoleuca* and *Phytolacca americana* in mice. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 17, 2755–2759.
- Maldonado, E., Cárdenas, J., Bojórquez, H., Escamilla, E.M., Ortega, A., 1996. Amarisolide, a neo-clerodane diterpene glycoside from *Salvia amarissima*. *Phytochemistry* 42, 1105–1108.
- Martínez, A.L., González-Trujano, M.E., Chávez, M., Pellicer, F., 2012. Antinociceptive effectiveness of triterpenes from rosemary in visceral nociception. *J. Ethnopharmacol.* 142, 28–34.
- Martínez-Gordillo, M., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M. del R., Montiel, O., 2013. Géneros de *Lamiaceae* de México, diversidad y endemismo. *Rev. Mex. Biodivers.* 84, 30–86.
- Martínez-vázquez, M., Miranda, P., Valencia, N.A., Torres, M.L., Miranda, R., Cárdenas, J., Salmón, M., Química, I., México, A. De, Universitaria, C., 1998. Antimicrobial diterpenes from *Salvia reptans*. 36, 77–80.
- Masuoka, N., Isobe, T., Kubo, I., 2006. Antioxidants from *Rabdosia japonica*. *Phyther. Res.* 20, 206–213.
- McCurdy, C.R., Sufka, K.J., Smith, G.H., Warnick, J.E., Nieto, M.J., 2006. Antinociceptive profile of salvinorin A, a structurally unique kappa opioid receptor agonist. *Pharmacol.*

Biochem. Behav. 83, 109–13.

- Medeiros, R., Otuki, M.F., Avellar, M.C.W., Calixto, J.B., 2007. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene alpha-amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Eur. J. Pharmacol.* 559, 227–35.
- Meira Quintão, N.L., Rocha, L.W., Franciele Silva, G., Reichert, S., Claudino, V.D., Lucinda-Silva, R.M., Malheiros, A., De Souza, M.M., Cechinel Filho, V., Bellé Bresolin, T.M., da Silva Machado, M., Marcel Wagner, T., Meyre-Silva, C., 2014. Contribution of α,β -amyrenone to the anti-inflammatory and antihypersensitivity effects of *Aleurites moluccana* (L.) Willd. *Biomed Res. Int.* 1–11.
- Moreno, C., Prada, Di.M., 2004. Fisiopatología del dolor clínico. *Asoc. Colomb. Neurol.* 13.
- Nabavi, S.F., Braidy, N., Gortzi, O., Sobarzo-Sanchez, E., Daglia, M., Skalicka-Woźniak, K., Nabavi, S.M., 2015. Luteolin as an anti-inflammatory and neuroprotective agent: A brief review. *Brain Res. Bull.* 119, 1–11.
- Nacgun, Dafny. 1997. "Pain Principles (Section 2, Chapter 6) Neuroscience Online: An electronic textbook for the neurosciences | Department Of Neurobiology And Anatomy - The University Of Texas Medical School At Houston". *Neuroscience.Uth.Tmc.Edu*. <http://neuroscience.uth.tmc.edu/s2/chapter06.html>.
- Nambo, A., 2015. *Etnobotánica de Santiago Huaucuililla, Oaxaca y evaluación farmacológica de zinnia peruviana*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Nataraj, A., Gowda, C.D.R., Vishwanath, R.R. and B.S., 2007. Group IIA Secretary PLA2 Inhibition by Ursolic Acid: A Potent Anti-Inflammatory Molecule. *Curr. Top. Med. Chem.* 7, 801-809.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- OCDE, O./, 2002a. Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 : Health Effects. OECD Publishing / Éditions OCDE.
- Ochoa Barajas, S.R., 2012. Acute abdominal pain: Approach to the primary care physician. *Med UNAB* 15(2), 113–122.
- Ong, C.K.S., Lirk, P., Tan, C.H., Seymour, R.A., 2007. An evidence-based update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Clin. Med. Res.* 5, 19–34.
- Orhan, I.E., Senol, F.S., Ercetin, T., Kahraman, A., Celep, F., Akaydin, G., Sener, B., Dogan, M., 2013. Assessment of anticholinesterase and antioxidant properties of selected sage (*Salvia*) species with their total phenol and flavonoid contents. *Ind. Crops Prod.* 41, 21–30.
- Orhan, I.E., Senol, F.S., Ozturk, N., Akaydin, G., Sener, B., 2012. Profiling of in vitro neurobiological effects and phenolic acids of selected endemic *Salvia* species. *Food*

Chem. 132, 1360–1367.

- Otuki, M.F., Ferreira, J., Lima, F. V, Meyre-silva, C., Muller, L. a, Cani, G.S., Santos, A.R.S., Yunes, R. a, 2005. Antinociceptive Properties of Mixture of α -Amyrin and β -Amyrin Triterpenes : Evidence for Participation of Protein Kinase C and Protein Kinase A Pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313, 310–318.
- Park, S.-H., Sim, Y.-B., Kang, Y.-J., Kim, S.-S., Kim, C.-H., Kim, S.-J., Suh, H.-W., 2013. Mechanisms involved in the antinociceptive effects of orally administered oleanolic acid in the mouse. *Arch. Pharm. Res.* 36, 905–11.
- Patrekar, P., Patrekar, P. V, Mali, S.S., Kashid, K., More, S., 2014. A overview: non-steroidal anti-inflammatory drugs and mechanisms. *Indian J. Pharm. Biol. Res.* 2, 94.
- Peng, M.-M., Fang, Y., Hu, W., Huang, Q., 2010. The pharmacological activities of compound *Salvia Plebeia* granules on treating urinary tract infection. *J. Ethnopharmacol.* 129, 59–63.
- Pérez-Gutiérrez, S., Zavala-Mendoza, D., Hernández-Munive, A., Mendoza-Martínez, Á., Pérez-González, C., Sánchez-Mendoza, E., 2013. Antidiarrheal activity of 19-deoxycetexone isolated from *Salvia ballotiflora* Benth in mice and rats. *Molecules.* 8, 8895-905.
- Poole, C.F., Poole, S.K., 1994. Instrumental thin-layer chromatography. *Anal. Chem.* 66, 27A–37A.
- Popović, Z., Matic, R., Bojović, S., Stefanović, M., Vidaković, V., 2016b. Ethnobotany and herbal medicine in modern complementary and alternative medicine: An overview of publications in the field of I&C medicine 2001-2013. *J. Ethnopharmacol.* 181, 182–92.
- Qnais, E.Y., Abu-Dieyeh, M., Abdulla, F.A., Abdalla, S.S., 2010. The antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Salvia officinalis* leaf aqueous and butanol extracts. *Pharm. Biol.* 48, 1149–1156.
- Ramamoorthy, T.P., Elliott, M., 1998. *Lamiaceae* de México: diversidad, distribución, endemismo y evolución. *Diversidad Biológica de México: Orígenes Y Distribución.* México D.F., pp. 501–526.
- Rodrigues, M.R.A., Kanazawa, L.K.S., das Neves, T.L.M., da Silva, C.F., Horst, H., Pizzolatti, M.G., Santos, A.R.S., Baggio, C.H., Werner, M.F. de P., 2012. Antinociceptive and anti-inflammatory potential of extract and isolated compounds from the leaves of *Salvia officinalis* in mice. *J. Ethnopharmacol.* 139, 519–26.
- Rodriguez, M., Vergel, N., Ospina, L., Calle, J., Pizón, R., 2008. Evaluación de actividades enzimáticas elastasa y mieloperoxidasa como marcadores de desgranulación leucocitaria en modelos de inflamación aguda. *Rev. Colomb. Ciencias Químico Farm.* 34, 35–45.
- Rodríguez-Hahn, L., Esquivel, B., Sánchez, C., Estebanes, L., Cárdenas, J., Soriano-García, M., Toscano, R., Ramamoorthy, T.P., 1989. Abietane type diterpenoids from *Salvia fruticulosa*. A revision of the structure of fruticulubin B. *Phytochemistry* 28, 567–570.

- Selvaraj, G., Kalamurthi, S., Thirungnasambandam, R., Vivekanandan, L., Balasubramanian, T., 2014. Anti-nociceptive effect in mice of thillai flavonoid rutin. *Biomed. Environ. Sci.* 27, 295–9.
- Song, Z., Li, X., 2015. Expression profiles of rosmarinic acid biosynthesis genes in two *Salvia miltiorrhiza* lines with differing water-soluble phenolic contents. *Ind. Crop. Prod.* 71, 24–30.
- Subbaramaiah, K., Cole, P. a, Dannenberg, A.J., 2002. Retinoids and carnosol suppress cyclooxygenase-2 transcription by CREB-binding protein/p300-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Res.* 62, 2522–30.
- Taddei-Bringas, G.A., Santillana-Macedo, M.A., Romero-Cancio, J.A., Romero-Téllez, M.B.,. Acceptance and use of medicinal plants in family medicine. *Salud pública de México* 41, 216–20.
- Topçu, G., 2006. Bioactive triterpenoids from *Salvia* species. *J. Nat. Prod.* 69, 482–7.
- Tropicos 2016. Name - *Salvia Amarissima* Ortega". Tropicos.Org. <http://www.tropicos.org/Name/17603503?tab=synonyms>.
- Ustun, O., Sezik, E., 2011. Analgesic Activity of *Salvia wiedemannii* Boiss. Used in Turkish Folk Medicine. *Rec. Nat. Prod.* 5, 328–331.
- Verano, J., González-Trujano, M.E., Déciga-Campos, M., Ventura-Martínez, R., Pellicer, F., 2013. Ursolic acid from *Agastache mexicana* aerial parts produces antinociceptive activity involving TRPV1 receptors, cGMP and a serotonergic synergism. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 110, 255–64.
- Willoughby, D.A., Moore, A.R., Colville-Nash, P.R., 2000. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet* 355, 646–648.
- Zar, J.H., 2010. *Biostatistical analysis*. Upper Saddle River, New Jersey : Prentice Hall, 2010.
- Zihlif, M., Afifi, F., Abu-Dahab, R., Abdul Majid, A.M.S., Somrain, H., Saleh, M.M., Nassar, Z.D., Naffa, R., 2013. The antiangiogenic activities of ethanolic crude extracts of four *Salvia* species. *BMC Complement. Altern. Med.* 13, 358.
- Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109–110.

