



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANALGÉSICA DE  
*Salvia involucrata* Y ANÁLISIS QUÍMICO DEL  
EXTRACTO ACTIVO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :**

**BIÓLOGA**

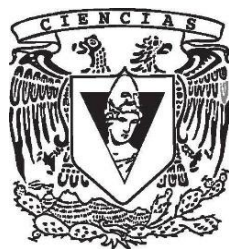
**P R E S E N T A :**

**ARACELI ANAYA ALVARADO**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DRA. EVA AGUIRRE HERNÁNDEZ**

**CIUDAD DE MÉXICO, 2022**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**

**Tesis Digitales**

**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**

**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## *Agradecimientos académicos*

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) DGAPA, UNAM por el financiamiento de los proyectos PAPIIT-IN218418 y IN221221 que permitieron la realización de la presente tesis.

A la Coordinación Nacional de Becas de Educación Superior (CNBES), en colaboración con la Universidad Nacional Autónoma de México, a través de la Dirección General de Cooperación e Internacionalización (DGEI) por el otorgamiento de la beca “Capacitación en métodos de investigación” número de folio: 8597369, misma que me permitió realizar una estancia de investigación en la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

## *Agradecimientos*

A mis padres, *Araceli* y *Damián*, por todo el amor y apoyo que me han brindado en todas las etapas de mi vida, porque sin ustedes yo no sería la persona que soy ahora. Todos mis logros, tanto académicos como personales se los dedico. Los amo.

A mis hermanos, *Francisco*, *Daniel* y *Mariana*, por ser mi inspiración y motivación para ser mejor cada día.

A mi abuelita, *Macrina* por creer siempre en mí, incluso cuando yo sentía que el mundo se me venía abajo, te recuerdo siempre con todo mi amor.

A mis amigos de la facultad, porque todos y cada uno de ustedes hicieron de esta etapa una de las más bonitas y memorables. Especialmente, agradezco a *Isaac*, *Bren*, *Ale*, *Cati*, *Fer Luis*, *Jon* y *Ric*, porque a su lado conocí el verdadero significado de amistad. Los quiero muchísimo, sigamos creciendo juntos.

Al profesor, *Wilson Cardona Galeano* de la Universidad de Antioquia, por acogerme en su grupo de investigación por tres meses para seguir enriqueciendo mi formación. Gracias por compartir conmigo un poco de su pasión por la fitoquímica.

A los integrantes del grupo “Química de Plantas Colombianas”, *Maly*, *Lau*, *Liz*, *Wil*, *Vane*, *David*, *Gus*, *Coa* e *Isa*, por acogerme como una más de ustedes desde el día uno de mi estancia académica. Conocerlos fue una de las cosas más bonitas que la universidad me dejó, les agradezco el apoyo brindado tanto dentro como fuera del lab.

A mi queridísima, *Nancy*, porque en cuestión de días se convirtió en una amiga muy especial y un apoyo incondicional para mí, gracias por todo el apoyo académico, motivacional, las mil risas y los momentos lindos compartidos.

A *Lizeth Zavala, Verónica Muñoz y Martha Martínez Gordillo* por ser parte fundamental durante mi formación y por toda su ayuda brindada durante la realización de mi tesis, las admiro mucho, me llevo sus grandes enseñanzas.

A *Agustín Carmona, Christian Cabello* y todos aquellos que conforman el equipo del bioterio de la facultad, pues gracias a su apoyo se pudieron llevar a cabo los ensayos farmacológicos del presente trabajo.

A mi tutora, *Eva Aguirre*, por ser un ejemplo a seguir, por ser la mejor asesora, por transmitirme su pasión a la ciencia. Muchas gracias por brindarme su completa confianza y apoyo desde el principio. Aprecio infinitamente todas sus enseñanzas, tanto en lo académico como en lo personal. Gracias por mostrarnos que los sueños se cumplen y que podemos lograr grandes cosas trabajando en equipo. Me siento muy afortunada de pertenecer a su laboratorio.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE CUADROS	viii
RESUMEN	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Medicina tradicional mexicana	3
2.2 Plantas medicinales	4
2.3 Generalidades de la familia Lamiaceae	6
2.4 Género <i>Salvia</i> en México	7
2.5 Etnobotánica del género <i>Salvia</i> en México	8
2.6 Fitoquímica del género <i>Salvia</i>	9
2.6.1 Metabolitos con acción biológica	14
2.7 <i>Salvia involucrata</i>	17
2.7.1 Fitoquímica de <i>Salvia involucrata</i>	19
2.8 Dolor	20
2.8.1 Nocicepción	20
2.8.2 Nociceptores	20
2.8.3 Clasificación del dolor	23
2.9 Dolor inflamatorio	24
2.10 Fármacos para tratar el dolor	25
2.11 Modelos animales para el estudio del dolor	26
2.11.1 Modelo de “Writhing”	27
2.11.2 Modelo de formalina	27
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. OBJETIVOS	29
4.1 Objetivo general	29
4.2 Objetivos particulares	29
5. HIPÓTESIS	30
6. MATERIALES Y MÉTODOS	31
6.1 Colecta de material vegetal	31
6.2 Preparación de los extractos a partir de la parte aérea de <i>Salvia involucrata</i>	31
6.3 Evaluación farmacológica	34
6.3.1 Sujetos de estudio	34
6.3.2 Preparación de extractos y fármacos de referencia	34
6.3.3 Determinación de la toxicidad oral aguda	35
6.3.4 Evaluación del efecto antinociceptivo de los extractos de <i>Salvia involucrata</i>	35
6.3.4.1 Modelo de estiramiento abdominal “Writhing”	36
6.3.4.2 Modelo de “Formalina”	36
6.4 Fitoquímica de <i>Salvia involucrata</i>	37

6.4.1	Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) del extracto de AcOEt de <i>Salvia involucrata</i>	37
6.4.2	Aislamiento de metabolitos secundarios de los extractos activos de <i>Salvia involucrata</i> mediante cromatografía en columna	38
6.4.3	Elucidación estructural de compuestos	44
6.4.4	Análisis estadístico	45
7.	Resultados	46
7.1	Rendimiento de los extractos	46
7.2	Determinación de la toxicidad oral aguda (DL50)	46
7.3	Evaluación del efecto antinociceptivo	47
7.3.1	Modelo de “Writhing”	47
7.3.2	Modelo de Formalina	48
7.3.3	Curvas dosis-respuesta del extracto de AcOEt	50
7.3.4	Curvas dosis-respuesta del extracto de MeOH	51
7.4	Análisis por CLAR del extracto de AcOEt de <i>Salvia involucrata</i> .	53
7.5	Elucidación estructural del compuesto aislado de la cromatografía en columna del extracto de AcOEt de <i>Salvia involucrata</i> .	54
7.6	Cromatografía en columna del extracto de MeOH de <i>Salvia involucrata</i>	57
8.	Discusión	58
9.	Conclusiones	62
10.	Referencias	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura química del isopreno (2-metil-1,3 butadieno)	9
2. Estructura química de terpenoides sintetizados por el género <i>Salvia</i>	11
3. Estructura química de fitoesteroides aislados del género <i>Salvia</i>	12
4. Estructura química del fenol	12
5. Estructura básica de un flavonoide	13
6. Estructura química de algunos ácidos fenólicos aislados del género <i>Salvia</i>	13
7. Mapa de distribución de <i>Salvia involucrata</i>	18
8. <i>Salvia involucrata</i>	18
9. Estructura química de los diterpenos <i>neo-clerodanos</i> aislados de <i>Salvia involucrata</i>	19
10. Organización general del sistema sensorial somático	22
11. <i>Salvia involucrata</i>	31
12. Parte aérea de <i>Salvia involucrata</i>	32
13. Proceso de obtención de los extractos orgánicos de <i>S. involucrata</i>	33
14. Ratones CD1 utilizados para la evaluación farmacológica de los extractos de <i>Salvia involucrata</i>	34
15. Modelo de “Writhing”	36
16. Modelo de formalina	37
17. Preparación de la columna del extracto de AcOEt	39
18. Columna correspondiente al extracto de MeOH	42
19. Equipo de Resonancia Magnética Nuclear marca Bruker	45
20. Gráfica de ganancia de peso de los sujetos experimentales	47
21. Evaluación del efecto antinociceptivo mediante la prueba de “Writhing”	48
22. Evaluación del efecto antinociceptivo mediante la prueba de formalina	49
23. Curva dosis-respuesta del modelo de “Writhing” del extracto de AcOEt	50
24. Curva dosis-respuesta del modelo de formalina del extracto de AcOEt	51
25. Curva dosis-respuesta del modelo de “Writhing” del extracto de MeOH	52
26. Curva dosis-respuesta de la prueba de formalina del extracto de MeOH	53
27. RMN- <sup>1</sup> H del Estigmasterol	55
28. RMN- <sup>13</sup> C del Estigmasterol	56



## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Clasificación de los terpenos según su número de carbonos	10
2. Terpenos y flavonoides con actividad antinociceptiva y antiinflamatoria aislados de especies de <i>Salvia</i>	15
3. Fracciones obtenidas de la cromatografía en columna del extracto de AcOEt	40
4. Fracciones reunidas por similitud en los perfiles cromatográficos del extracto de AcOEt	41
5. Fracciones obtenidas de la cromatografía en columna del extracto de MeOH	43
6. Fracciones reunidas por similitud en los perfiles cromatográficos del extracto de MeOH	44
7. Rendimiento de los extractos de <i>Salvia involucrata</i>	46
8. Concentración de terpenoides y compuestos fenólicos identificados en el extracto de AcOEt de <i>Salvia involucrata</i> mediante CLAR	54
9. Señales del espectro de RMN- <sup>1</sup> H del Estigmasterol	55
10. Señales del espectro de RMN- <sup>13</sup> C del Estigmasterol	56

## RESUMEN

---

Desde la antigüedad, las plantas han sido valoradas por su capacidad curativa, por lo cual, es común que hoy en día, éstas sean utilizadas como terapia complementaria y alternativa en el tratamiento de diversas enfermedades. Diferentes especies del género *Salvia* (Lamiaceae), han sido empleadas en la medicina tradicional mexicana, para tratar padecimientos como bronquitis, tos, ansiedad, insomnio, inflamación, dolor de estómago, diarrea, disentería, entre otros. A pesar de que México cuenta con la mayor diversidad de salvias del Neotrópico, solo se conoce la fitoquímica y farmacología de un bajo porcentaje de estas especies. Por ello, el objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto antinociceptivo de los extractos orgánicos y acuoso de la parte aérea de *Salvia involucrata* y aislar e identificar al menos un compuesto del extracto activo.

El material vegetal de la especie fue colectado en mayo de 2019 en La Trinidad, San Luis Potosí. Los extractos orgánicos fueron obtenidos por maceración utilizando disolventes de polaridad creciente (hexano, acetato de etilo y metanol), y el extracto acuoso mediante decocción y liofilización. Se determinó la toxicidad oral aguda de éstos por medio del protocolo de la OCDE (2001). Para la evaluación farmacológica se utilizaron ratones macho de la cepa CD1, a los cuales inicialmente se les administró la dosis de 300 mg/kg de cada extracto para ser evaluados en los modelos de “Writhing” y formalina, posteriormente se realizó una curva dosis-respuesta (3 y 30 mg/kg) correspondiente a los extractos de acetato de etilo y metanol. La  $DL_{50}$  de los extractos de *S. involucrata* fue  $> 2000$  mg/kg, p.o., por lo cual fueron clasificados en la categoría cinco (no tóxicos). El extracto de acetato de etilo fue el que presentó mayor efecto antinociceptivo no dependiente de la dosis en ambas pruebas, por lo que fue analizado con técnicas cromatográficas (cromatografía en columna y cromatografía líquida de alta resolución), identificando así, triterpenos como  $\beta$ -Sitosterol y ácido ursólico, además de distintos flavonoides, tales como: Apigenina, Canferol, Isoramnetina y Quercetina. Así mismo, de dicho extracto se aisló un compuesto caracterizado como Estigmasterol por medio de RMN- $^1H$  y  $^{13}C$ . Los resultados del presente estudio dan evidencia de que *S. involucrata* posee actividad antinociceptiva, posiblemente debido a la presencia de constituyentes de naturaleza terpénica y fenólica previamente identificados en otras especies del género.

## 1. INTRODUCCIÓN

---

Desde la antigüedad las personas hemos recurrido a las plantas en busca de alivio y curación para distintos malestares y enfermedades, razón por la que éstas han sido valoradas por su capacidad curativa desde el inicio de la civilización. Actualmente, siguen teniendo gran peso en el ámbito alimenticio y medicinal; éste último se ha visto impulsado por los estudios fitoquímicos y farmacológicos que avalan la efectividad de los metabolitos secundarios de las plantas en distintas afecciones, permitiendo de esta manera el aislamiento de aquellos compuestos activos promoviendo la elaboración de fitofármacos (Kantati *et al.*, 2016).

México es un país que cuenta con un vasto registro etnobotánico que abarca desde plantas que alivian malestares estomacales y gastrointestinales hasta aquellas capaces de tener efectos positivos en personas con cáncer, lo que ha servido como motivación para realizar gran variedad de investigaciones de la flora medicinal, con el propósito de desmentir o dar veracidad a los efectos de dicha planta y en caso de ser estos positivos hallar y aislar aquellos componentes activos presentes y efectivos en la cura de trastornos comunes (Newall, 1996). Actualmente se sabe que el dolor, definido por la Asociación Internacional para el estudio del dolor (IASP) como “una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada con un daño tisular, real o potencial” (Loeser & Treede 2008) es un problema de salud pública a nivel mundial, convirtiéndolo así en una de las preocupaciones más relevantes en los últimos 30 años dentro del ámbito médico; incluso recientemente al dolor crónico (dolor que prevalece por más de tres meses) se le ha considerado una enfermedad y no un síntoma como hace algunos años, debido a los graves efectos que puede producir tanto a nivel fisiológico como psicológico (Niv & Devor, 2004).

En cuanto a dolor abdominal, se dice que comprende aproximadamente el 30% del total de consultas de urgencias en el país presentando diagnósticos diferenciales muy amplios y difíciles, pues en algunos casos el dolor abdominal puede ser un síntoma de distintas patologías severas que de no diagnosticarse a tiempo son capaces de ocasionar la muerte del paciente (Rivera *et al.*, 2007).

Los fármacos empleados para aliviar el dolor se denominan analgésicos y principalmente se dividen en dos grupos, los opioides y los antiinflamatorios no esteroideos, los cuales en algunos casos se administran de manera conjunta, dando lugar a la terapia multimodal, con

el fin de potenciar la analgesia del paciente. Por otro lado, es importante mencionar que el uso de dichos fármacos no está exento de efectos secundarios pues se tiene registro de que han provocado problemas cardiovasculares y renales, entre otros (Jiménez-López *et al.*, 2003; O'Neil *et al.*, 2012).

Con base en los trabajos fitoquímicos de algunas plantas del género *Salvia* se sabe que muchas de ellas sintetizan monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y compuestos fenólicos (Wu *et al.*, 2012; Jenks & Kim, 2013). Cabe destacar que en las salvias americanas hay abundante presencia de diterpenos neo-clerodanos (Rodríguez-Hahn *et al.*, 1989; Esquivel, 2008; Jenks & Kim, 2013).

Diversas investigaciones han reportado los efectos farmacológicos sobre sistema nervioso central de extractos y compuestos (terpenoides y flavonoides) de especies de *Salvia* como ansiolíticos, sedantes, antidepresivos, antinociceptivos y antiinflamatorios (Imanshahidi & Hosseinzadeh, 2006). Dentro de las investigaciones realizadas en especies mexicanas se encuentra el estudio de los extractos de *Salvia divinorum* Epling & Játiva, que presentaron actividad en modelos de dolor neuropático (Simón-Arceo *et al.*, 2017). Por otra parte, los extractos de *Salvia amarissima* Ortega y *Salvia semiatrata* Zucc. han presentado actividad antinociceptiva en los modelos de estiramiento abdominal y formalina, cuyos metabolitos parcialmente responsables fueron el diterpeno neo-clerodano amarisolida A y el flavonoide pedalitina (Moreno-Pérez *et al.*, 2019), así como al diterpeno 7-ceto-neoclerodan-3,13-dien-18,19:15,16-diólida (Ortiz-Mendoza *et al.*, 2020).

El propósito del presente estudio fue evaluar el efecto antinociceptivo de extractos de la parte aérea de *Salvia involucrata* Cav. y, en su caso, identificar algún compuesto bioactivo a partir del extracto con mayor actividad.

## 2. ANTECEDENTES

---

### 2.1 Medicina Tradicional Mexicana

Se considera un sistema médico a todas las creencias y prácticas relacionadas con la salud y la enfermedad (Glick, 1967), existen muchos sistemas médicos puesto que toda sociedad humana cuenta con uno, dado que preservar la salud siempre será considerada una prioridad. Todos los sistemas médicos constan de dos componentes importantes; los agentes de salud, que son los encargados de diagnosticar y brindar una cura, como médicos, curanderos y yerbateros (entre estos se incluye a parteras, hueseros, sobadores y yerberos), por mencionar algunos; y los métodos o procedimientos adecuados, los cuales engloban desde un tratamiento con plantas medicinales hasta una elaborada cirugía y la administración de fármacos sofisticados (Glick, 1967).

En México se cuenta con una gran variedad de sistemas médicos, siendo uno de estos la medicina tradicional. La Organización Mundial de la Salud (OMS), define a la medicina tradicional como la suma total de los conocimientos, habilidades y prácticas basadas en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, sean explicables o no, utilizadas para diagnóstico, prevención y cura de trastornos físicos, mentales y sociales transmitidas de generación en generación ya sea de manera verbal o escrita (OMS, 1978), la cual está catalogada como un acervo de información de los recursos y como un componente del patrimonio tangible e intangible de la diversidad cultural mundial.

Por su parte, la Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas (CDI) define a la medicina tradicional mexicana como “el conjunto de sistemas de atención a la salud que tiene sus raíces en conocimientos profundos sobre la salud y la enfermedad, que los diferentes pueblos indígenas y rurales del país han acumulado a través de su historia, fundamentados en su propia interpretación del mundo, donde han incorporado elementos provenientes de otras medicinas, como la medicina antigua española, la medicina africana y en menor medida de la medicina occidental” (Almaguer *et al.*, 2009).

El recurso más utilizado dentro de la medicina tradicional mexicana son las plantas, puesto que el éxito del ser humano ha dependido del conocimiento tradicional y de la manipulación de su medio, en el cual, las plantas siempre han estado presentes, dando lugar al descubrimiento de sus propiedades benéficas, siendo estas auxiliares altamente eficaces en el tratamiento de diversos padecimientos (Velasco, 1999).

En México se tienen extensos recursos sobre la medicina tradicional, ejemplo de esto son los numerosos manuscritos mayas donde se relata de manera detallada la sintomatología de varias enfermedades y los distintos efectos benéficos de algunas plantas sobre el cuerpo humano (Xiu-Chacón, 1998), además de escritos como “*Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*”, mejor conocido como el Códice de la Cruz-Badiano (1552), siendo este el primer libro de su tipo en América y por ende, la fuente más antigua sobre la herbolaria en México. En este escrito, Martín de la Cruz se encargó de recopilar información sobre las plantas utilizadas en la medicina indígena mexicana. Otros ejemplos son la Historia de las Plantas de la Nueva España (1571-1576) de Francisco Hernández de Toledo (Lozoya, 1999), el Códice Florentino (1577) y relatos más contemporáneos como El Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana (1994) de Arturo Argueta y María Concepción Gallardo Vázquez, por mencionar algunos.

## 2.2 Plantas medicinales

Según la Organización Mundial de la Salud (1978) se considera planta medicinal a “toda especie vegetal que pueda ser empleada para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos puedan considerarse precursores para la síntesis de nuevos fármacos”.

Se estima que en México existen alrededor de 25,000 y 30,000 especies de plantas vasculares (Hersch, 1999) de las cuales, aproximadamente 5,000 tienen propiedades medicinales (Sarukhán *et al.*, 2009), sin embargo, se considera que, en México, únicamente se ha realizado el estudio de la química y farmacología la de aproximadamente el 5% de estas especies (Huerta, 1997; Alonso, 2003). Las principales familias botánicas a las cuales pertenecen estas especies son: Asteraceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Malvaceae, Rosaceae, Solanaceae y Verbenaceae (Aguilar *et al.*, 1994).

Si bien es cierto que mucho de este conocimiento tradicional de las plantas medicinales es producto del manejo de los recursos naturales por parte de diversas comunidades, su uso no

se limita únicamente a las comunidades rurales, pues es común su aplicación en áreas urbanas, como remedios a distintos padecimientos por brindar tratamientos de origen natural y de esta manera evitar el uso de fármacos que en ocasiones podrían ocasionar efectos secundarios, algunos ejemplos son: la guayaba (*Psidium guajava* L.) utilizada como remedio para la diarrea en distintas partes del país (Echemendía-Salix & Morón-Rodríguez, 2004; Neira *et al.*, 2005), la manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) tomada en infusiones para aliviar malestares estomacales, al igual que la hierbabuena (*Mentha spicata* L.), la cual también se emplea de forma tópica e inhalatoria para el alivio de todo tipo de afecciones digestivas, catarros y constipados, por mencionar algunas (Lagarto-Parra *et al.*, 1997).

Otro aspecto relevante sobre las plantas medicinales es que, como su definición lo menciona, algunas son utilizadas para la síntesis de nuevos fármacos, haciendo uso generalmente de metabolitos secundarios aislados de ellas; por ejemplo, el ácido acetilsalicílico aislado de la corteza del sauce (*Salix alba* L.), la morfina y la codeína conocidos por ser potentes analgésicos son aislados de la flor de amapola (*Papaver somniferum* L.), el bromuro de galantamina, utilizado para la enfermedad de Parkinson proviene de la campanilla de invierno (*Galanthus nivalis* L.) y el bromuro de tiotropio, el cual es un derivado de la atropina, la cual a su vez es aislada de la belladona (*Atropa belladonna* L.) utilizado generalmente para tratar los bronco espasmos producidos por la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Chin *et al.*, 2006).

Sin embargo, hoy en día, la transmisión y preservación del conocimiento tradicional se ha visto estropeado, pues en muchas ocasiones se le ha subvalorado por carecer de estudios científicos que avalen su eficacia, lo que ocasiona no solo la pérdida de interés de las personas para su divulgación y uso, sino que también puede llevar a un desinterés por la conservación de la flora considerada medicinal.

Con base en lo anterior, se puede concluir que el estudio de las plantas medicinales se vuelve cada vez más importante, tanto para dar un respaldo a la medicina tradicional y salvaguardar sus técnicas y conocimiento como para la extracción de compuestos biológicamente activos que den pauta a la creación de nuevos fármacos efectivos.

### 2.3 Generalidades de la familia Lamiaceae

La familia Lamiaceae perteneciente al orden Lamiales, se encuentra distribuida en todo el mundo, exceptuando únicamente las regiones polares, contiene 240 géneros y de 6900 a 7200 especies, ocupando el sexto lugar en riqueza a nivel mundial. Posee una amplia diversificación, pues engloba especies altamente adaptadas a climas áridos, semi-áridos, húmedos y templados, predominando en su mayoría en climas templados, de esta manera se reconocen como regiones de alta diversidad a: la Zona Mediterránea, Norteamérica (incluyendo a México), Centro y Sudamérica, SO de Asia Central, las zonas tropicales de África y China, además de las islas del Pacífico (Hedge, 1992).

Los miembros de esta familia se distinguen por presentar hojas opuestas, tallos tetragonales, corolas gamopétalas, androceo compuesto por dos o cuatro estambres, gineceo bicarpelar dividido en cuatro lóculos, ovario súpero y su inflorescencia generalmente compuesta de cimas rodeadas por brácteas, además de que muchas especies secretan compuestos aromáticos debido a la presencia de glándulas epidérmicas en la superficie de su lámina foliar (Martínez-Gordillo *et al.*, 2017).

En México, Lamiaceae es la octava familia más diversa, conteniendo aproximadamente el 5.5% del total de especies de la familia a nivel mundial, abarcando 33 géneros y 598 especies con una proporción de endemismo del 66.2%; está distribuida, principalmente a lo largo de las zonas montañosas y de manera primordial en el eje Neovolcánico Transversal (Martínez-Gordillo *et al.*, 2017).

El género *Salvia* es el más abundante de la familia, con aproximadamente 1000 especies distribuidas en todo el mundo, excepto en las regiones frías del mundo y en Australia.



## 2.4 Género *Salvia* en México

Las Salvias (del latín *Salvare*: ser salvado) son hierbas perennes o anuales, arbustos y pocas veces arbustos trepadores, a menudo aromáticos, con tallos tetragonos, hojas simples, opuestas y decusadas, carentes de estípulas y flores en inflorescencias bracteadas, cimosas o racemosas. Las flores son zigomorfas y pentámeras, pediceladas o subsésiles, con cáliz bilabiado, persistente, con 5 sépalos parcialmente connados, en una estructura tubulosa. La corola es bilabiada, 4-5-lobada, presentando el labio superior generalmente galeado, entero o emarginado y el labio inferior trilobado, extendido, o en ocasiones reflejado. (Hernández-Agero *et al.*, 2002 & Martínez-Gordillo *et al.*, 2013).

El género *Salvia* se distingue de los demás géneros de la familia Lamiaceae por la presencia de dos estambres con elongación del tejido conectivo que separa las tecas; dicha elongación se asocia con un mecanismo de polinización exclusivo, en el cual el polinizador empuja la teca posterior para acceder al néctar, que se encuentra en la base del tubo de la corola, permitiendo de esta manera que la teca anterior derrame gran cantidad de polen sobre el polinizador, mejor conocido como mecanismo de palanca (Walker *et al.*, 2004).

México es el país con mayor número de especies del género *Salvia* subgénero *Calosphace* contando con poco más de 300 especies de las aproximadamente 1000 conocidas mundialmente, de las cuales, cerca del 45% son endémicas. Es común encontrarlas en las zonas montañosas del país, principalmente en las del centro-sur de la república. Los estados con mayor riqueza de salvias son Oaxaca (63), Guerrero (51), Puebla (50), Jalisco (49) y Michoacán (48) (Ramamoorthy & Eliot, 1998).

Dicho género se clasifica en cuatro subgéneros: *Calosphace*, *Leonia*, *Salvia* y *Sclarea*. Las salvias mexicanas están incluidas dentro del subgénero *Calosphace*, con excepción de tres pertenecientes al subgénero *Leonia* (Walker *et al.*, 2004).

De las 1000 especies del género, únicamente se tienen registros de investigación fitoquímica y/o etnobotánica de 138 spp. (14%), de las cuales solo el 5% corresponden a especies mexicanas (45 spp.) (Wu *et al.*, 2012).

## 2.5 Etnobotánica del género *Salvia* en México

Desde hace muchos años, las salvias o mirtos, como suelen llamarles dentro de las comunidades, han estado presentes en la medicina tradicional mexicana e incluso en algunos ritos ceremoniales pues se les han atribuido efectos tranquilizantes y sedantes. Son muy populares para el tratamiento de problemas gastrointestinales como la diarrea, dolores estomacales, vómito, cólicos e incluso para la pérdida de apetito. Son un recurso importante en limpias pues curan el mal de ojo, el espanto, el mal del aire. También son efectivas para aliviar dolores posteriores al parto y dolores menos fuertes como el dolor de cabeza, de igual manera son un componente herbolario para curar afecciones de la piel como granulomas (Jenks & Seung-Chul, 2013).

En la actualidad, su uso como auxiliar en la medicina tradicional sigue estando presente en varias comunidades, por ejemplo, *S. amarissima* se utiliza en Santiago Huacilla, Oaxaca para tratar la diarrea y el dolor estomacal (Nambo, 2015); *S. divinorum* es empleada en Oaxaca por los Mazatecas en distintos ritos espirituales, como antidiarreico y para aliviar dolores de cabeza (Reisfield, 1993); *S. semiatrata* es efectiva ante el dolor y la ansiedad en Oaxaca; *Salvia microphylla* Kunth es un auxiliar para las erupciones cutáneas, hematomas, e inflamación de la piel en la Meseta Purepecha en Michoacán, al igual que *S. mexicana* L. en el mismo estado donde se le utiliza como auxiliar para las mordidas de insectos y erupciones cutáneas (Esquivel-García, 2018); *Salvia tiliifolia* Vahl es aprovechada para tratar heridas infectadas en Huasca de Ocampo, Hidalgo (Molina-Mendoza, 2012); *Salvia ballotiflora* Benth. mejor conocida como “mejorana” en regiones de San Marcos Tlacoyalco y San Juan Atzingo en el estado de Puebla, es empleada por mujeres después del parto para desinflamar el abdomen, mientras que en el noreste de México, la infusión de este arbusto se utiliza para aliviar malestares estomacales (Esquivel, 2008) por mencionar algunos ejemplos.

## 2.6 Fitoquímica del género *Salvia*

El tipo de compuestos que destaca en el género *Salvia* son los terpenos y los polifenoles. Dentro de los terpenoides, sobresalen los diterpenos con aproximadamente 500 compuestos, seguidos de los triterpenos con alrededor de 74, y por último los sesquiterpenos con 48 estructuras (Wu *et al.*, 2012). En cuanto a los polifenoles se han aislado alrededor de 100 (Wu *et al.*, 2012). Es importante mencionar que la mayoría de los estudios fitoquímicos del género se han realizado en las partes aéreas de las plantas, siendo muy limitados aquellos en los que se utilice como principal muestra las raíces de la planta (Esquivel, 2017).

### *Terpenos*

Los terpenos son compuestos orgánicos ampliamente distribuidos en plantas, siendo así el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (aproximadamente más de 40,000 moléculas diferentes). Generalmente son insolubles en agua y se derivan de la unión de unidades de isopreno (Figura 1).

Las moléculas de isopreno se unen mediante uniones cabeza-cola, unión conocida como “la regla biogenética del isopreno”, la cual, es válida para la mayoría de los terpenos más comunes (Mann *et al.*, 1994).

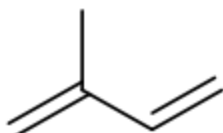


Figura 1. Estructura química del isopreno (2-metil-1,3-butadieno)

Los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno que los conforman. En el Cuadro 1 se describen los terpenos de acuerdo con el número de carbonos que presentan y sus precursores.

Cuadro 1. Clasificación de los terpenos según su número de carbonos (Mann *et al.*, 1994; Heldt, 1997).

<b>Tipo de terpeno</b>	<b>Número de carbonos</b>
	C5
Hemiterpenos	1 unidad de isopreno
	C10
Monoterpenos	2 unidades de isopreno
	C15
Sesquiterpenos	3 unidades de isopreno
	C20
Diterpenos	4 unidades de isopreno
	C30
Triterpenos	6 unidades de isopreno
	C40
Tetraterpenos	8 unidades de isopreno

Los sesquiterpenos son hidrocarburos de 15 carbonos que forman parte importante de los aceites esenciales, dos de los más comunes en el género *Salvia* son el  $\beta$ -cariofileno y el espatulenol. Por su parte, los diterpenos son los compuestos que mejor caracterizan al género *Salvia* y particularmente hablando de las salvias mexicanas, se distinguen por la síntesis mayoritaria de diterpenos derivados del esqueleto *neo*-clerodano (Fig. 2) (Esquivel, 2008; Bautista, 2012), a diferencia de las salvias de Asia y Europa que se caracterizan por sintetizar en mayor medida diterpenos de tipo abietano. Debido a su gran diversificación, los diterpenos incluso se han llegado a considerar como marcadores taxonómicos tanto a nivel de subgéneros, como de secciones botánicas (Esquivel, 2017).

En cuanto a los triterpenos, los más abundantes en este género son aquellos derivados de los esqueletos de ursano, oleanano y lupano (Jash *et al.*, 2016). Algunos triterpenos aislados de *Salvia* son:  $\alpha$ -Amirina,  $\beta$ -Amirina, Lupeol, Ácido maslínico, Ácido ursólico y Ácido oleanólico, siendo estos dos últimos los más comunes (Figura 2) (Topçu, 2006). Algunos de

estos son componentes estructurales de las membranas de los seres vivos, las cuales, a su vez son un elemento multifuncional muy importante de las células animales y vegetales, pues desempeñan funciones protectoras, estructurales, de transporte y de señalización (Valitoba *et al.*, 2016).

Algunos fitoesteroides aislados de plantas pertenecientes al género *Salvia* son  $\beta$ -Sitosterol y Estigmaterol (Figura 3) (Saeidnia *et al.*, 2011).

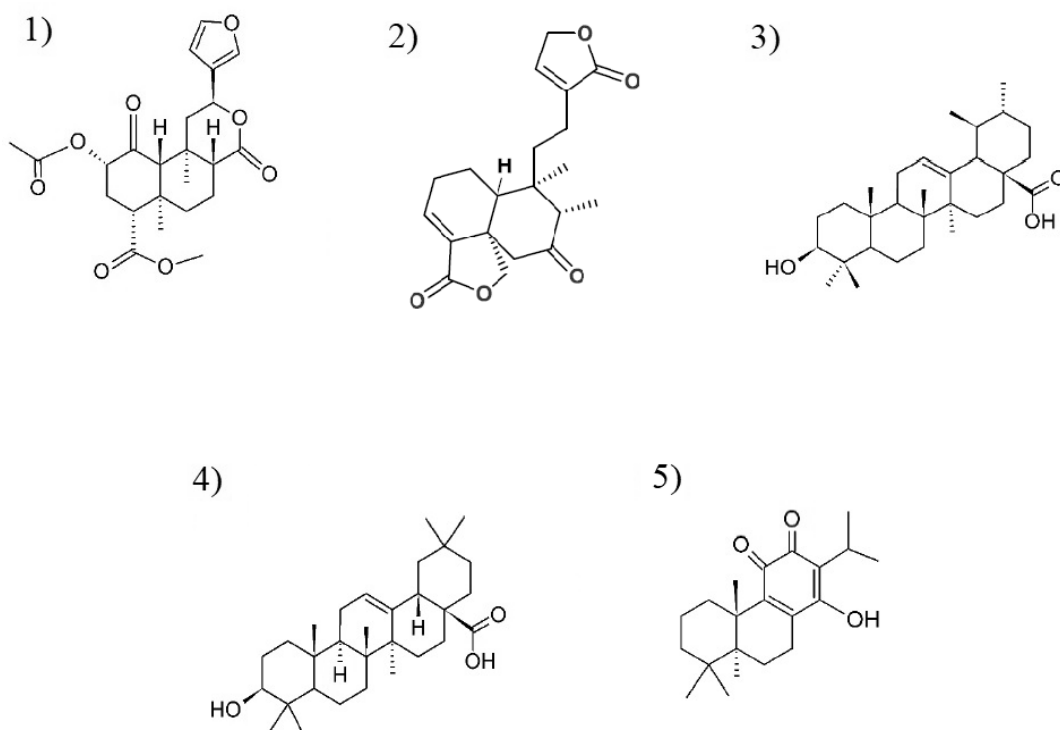


Figura 2. Estructura química de terpenoides sintetizados por el género *Salvia*; *neo*-clerodanos: 1) Salvinorina A y 2) 7-ceto-neoclerodan-3,13-dien-18,19:15,16-diólida; Triterpenos: 3) Ácido ursólico y 4) Ácido oleanólico; Diteperno: 5) Tanshinona IIA

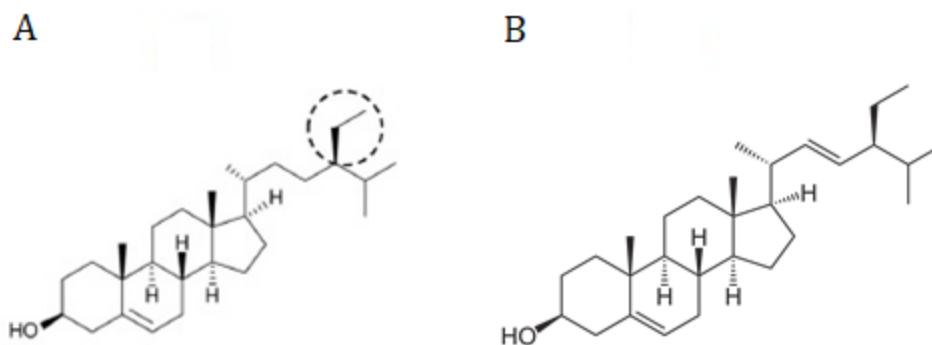


Figura 3. Estructura química de fitoesteroides aislados del género *Salvia*: (A)  $\beta$ -Sitosterol, (B) Estigmasterol

### Polifenoles

Se denomina polifenoles a aquellos compuestos con presencia de uno o varios anillos fenólicos, es decir, su esqueleto básico es el fenol (Figura 4), el cual se compone de un anillo aromático (fenilo) unido a un grupo hidroxilo (OH). Estas moléculas derivan de las vías del shiquimato y de los fenilpropanoides (Munin & Edwards-Lévy, 2011). Entre otras cosas, los polifenoles se ven involucrados en los mecanismos de defensa de las plantas frente a agentes externos como la agresión de patógenos y depredadores y la radiación ultravioleta (Bravo, 1998).

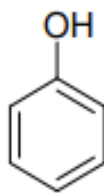


Figura 4. Estructura química del fenol

Su clasificación está basada precisamente en el número de anillos que poseen y el tipo de sustituyente unido a estos anillos fenólicos. Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), flavonoides, estilbenos y lignanos, siendo los flavonoides la subclase de polifenoles más abundante dentro del reino vegetal (Manach *et al.*, 2004; Quiñones *et al.*, 2012).

La estructura química común de un flavonoide es un difenilpropano (C6-C3-C6), constando de dos anillos aromáticos (A y B) unidos a través de tres átomos de carbono que forman un heterociclo oxigenado (anillo C) (Figura 5).

En el género *Salvia* se han encontrado gran variedad de polifenoles, como son el Ácido cafeico, felúrico, cumárico, gálico (Figura 6). La Apigenina, Luteolina, Quercetina, Canferol y Rutina (Islas, 2013).

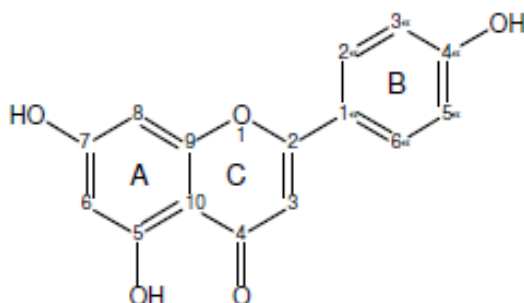


Figura 5. Estructura básica de un flavonoide

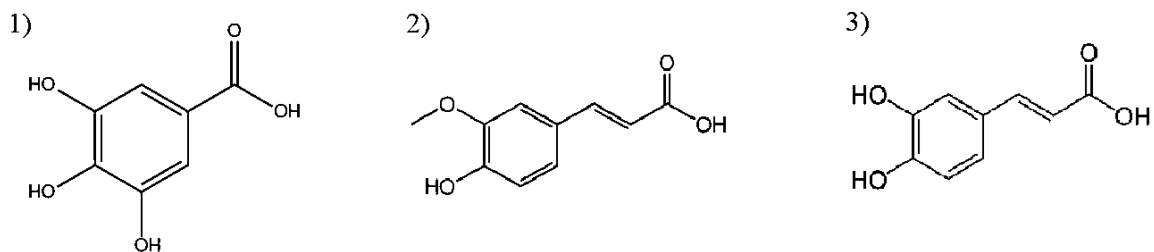


Figura 6. Estructura química de algunos ácidos fenólicos aislados del género *Salvia*.

1) Ácido gálico, 2) Ácido felúrico y 3) Ácido cafeico

### 2.6.1 Metabolitos con acción biológica

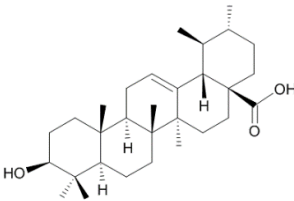
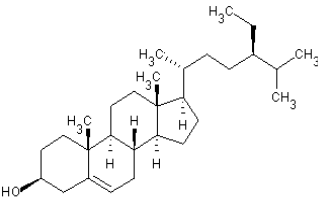
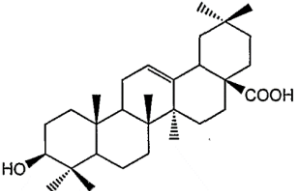
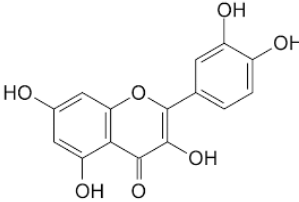
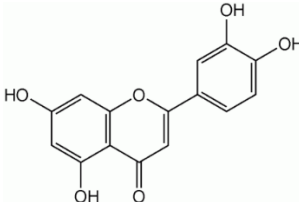
Se ha documentado la acción antiinflamatoria y antioxidante de los extractos acetónico y metanólico de las partes aéreas de *Salvia mexicana* L. var. *minor*, de donde se aislaron  $\beta$ -Sitosterol, Betulinol, Ácido betulínico, Ácido ursólico y Arbutina (Argumedo-Delira *et al.*, 2003). Del mismo modo, se ha demostrado la acción antioxidante de la infusión acuosa de *Salvia officinalis* L. al ser evaluada *in vivo* en ratas y ratones mediante la cuantificación de la actividad de la transaminasa plasmática y la actividad de las enzimas glutatión-S-transferasa y glutatión reductasa hepática (Lima *et al.*, 2005).

Son numerosos los metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de las plantas pertenecientes al género *Salvia*; dentro de estos, tenemos tres ácidos triterpénicos pentacíclicos: los Ácidos oleanólico (OA), ursólico (UA) y betulínico (BA), correspondientes a los esqueletos de oleano, ursano y lupano respectivamente. Por su parte, OA y UA exhiben actividad antiinflamatoria, antimicrobiana (Topçu, 2006), hepatoprotectora, anticarcinogénica, antiulcerosa e hipoglucémica (Misra *et al.*, 1999). Además, tienen efectos protectores contra la peroxidación lipídica, y se propuso que su potencial antioxidante está influenciado por los sustituyentes metilo en las posiciones 4, 19 y 20 (Topçu, 2006). Mientras que BA tiene actividad antitumoral contra el melanoma humano (Hyeh-Jean *et al.*, 1999).

Algunos metabolitos aislados tienen propiedades alucinógenas, como es el caso de la Salvinorina A, un diteperno *neo*-clerodano presente en *S. divinorum* (Giroud *et al.*, 2000), mismo al que se le ha determinado como un agonista no alcaloide de los receptores de opioides K, que tienen efecto en las vías de nocicepción centrales (McCurdy *et al.*, 2006). A continuación, en el cuadro 2 se enlistan algunos compuestos aislados de plantas del género *Salvia* que presumen tener actividad antiinflamatoria y antinociceptiva.

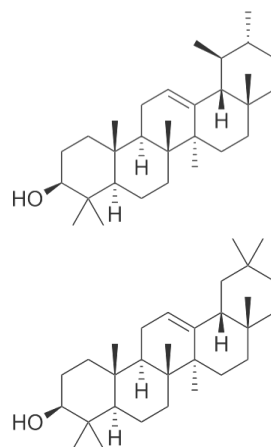


Cuadro 2. Terpenos y flavonoides con actividad antinociceptiva y antiinflamatoria aislados de especies de *Salvia*

Compuesto	Actividad	Estructura química	Referencia
<b>Ácido ursólico</b>	Antinociceptivo Antiinflamatorio		Pironi <i>et al.</i> , 2018 Verano et al, 2013 Topçu, 2006
<b>β-Sitosterol</b>	Antiinflamatorio		Argumedo-Delira <i>et al.</i> , 2003
<b>Ácido oleanólico</b>	Antiinflamatorio Antinociceptivo		Park <i>et al.</i> , 2013 Xu <i>et al.</i> , 2014 Topçu, 2006
<b>Quercetina</b>	Antiinflamatorio		Liu <i>et al.</i> , 2018
<b>Luteolina</b>	Antiinflamatorio		López-Lázaro, 2009

**$\alpha$  y  $\beta$ -Amirina**

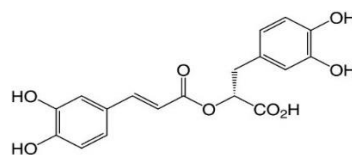
Antiinflamatorio  
Antinociceptivo



Nogueira *et al.*,  
2018

**Ácido  
rosmarínico**

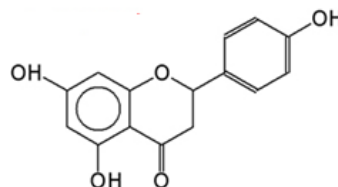
Antiinflamatorio



Liu *et al.*, 2018

**Naringenina**

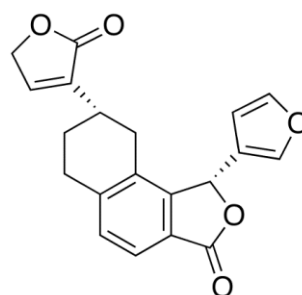
Antiinflamatorio  
Antinociceptivo



Pinho-Ribeiro *et al.*, 2017

**Tilifodiólida**

Antinociceptivo



González-Chávez  
*et al.*, 2018

## 2.7 *Salvia involucrata*

*S. involucrata*, es una planta herbácea perenne de hasta 2 m de altura, endémica del este de México, se distribuye en la parte centro-sur de la Sierra Madre Oriental, encontrándose así en los estados de Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo y Veracruz hasta Puebla (Figura 7) (Bedolla-García & Zamudio, 2017).

Posee un tallo teñido de morado con tricomas simples y en ocasiones tricomas glandulares largos, su peciolo es de color verde a morado y va disminuyendo notoriamente en longitud hacia arriba, llegando a ser casi imperceptible en la base de la inflorescencia. Su cáliz es rosáceo-purpúreo campanulado, de 10–16 mm de largo y 3–7 mm de ancho, con tricomas glandulares largos y tricomas simples sobre las venas. Su corola es de color rosa-púrpura pudiendo medir de 28–45 mm de largo, notablemente hinchada en el medio, presentando el labio superior densamente viloso (Figura 8). Su epíteto específico *involucrata* hace referencia a sus bractéolas prominentes que forman un involucro alrededor de las flores (Bedolla-García & Zamudio, 2017).

Crece en bosques de pino y encino, bosques mesófilos de montaña y en la vegetación secundaria derivada de éstos. Su intervalo altitudinal va de los 1100 a los 26000 msnm; Se sabe que su floración y fructificación se da del mes de julio al mes de enero y se presume que es polinizada por colibríes (ornitofilia) (Bedolla-García & Zamudio, 2017).

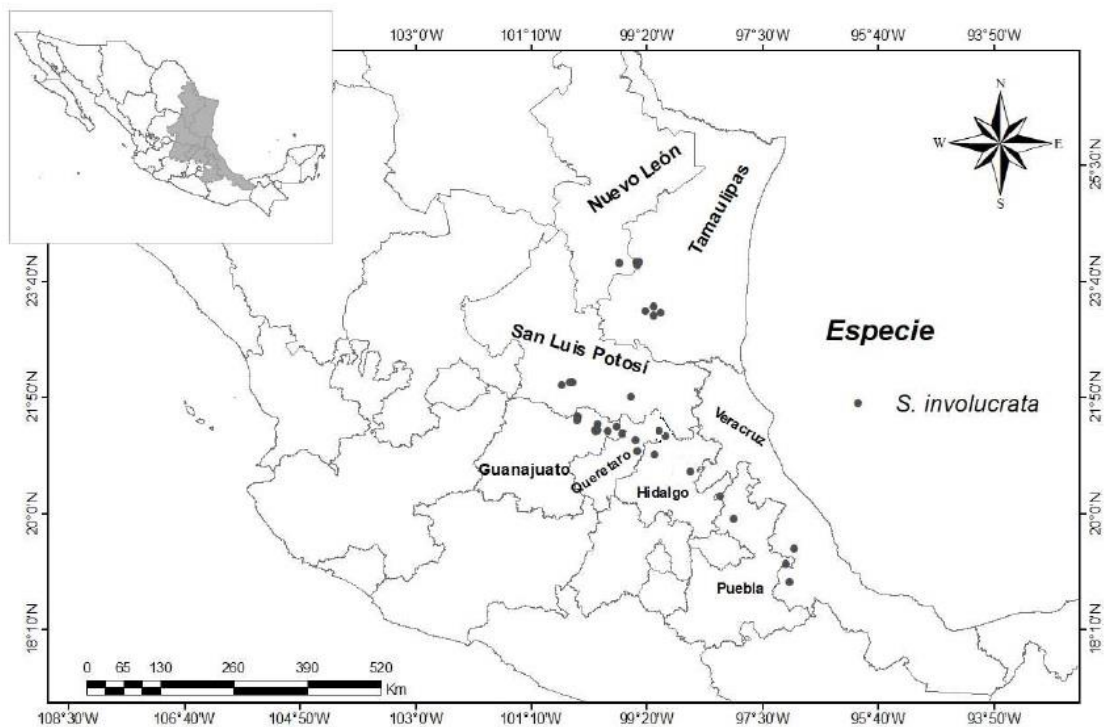


Figura 7. Mapa de distribución de *Salvia involucrata*. Modificado de Bedolla-García & Zamudio 2017.



Figura 8. *Salvia involucrata*

### 2.7.1 Fitoquímica de *Salvia involucrata*

En 2021, Bustos-Brito y colaboradores aislaron tres compuestos novedosos de las partes aéreas de *S. involucrata* caracterizados como diterpenos *neo-clerodanos*, nombrados involucratina A, involucratina B e involucratina C (Figura 9) (Bustos-Brito *et al.*, 2021).

Se determinó que la involucratina A y B son diterpenos con esqueleto tipo *cis-neo-clerodano*, mientras que la involucratina C corresponde a un diterpeno con esqueleto tipo 5,10-*seco-neo-clerodano*, es importante mencionar que cuando existe una ruptura de enlace C-C en compuestos terpénicos se antepone el prefijo *x,y-seco* seguido del nombre del esqueleto del que se trata, en donde *x* y *y* hacen referencia al enlace que se rompió, esto se establece mediante los análisis espectroscópicos considerando las variables de acoplamiento, por lo que en el caso de esta molécula se determinó que no podría existir un doble enlace entre C4-C5 al ser C-5 un carbono cuaternario y por ello se nombró de esta manera (Bustos-Brito *et al.*, 2021).

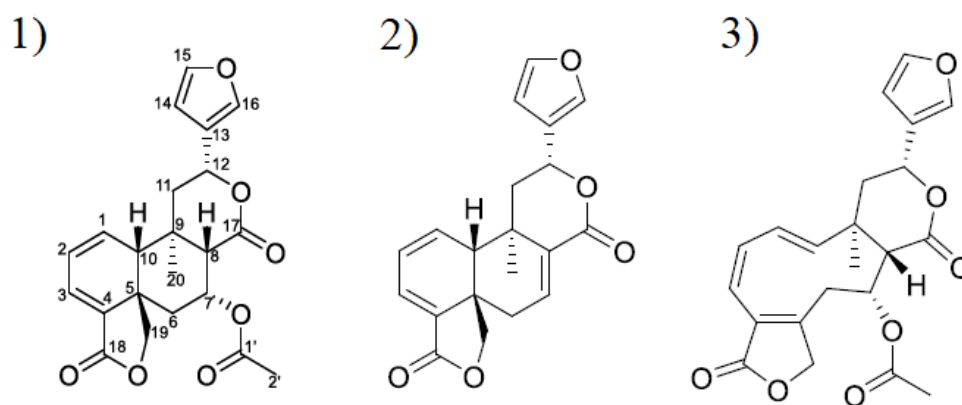


Figura 9. Estructura química de los diterpenos *neo-clerodanos* aislados de *Salvia involucrata* 1) involucratina A, 2) involucratina B y 3) involucratina C

## 2.8 Dolor

El dolor, según la Asociación Internacional para el estudio del dolor (IASP) se define como “una experiencia sensorial o emocional desagradable, asociada al daño tisular real o potencial o bien descrita en términos de tal daño”. Debido a que todos definimos nuestro dolor con base en la experiencia, se le considera algo subjetivo y su intensidad dependerá de los aspectos biológicos y neurofuncionales involucrados, incluso el estado emocional en el momento en que se presenta el estímulo nociceptivo puede interferir en cuanto a su percepción (Merskey, 1986).

### 2.8.1 Nocicepción

La nocicepción envuelve una interacción muy compleja de las estructuras de los sistemas nervioso central y periférico. Después de la integración en la médula espinal, la información nociceptiva es transferida a las estructuras talámicas antes de que llegue a la corteza somatosensorial. Cada uno de estos niveles del sistema nervioso central (SNC) contiene mecanismos moduladores, sin embargo, los dos sistemas más importantes en la modulación de la nocicepción y la antinocicepción son el N-metil-D-aspartato (NMDA) (activado por el glutamato) y el sistema del receptor de opioides, mismos que tienen un patrón de distribución contiguo en casi todas las regiones del SNC, además se sabe que la activación de los receptores de NMDA contribuye a la hiperalgesia asociada con la lesión o inflamación nerviosa (Riedel & Neeck, 2001).

### 2.8.2 Nociceptores

Se conoce como nociceptores a las neuronas aferentes que se proyectan en los tejidos incluyendo piel, músculo y vísceras (Basbaum *et al.*, 2009), éstos surgen de los cuerpos celulares en los ganglios de la raíz dorsal o en el ganglio del trigémino y constantemente traducen una variedad de estímulos que podrían indicar un posible daño en potenciales receptores, los cuales a su vez desencadenan potenciales de acción aferentes (Mertens *et al.*, 2015). Los nociceptores tienen terminaciones de tipo purinérgico, de sustancia P, de factor de crecimiento nervioso, de serotonina, de GABA, canales de sodio, calcio y potasio, Además de receptores metabotrópicos diversos como los opioides, cannabinoides y glutaminérgicos (Sociedad Española del Dolor, 2016).

Hay tres clases principales de nociceptores en la piel:

- Nociceptores mecanosensibles A $\delta$
- Nociceptores mecanotérmicos A $\delta$
- Nociceptores polimodales

Los nociceptores A $\delta$  Son fibras mielínicas con velocidades de conducción alta, se encuentran situados en la dermis y epidermis y responden únicamente a estímulos mecánicos peligrosamente intensos.

Por otro lado, los nociceptores polimodales o nociceptores C amielínicos, también ubicados en la dermis, tienen una velocidad de conducción lenta y son capaces de responder a estímulos mecánicos, químicos y térmicos, además de a aquellas sustancias liberadas de daño tisular (Purves *et al.*, 2001).

La médula espinal es la primera estación sináptica; la primera sinapsis está formada por las terminales de los axones que se proyectan centralmente de las células ganglionares de la raíz dorsal sobre las neuronas en los núcleos del tronco encefálico, los axones de estas neuronas llamadas de segundo orden hacen una sinapsis con las neuronas de tercer orden del complejo nuclear ventral posterior del tálamo, el cual, es la estructura espinal integradora y de relevo de la información, de esta manera, dichas neuronas envían sus axones a la corteza sensorial somática primaria (Figura 10) (Purves *et al.*, 2001).

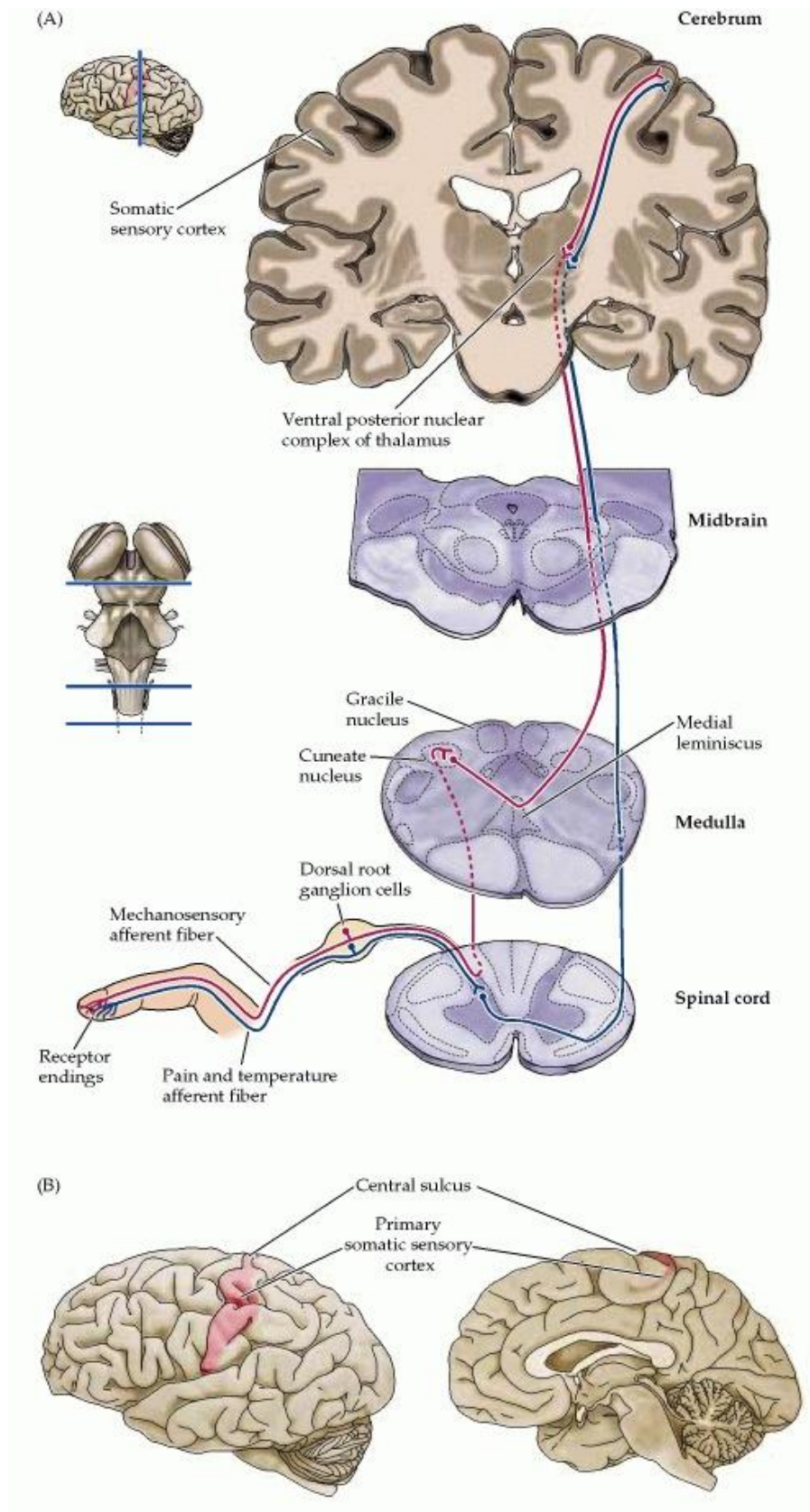


Figura 10. Organización general del sistema sensorial somático



### 2.8.3 Clasificación del dolor

Existen diferentes maneras de clasificar el dolor, sin embargo, es importante considerar que esta clasificación no es excluyente en sus categorías. A continuación, se mencionan las más comunes.

- *Dependiendo de su duración*

Dolor crónico: Aquel dolor que se manifiesta de forma persistente o recurrente por un periodo mayor a tres meses después de una lesión o incluso en ausencia de ella, generalmente pacientes de ciertas enfermedades como cáncer, presentan este tipo de dolor (Montgomery *et al.*, 2017).

Dolor agudo: Es la consecuencia sensorial inmediata provocada por un estímulo, como consecuencia de daño tisular somático o visceral, que desaparece a la par de la lesión que lo ocasiono (Bonica, 1990).

- *Según su intensidad*

Se utiliza la escala de dolor leve, moderado o severo (Puebla-Díaz, 2005).

- *En función de los mecanismos fisiopatológicos*

Dolor neuropático: Aquel dolor causado por una lesión en el sistema nervioso central o periférico con alto grado de complejidad, definido frecuentemente por presentarse en ausencia de daño tisular agudo concurrente o progresivo, dentro de este tipo de dolor se engloba a aquellos dolores que aparecen en ausencia de una lesión actual (Turk & Okifuji 2001).

Dolor nociceptivo: Dolor que se desencadena debido a la detección de algún estímulo que produce daño o lesión a órganos somáticos y viscerales por parte de los nociceptores periféricos, las vías centrales de la sensación dolorosa y la corteza cerebral: sistema neurofisiológico (López, *et al.*, 2007).

- *Según su anatomía.*

Somático: Se presenta por la excitación anormal de nociceptores somáticos superficiales o profundos (piel, musculoesquelético, óseos, vasos, etc.), generalmente está bien localizado y se describe como una sensación punzante (Puebla-Díaz, 2005).

Visceral: Aquel que se presenta en órganos y estructuras internas, generalmente es difícil de localizar y difuso y, a medida que pasa el tiempo, suele remitirse a estructuras más superficiales (Fink, 2005). Este dolor viene acompañado de distensión, inflamación o isquemia (Kansal & Hughes, 2016).

## 2.9 Dolor inflamatorio

El dolor inflamatorio, se agrupa dentro del dolor nociceptivo, y es aquel desencadenado por lesiones tisulares que dan lugar a una respuesta inflamatoria la cual, a su vez, estimula directamente a los nociceptores. El dolor inflamatorio es el que se presenta al tener rupturas tisulares (heridas, fracturas, desgarros musculares, etc.) presiones intensas, quemaduras, frío intenso y lesiones químicas (por sustancias ácidas o alcalinas) (Dawes *et al.*, 2013).

Al proceso inflamatorio que se activa por la vía nociceptiva también se le conoce como inflamación neurogénica y se considera que es un proceso bidireccional, pues la información no solo viaja hacia la médula espinal o el cerebro, sino que también tiene funciones eferentes (Pinho-Ribeiro *et al.*, 2016).

Desde las células lesionadas se inicia la liberación de una gran variedad de sustancias, mientras que otras son sintetizadas durante los eventos consiguientes a la lesión. Algunas de estas sustancias solo sensibilizan a los nociceptores (prostaglandinas, los leucotrienos y la Sustancia P), mientras que otras los activan directamente (iones K<sup>+</sup>, la serotonina, la bradiquinina y la histidina) (Hunt, 2001).

## 2.10 Fármacos para tratar el dolor

Los fármacos capaces de suprimir o aliviar la sensación dolorosa sin provocar la pérdida de la conciencia reciben el nombre de analgésicos. Estos fármacos se clasifican principalmente en antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y opioides.

Desde el punto de vista farmacológico, el efecto analgésico se puede producir en tres niveles diferentes:

1. Anestésicos locales: Fármacos que interrumpen la transmisión del impulso nervioso (Jacquier, 1997). Como la lidocaína
2. A nivel SNC: Con ayuda de analgésicos que actúan a nivel del neuro-eje como los opioides (Kumar *et al.*, 2010).
3. A nivel periférico: Mediante el uso de analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) inhibidor de la transmisión por los nociceptores a nivel periférico (Burke *et al.*, 2016).

### *Analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)*

Se consideran los fármacos más utilizados a nivel mundial para tratar el dolor debido a que poseen actividad analgésica, antiinflamatoria y antipirética. Su acción se debe a su inhibición de la enzima ciclooxygenasa (COX) reprimiendo de esta manera la síntesis de prostaglandinas (PG). Si bien las PGs no estimulan de manera directa los nociceptores son capaces de sensibilizar a otras sustancias que sí pueden estimularlos, como la serotonina o la histidina. Se conocen dos tipos de ciclooxygenasas; COX-1 y COX-2. La COX-1 es una enzima constitutiva responsable de la síntesis de las PGs gastrointestinales citoprotectoras, PGs renales implicadas en la diuresis (PGE2 y PGI2) de la síntesis de TXA2 en las plaquetas y de aquellas PGs involucradas en la circulación. Por otra parte, COX-2 es la enzima encargada de la síntesis de PGs de importancia para los procesos inflamatorios y carcinogénicos. Debido a esto, es importante conocer el tipo de selectividad que presenta el fármaco, pues ante un dolor inflamatorio es necesaria la inhibición de la síntesis de las PGs inducidas por COX-2 (Tejon *et al.*, 2016).

Algunos de los AINEs más comunes son: Ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco, indometacina, ácido acetilsalicílico y sus derivados acetilados.

Es importante recalcar que los AINEs no son medicinas inocuas para el cuerpo humano, pues se sabe que tienen factores de riesgo cardiovasculares, renales, gastrointestinales y hematológicos (Mendoza, 2008).

### *Analgésicos opioides*

Los analgésicos opioides son efectivos contra el dolor debido a la activación del sistema opioide endógeno (SOE), principal mecanismo inhibitorio que modula de forma fisiológica la transmisión nociceptiva en los mamíferos. Este tipo de analgésicos son utilizados principalmente para el tratamiento de dolores de gran intensidad y persistencia, algunos de los más utilizados en la medicina son la morfina, oxicodona, metadona y la codeína por mencionar algunos (Trescot, 2008).

Debido a la amplia distribución de los receptores opioides en el organismo pueden provocar otros efectos farmacológicos como somnolencia, náusea, sedación, vómito, depresión, dependencia física (Trescot, 2008).

### 2.11 Modelos animales para el estudio del dolor

Como se mencionó anteriormente, el dolor es una sensación compleja y su descripción es bastante arbitraria pues su percepción depende del individuo en cuestión, sin embargo, el avance de las investigaciones en cuanto al campo de la nocicepción es gracias a la utilización de modelos animales de dolor. Para que esto fuese posible, la definición de dolor de la IASP fue modificada.

De este modo, el dolor en animales se define como “una experiencia sensorial aversiva causada por una lesión real o potencial que produce reacciones motoras y vegetativas progresivas desencadena un comportamiento aprendido de evitación y puede modificar comportamientos específicos de la especie, incluyendo los sociales” (Zimmerman, 1986; Langford *et al.*, 2010).

Por lo tanto, en este sentido, un modelo de dolor es el procedimiento por el cual se valora la reacción de un animal ante un estímulo nocivo inducido que puede ser utilizado en circunstancias fisiológicas o patológicas.

#### 2.11.1 Modelo de “Writhing”

La prueba de contorsiones abdominales inducidas por ácido acético o prueba de “Writhing”, se considera como una herramienta de detección para evaluar agentes analgésicos o antiinflamatorios. En dicho modelo, el dolor se induce mediante la inyección de agentes irritantes en la cavidad peritoneal de los ratones (Koster *et al.*, 1959; Singh & Majumdar, 1995), y como consecuencia los animales reaccionan con un comportamiento ya sea de estiramiento, extensión de las patas traseras, giro de su cuerpo o tronco y/o con una contracción del abdomen en la que su panza alcanza a tocar el piso de la superficie donde se está evaluando (Burke *et al.*, 2016). Cualquiera de estos movimientos se considera una respuesta positiva para nocicepción (Mishra *et al.*, 2011). Por consiguiente, la actividad analgésica del compuesto de prueba se infiere a partir de una disminución en la frecuencia de los retorcimientos de los sujetos de estudio. Generalmente la observación de cada sujeto de estudio es de media hora después de la administración del compuesto prueba.

#### 2.11.2 Modelo de formalina

La prueba de formalina en ratones es un modelo válido y confiable de nocicepción puesto a que es sensible a varias clases de fármacos analgésicos. Dado que este modelo implica un dolor moderado y continuo induce una aproximación más acertada a las condiciones del dolor clínico, razón por la que se considera un modelo muy adecuado para medir este tipo de dolor. El estímulo nocivo es una inyección de formalina al 1% debajo de la piel de la superficie dorsal de la pata trasera. El modelo de formalina consta de dos fases, la primera fase refleja un dolor nociceptivo debido a la irritación química de la formalina subcutánea, la cual abarca de los 0-10 minutos, mientras que la segunda fase refleja un dolor de origen inflamatorio y va de los 10-30 minutos. La respuesta ante el dolor se mide con la cantidad de tiempo que los animales pasan lamiendo la pata inyectada además de un parámetro reflejo como las sacudidas de dicha extremidad (Hunskar & Hole, 1987).

### 3. JUSTIFICACIÓN

---

Hoy en día, la búsqueda de terapias alternativas efectivas y con pocos o nulos efectos adversos para tratar afecciones como el dolor, particularmente en México, se torna muy necesaria, debido a la prevalencia de la misma en la población nacional (aproximadamente en el 15% de la población), además de la existencia de pocas opciones en su tratamiento, las cuales, si bien tienen efectos positivos como analgésicos, suelen ser agresivas para los pacientes y desencadenar varios efectos secundarios fuertes a largo plazo.

Son varias las especies de *Salvia* que se utilizan en la medicina tradicional mexicana como alternativa a distintos males, sin embargo, la mayoría de éstas no se han estudiado de manera fitoquímica o farmacológica por lo que su estudio sin duda, aparte de corroborar el conocimiento tradicional, podría proponer extractos y/o compuestos activos pioneros de nuevas alternativas farmacológicas más inocuas con el cuerpo humano en el tratamiento de ciertas enfermedades. Existen antecedentes etnobotánicos de salvias mexicanas para el alivio del dolor, sin embargo, pocos estudios científicos corroboran dicho efecto, por lo que en este trabajo se plantea el estudio fitoquímico y la evaluación del efecto antinociceptivo de *S. involucrata* mediante las pruebas de estiramiento abdominal (“Writhing”) y formalina.

## 4. OBJETIVOS

---

### *Objetivo general*

Evaluar la actividad antinociceptiva de los extractos orgánicos y acuoso de *S. involucrata* y caracterizar al menos un compuesto a partir del extracto activo.

### *Objetivos particulares*

1. Obtener los extractos orgánicos y acuoso de *S. involucrata*.
2. Determinar la toxicidad oral aguda de los extractos (Dosis letal media, DL<sub>50</sub>).
3. Evaluar el efecto antinociceptivo de los extractos mediante las pruebas de estiramiento abdominal “Writhing” y formalina.
4. Aislamiento e identificación de por lo menos un metabolito del extracto activo.

## 5. HIPÓTESIS

---

Si los extractos de *S. involucrata*, contienen metabolitos secundarios con actividad antinociceptiva, entonces la conducta de dolor en los sujetos experimentales disminuirá en ambos ensayos (“Writhing” y formalina).



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 6.1 Colecta de material vegetal

*S. involucrata* (Figura 11) fue colectada en mayo de 2019 en La Trinidad, San Luis Potosí por la Dra. Eva Aguirre Hernández. Dicha localidad se encuentra en las coordenadas 21°23'28.3"N y 99°02'26.2"O y a una altitud entre 1402 m. y 1700 m. La identificación taxonómica de la especie fue realizada por la Dra. Martha Juana Martínez Gordillo del herbario de la Facultad de Ciencias, UNAM.



Figura 11. *Salvia involucrata*

### 6.2 Preparación de los extractos de la parte aérea de *S. involucrata*

#### Extractos orgánicos

Para la obtención de los extractos se utilizaron 1.2 kg de material vegetal, el cual se puso a secar a temperatura ambiente y a la sombra, posteriormente se trituro (Figura 12) y se pesó, esto último con el propósito de calcular su rendimiento posterior a la extracción.

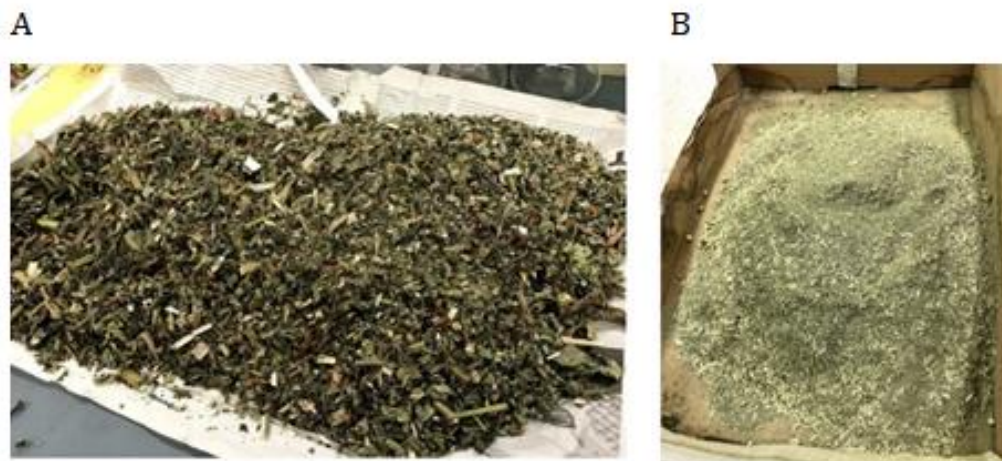


Figura 12. Parte aérea de *S. involucrata*. (A) Parte aérea seca; (B) parte aérea triturada

La molienda de la planta (1102 g) se colocó en dos frascos de vidrio para comenzar con la extracción por maceración utilizando solventes orgánicos de polaridad creciente, iniciando con hexano, seguido de acetato de etilo y finalizando con metanol. Se realizaron tres extracciones consecutivas de 48 h con cada disolvente con la finalidad de obtener el mayor rendimiento posible de metabolitos extraíbles. Pasadas las 48 h se filtró el material vegetal. El disolvente se eliminó mediante destilación a presión reducida con ayuda de un rotaevaporador para la obtención de los extractos. Posteriormente estos se introdujeron en una cámara de vacío para eliminar por completo los residuos de disolvente. Finalmente, los extractos fueron pesados y se obtuvo el rendimiento de cada uno de ellos (Figura 13).

#### Extracto acuoso

Para obtener el extracto acuoso, a 90 g de material vegetal se le adicionó 250 mL de agua destilada y se puso en ebullición durante 5 minutos. Posteriormente, la decocción se filtró y se congeló con nitrógeno líquido para su liofilización (HETO FD3, Heto-Holten A/S, Denmark).

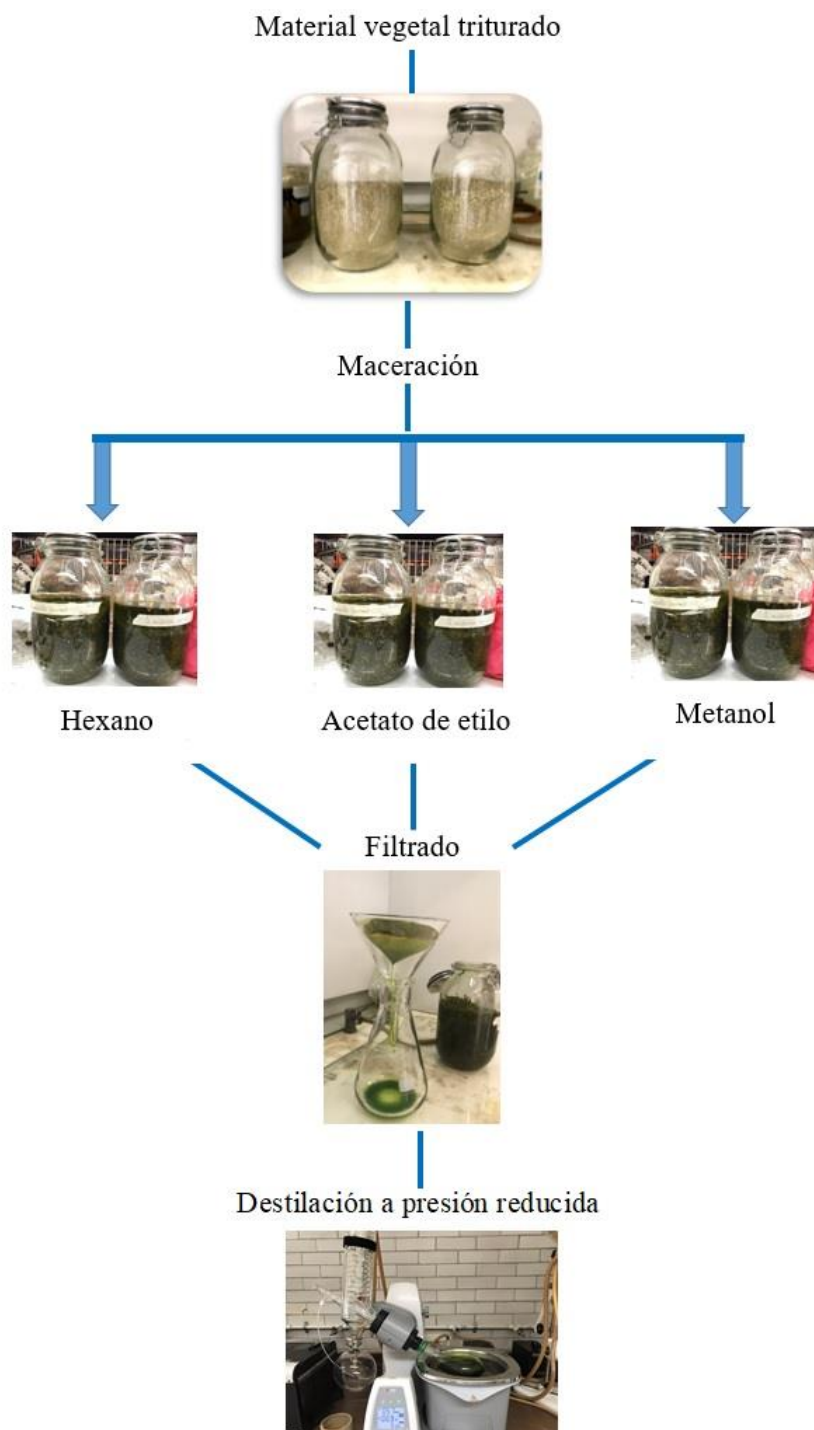


Figura 13. Proceso de obtención de los extractos orgánicos de *S. involucrata*.

### 6.3 Evaluación farmacológica

#### 6.3.1 Sujetos de estudio

El protocolo utilizado para la evaluación farmacológica de los extractos fue revisado y aprobado por la Comisión de Ética y Responsabilidad Científica de la Facultad de Ciencias, con número de Folio: T\_2019\_09\_002 / PI\_2019\_08\_001.

Se utilizaron ratones macho de la línea CD1 con un rango de peso de 25 a 30 g. Dichos sujetos experimentales estuvieron en el Bioterio de la Facultad de Ciencias en cajas de acrílico sin restricción de alimento y agua a temperatura controlada (22°C) con ciclos de obscuridad/luz de 12 h (Figura 14). En todo momento que fueron manipulados se siguieron los lineamientos y recomendaciones de la NOM-062-Z00-1999 y del comité de ética. Para evitar comportamientos agresivos entre ellos, los ratones se dividieron en cajas de acrílico de 6 individuos como máximo, además de colocarles enriquecimiento ambiental.



Figura 14. Ratones CD1 utilizados para la evaluación farmacológica de los extractos de *S. involucrata*.

#### 6.3.2 Preparación de extractos y fármacos de referencia

Los extractos de hexano y acetato de etilo se disolvieron con ayuda de Tween 80 al 0.5%, mientras que los extractos de metanol y acuoso solamente con solución salina (0.9%). Como fármacos de referencia se utilizó ketorolaco en el modelo de estiramiento abdominal y diclofenaco en la prueba de formalina, ambos disueltos en solución salina. Los fármacos y extractos fueron administrados vía oral (p.o.) en un volumen de 10 mL/kg.

Como agente nociceptivo en la prueba de “Writhing” se utilizó ácido acético al 1% diluido en solución salina, administrado vía intraperitoneal (i.p). Por su parte, para la prueba de formalina, tal como lo indica su nombre, se administró formalina al 1% vía intraplantar (20  $\mu$ L/pata). Aquellos individuos pertenecientes al grupo testigo fueron administrados únicamente con solución salina. Los tratamientos se prepararon el día de la evaluación farmacológica.

#### 6.3.3 Determinación de la toxicidad oral aguda

La evaluación de la toxicidad de los extractos se realizó de acuerdo con el protocolo de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE, 2001), el cual consiste en administrar una dosis máxima de 2000 mg/kg vía esofágica a tres ratones por extracto y tres más para el grupo control (solución salina al 0.9%) para determinar si se produce muerte (toxicidad aguda). Posterior a la administración, se registraron los efectos tóxicos como: pérdida de la locomoción, convulsiones, paro respiratorio o muerte durante 30 min y cada 2 h el primer día y diariamente hasta completar 15 días, registrando el peso durante este lapso de días. Al finalizar, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se les realizó una necropsia para llevar a cabo una exploración macroscópica con el fin de observar posibles efectos tóxicos en estómago, bazo, hígado, riñón y vesícula biliar.

#### 6.3.4 Evaluación del efecto antinociceptivo de los extractos de *S. involucrata*

La actividad antinociceptiva de los extractos fue determinada mediante los modelos de estiramiento abdominal “Writhing” y formalina. Los ratones se dividieron en 6 grupos de 6 individuos para evaluar los diferentes tratamientos (solución salina, fármaco de referencia, extractos de hexano, acetato de etilo, metanol y acuoso). Los extractos se administraron a la dosis de 300 mg/kg en ambos modelos, con el fin de determinar el o los más activos, de los que posteriormente se realizó una curva dosis respuesta utilizando las dosis de 3 y 30 mg/kg. Los fármacos de referencia ketorolaco y diclofenaco fueron administrados a 10 mg/kg, p.o. Treinta minutos después de la administración, los animales se sometieron de manera independiente a los modelos de estiramiento abdominal y formalina.

#### 6.3.4.1 Modelo de estiramiento abdominal “Writhing”

Los ratones fueron administrados oralmente con los extractos (Figura 15), pasados 30 minutos se les inyectó vía intraperitoneal (i.p.) ácido acético al 1%, provocando así irritabilidad en la cavidad peritoneal, la cual, a su vez, desencadena una conducta estereotipada: estiramientos de los miembros posteriores y contracciones abdominales (Collier *et al.*, 1968). El número de estiramientos se contó cada 5 minutos en un período total de 30 minutos después de la inyección del agente nociceptivo. El efecto antinociceptivo se estableció al comparar los grupos tratados con el grupo control.



Figura 15. Modelo de “Writhing”. (A) Administración de los tratamientos y (B) estiramiento abdominal de un ratón (conducta nociceptiva).

#### 6.3.4.2 Modelo de formalina

Los ratones fueron administrados con los extractos media hora antes de iniciar el experimento. Posteriormente, éstos fueron inyectados con 20  $\mu$ L de formalina al 1% en la extremidad posterior derecha, inmediatamente después de la administración del agente nociceptivo se contabilizó el tiempo que el ratón lamió su extremidad en intervalos de 1 minuto cada 5 minutos por un periodo de 30 minutos (Figura. 16).



En esta prueba se registran dos fases: la fase neurogénica que va de 0-10 minutos y corresponde a la activación de la fibra C como respuesta a un estímulo periférico; y la fase inflamatoria que abarca del minuto 10 al 30, la cual depende de la combinación de una reacción inflamatoria en el tejido periférico y cambios funcionales en la médula espinal (Tjølsen, *et al.*, 1992). La disminución de cualquiera de las fases se interpreta como efecto antinociceptivo (Hunskar & Hole, 1987).



Figura 16. Modelo de formalina.

#### 6.4 Fitoquímica de *S. involucrata*

##### 6.4.1 Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) del extracto de acetato de etilo de *S. involucrata*

El análisis de terpenoides y compuestos fenólicos del extracto de acetato de etilo de *S. involucrata* se realizó en un cromatógrafo marca Agilent serie 1100 equipado con un detector de arreglo de diodos. El extracto se preparó a una concentración de 50 mg/mL y se disolvió en acetato de etilo grado CLAR. Los estándares se prepararon a una concentración de 3 mg/mL. Las muestras se filtraron para eliminar impurezas mediante acrodiscos con membrana de nylon con una apertura de poro de 0.45  $\mu$ m. Se inyectaron 5  $\mu$ L del extracto y 10  $\mu$ L de los estándares.

La identificación de terpenoides y compuestos fenólicos se realizó comparando el tiempo de retención con el de los estándares adquiridos en Sigma-Aldrich. Para la cuantificación de los

compuestos se generaron curvas de calibración del compuesto de referencia, obtenidos bajo las mismas condiciones cromatográficas. Las curvas se construyeron con el modelo de regresión lineal  $Y = mx + b$  por medio del software ChemStation de Agilent Co.

En la identificación y cuantificación de terpenoides se utilizó una columna Zorbax Eclipse XDB-C8 (125 x 4.0 mm). La fase móvil fue acetonitrilo (ACN)/agua (80:20) con un flujo de 1 mL/min a una temperatura de 40 °C. El equipo se calibró a longitudes de onda de 215 y 220 nm con un tiempo de análisis de 25 minutos. Los estándares utilizados fueron: Estigmasterol, Ácido ursólico, Ácido oleanólico,  $\alpha$ -Amirina,  $\beta$ -Amirina y  $\beta$ -Sitosterol

Para el análisis de compuestos fenólicos se utilizó una columna C18 Hypersil ODS (125 mm x 4 mm y 5), con un gradiente de agua a pH 2.5 ajustado con ácido trifluoroacético/ACN 0-10 min, 85% de agua: 15% de ACN; 20 min, 65% de agua: 35% de ACN; 25 min, 65% agua: 35% ACN. El flujo fue de 1 mL/min y una temperatura de 30 °C. El equipo se calibró a las longitudes de onda de 254, 280, 316 y 365 nm y el tiempo de análisis fue de 30 min. Los estándares de ácidos fenólicos utilizados fueron Ácido clorogénico, cafeico, ferúlico, gálico, sinápico y siríngico. En cuanto a los flavonoides, los estándares fueron Apigenina, Canferol, Floretina, Florizina, Galangina, Isoramnetina, Luteolina, Naringenina, Quercetina y Rutina.

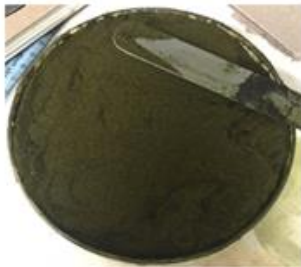
#### 6.4.2 Aislamiento de metabolitos secundarios de los extractos de *S. involucrata* mediante cromatografía en columna

Los extractos de acetato de etilo y de metanol presentaron el mejor efecto antinociceptivo en las pruebas biológicas, por lo que se prosiguió a hacer la separación de sus componentes, con el fin de aislar y purificar algún compuesto de estos.

En cuanto al extracto de acetato de etilo, se colocaron 38.65 g del extracto en una columna de vidrio, previamente empacada con gel de sílice (Figura 18). La columna se inició con hexano al 100%, posteriormente siguió una mezcla de hexano y acetato de etilo 9:1, yendo en polaridad creciente hasta llegar a 100% de acetato de etilo, a continuación, se utilizaron mezclas de acetato de etilo y metanol (9:1 y 8:2) y metanol 100%. Por último, se usó etanol-agua (7:3) para finalizar la columna. En total se recolectaron 114 fracciones de 150 mL c/u (Cuadro 3), mismas que fueron reunidas con base en su similitud en el perfil cromatográfico observado al realizar la cromatografía en capa fina de las fracciones (Cuadro 4).



A



B



Figura 17. Preparación de la columna del extracto de acetato de etilo. (A) Extracto de acetato de etilo adsorbido en silica gel; (B) Columna del extracto de acetato de etilo.

Cuadro 3. Fracciones obtenidas de la cromatografía en columna del extracto de AcOEt.

<b>Disolventes</b>	<b>Proporción de los disolventes</b>	<b>Fracciones obtenidas</b>
Hexano	1	1-7
Hexano-Acetato	9:1	8-17
Hexano-Acetato	8:2	18-28
Hexano-Acetato	7:3	29-33
Hexano-Acetato	6:4	34-43
Hexano-Acetato	1:1	44-53
Hexano-Acetato	4:6	54-63
Hexano-Acetato	3:7	64-73
Hexano-Acetato	2:8	74-83
Hexano-Acetato	1:9	84-90
Acetato	1	91-97
Acetato-Metanol	9:1	98-103
Acetato-Metanol	8:2	104-109
Metanol	1	110-112
Etanol-Agua	7:3	113-114

Cuadro 4. Fracciones reunidas por similitud en los perfiles cromatográficos del extracto de AcOEt.

Fracciones reunidas	Fracciones sin reunir
1-7	8
9-10	11
12-16	36
23-24	52
25-31	103
32-35	109
33-36	
37-41	
42-43	
44-47	
48-51	
53-55	
56-59	
60-71	
72-82	
83-97	
98-102	
104-108	
110-114	

Los precipitados obtenidos de la columna del extracto de acetato de etilo se purificaron mediante la técnica de cristalización. Los compuestos se llevaron a la Universidad de Antioquia para elucidar su estructura mediante RMN- $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

Se realizó una columna cromatográfica del extracto de metanol, en el laboratorio de Química de Plantas Colombianas, perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Antioquia. Se adsorbieron 32.46 g del extracto y se añadieron a una columna de vidrio previamente empacada con gel de sílice (Figura 19). La elución de la columna se inició con hexano al 100%, yendo en polaridad creciente hasta llegar a 100% de acetato de etilo. Dicha polaridad se fue aumentando con el propósito de llegar a 100% de metanol donde se finalizó la columna.

En total se obtuvieron 205 fracciones de 50 mL c/u. (Cuadro 5), una de las señales para realizar los cambios de la fase móvil de la columna fue la colorimetría de las fracciones recolectadas. Finalmente se reunieron todas aquellas fracciones que presentaban un perfil cromatográfico similar según lo observado al realizar la cromatografía en capa fina de estas (Cuadro 6).

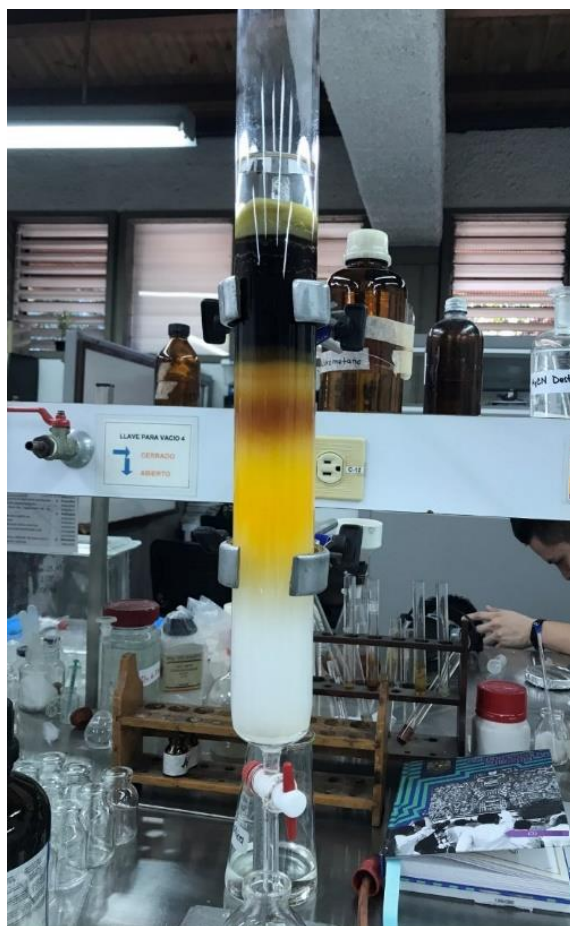


Figura 18. Columna correspondiente al extracto de MeOH

Cuadro 5. Fracciones obtenidas de la cromatografía en columna del extracto de MeOH

<b>Disolventes</b>	<b>Proporción de los disolventes</b>	<b>Fracciones obtenidas</b>
Hexano	1	1-5
Hexano-Acetato	9:1	5-16
Hexano-Acetato	8:2	17-27
Hexano-Acetato	7:3	28-38
Hexano-Acetato	6:4	39-49
Hexano-Acetato	1:1	50-60
Hexano-Acetato	4:6	61-68
Hexano-Acetato	3:7	69-75
Hexano-Acetato	2:8	76-89
Hexano-Acetato	1:9	90-101
Acetato	1	102-112
Acetato-Metanol	9:1	113-124
Acetato-Metanol	8:2	124-134
Acetato-Metanol	7:3	135-146
Acetato-Metanol	6:4	147-157
Acetato-Metanol	1:1	158-166
Acetato-Metanol	4:6	167-173
Acetato-Metanol	3:7	174-182
Acetato-Metanol	2:8	183-189
Acetato-Metanol	1:9	190-197
Metanol	1	198-205

Cuadro 6. Fracciones reunidas por similitud en los perfiles cromatográficos del extracto de MeOH.

Fracciones reunidas	Fracciones sin reunir
1-4	38
5-9	50
10-17	51
18-25	90
26-37	
39-49	
52-59	
60-71	
73-79	
80-89	
91-108	
109-118	
119-126	
127-135	
136-145	
146-156	
157-161	
162-169	
170-182	
183-190	
191-198	
199-205	

#### 6.4.3 Elucidación estructural de compuestos

Para elucidar la estructura del precipitado obtenido de la columna del extracto de acetato de etilo se realizaron análisis de resonancia magnética nuclear (RMN- $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ), utilizando un equipo marca Bruker a una frecuencia de 600 MHz (Figura 19).

Para comenzar dichos análisis fue necesario realizar una prueba de solubilidad al precipitado en diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) con el fin de determinar si dicho compuesto sería soluble en el solvente en el que se realiza el análisis, que en este caso corresponde a cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ). Comprobada la solubilidad, se procedió a empacar la muestra disolviendo el

compuesto en 650  $\mu\text{L}$  de  $\text{CDCl}_3$  en un tubo para resonancia para su posterior análisis espectroscópico.



Figura 19. Equipo de Resonancia Magnética Nuclear marca Bruker

#### 6.4.4 Análisis estadístico

Los valores obtenidos en el modelo de estiramiento abdominal se presentan como la media de los estiramientos totales  $\pm$  el error estándar de 6 sujetos experimentales. En la prueba de formalina los datos se grafican como el área bajo la curva. En ambos casos, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANADEVA), seguida de la prueba post hoc de Dunnett para la comparación de los tratamientos contra un grupo control. Se utilizó el programa GraphPad Prism versión 8.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Rendimiento de los extractos

El rendimiento de los extractos fue calculado con base en el peso del extracto obtenido con respecto al peso del material vegetal seco del que se partió inicialmente. Los rendimientos se muestran en el Cuadro 7, donde se observa que los extractos polares (metanol y acuoso) son los que se obtuvieron en mayor cantidad.

Cuadro 7. Rendimiento de los extractos

Peso seco	Extractos	Peso del extracto crudo (g)	Rendimiento (%)
<i>S. involucrata.</i> Parte aérea (1100 g)	Hexano	4.30	0.43
	Acetato de Etilo	23.30	2.2
	Metanol	30.15	2.75
<i>S. involucrata.</i> Parte aérea (120 g)	Acuoso	7.18	5.97

### 7.2 Determinación de la toxicidad oral aguda (DL<sub>50</sub>)

Ninguno de los extractos produjo efectos tóxicos (temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, pérdida de apetito, etc.) o mortalidad en la dosis probada de acuerdo con el protocolo de la OECD, 2001. Además, los ratones no presentaron pérdida de peso (Figura 20) ni daños macroscópicos en riñones, estómago, vesícula biliar o hígado por lo que la DL<sub>50</sub> es > 2000 mg/kg y se clasifica como categoría 5 o no tóxico de acuerdo con el Sistema Global Armonizado (GSH).



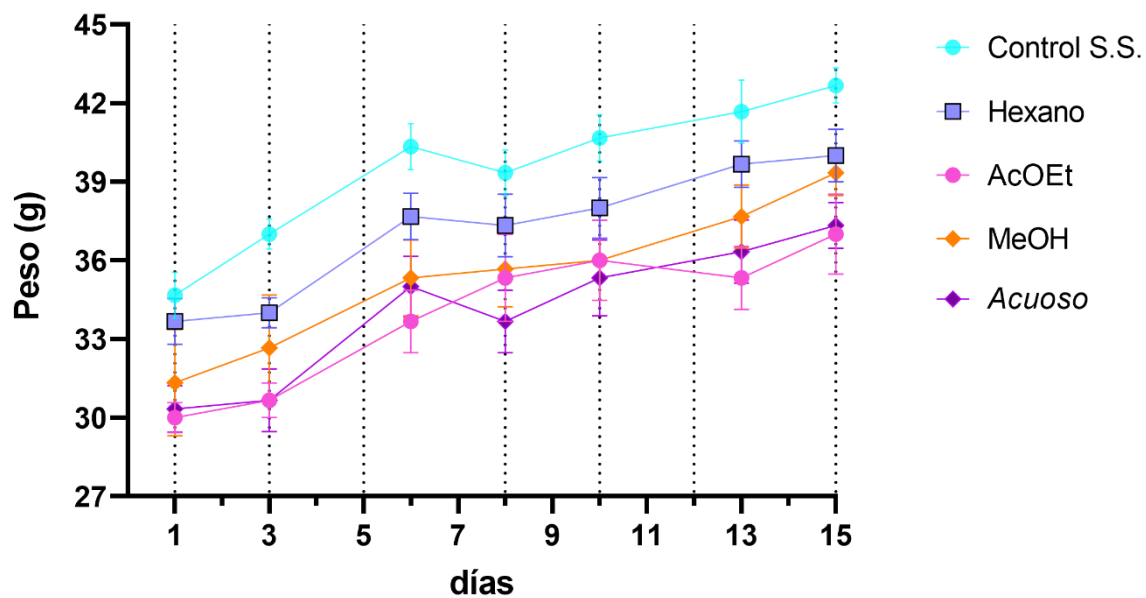


Figura 20. Gráfica de ganancia de peso de los sujetos experimentales.

## Farmacología

### 7.3 Evaluación del efecto antinociceptivo

#### 7.3.1 Modelo de “Writhing”

Todos los extractos evaluados presentaron actividad antinociceptiva significativa con respecto al control a la dosis de 300 mg/kg, p.o., siendo los más efectivos los extractos de acetato de etilo y metanol (Figura 21).

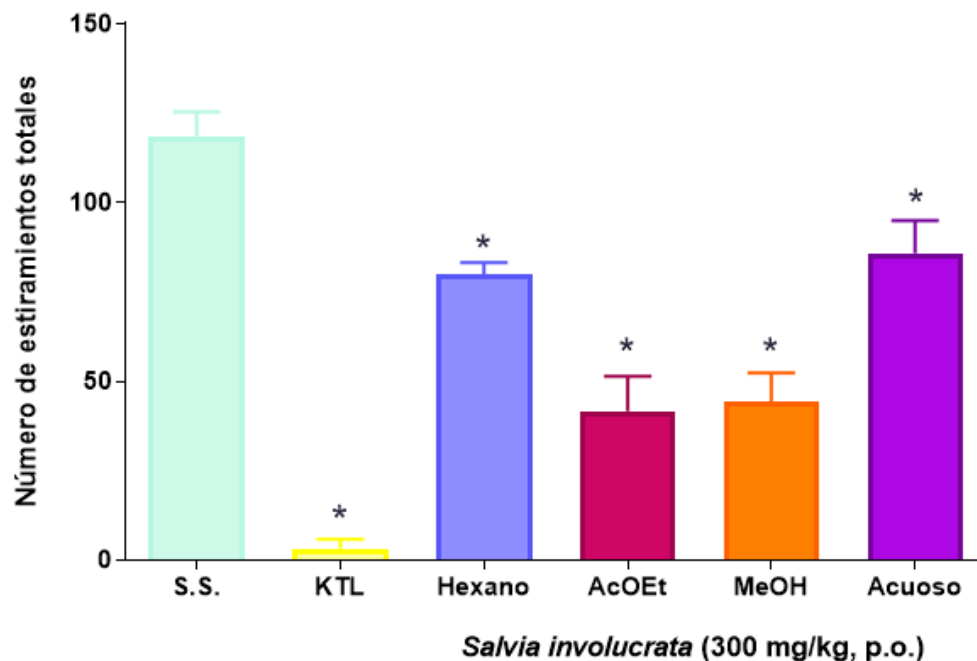


Figura 21. Evaluación del efecto antinociceptivo mediante la prueba de “Writhing”. Solución salina (S.S.), ketorolaco (KTL). Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar de los estiramientos abdominales totales de seis ratones. \* $p < 0.05$ .

### 7.3.2 Modelo de formalina

Todos los extractos evaluados, excepto el de hexano presentaron actividad antinociceptiva en la dosis de 300 mg/kg en la fase neurogénica, mostrando diferencias significativas con el control (Figura 22 A). Por otro lado, durante la fase inflamatoria, todos los extractos, a excepción del metanólico tuvieron efecto significativo con respecto al control.

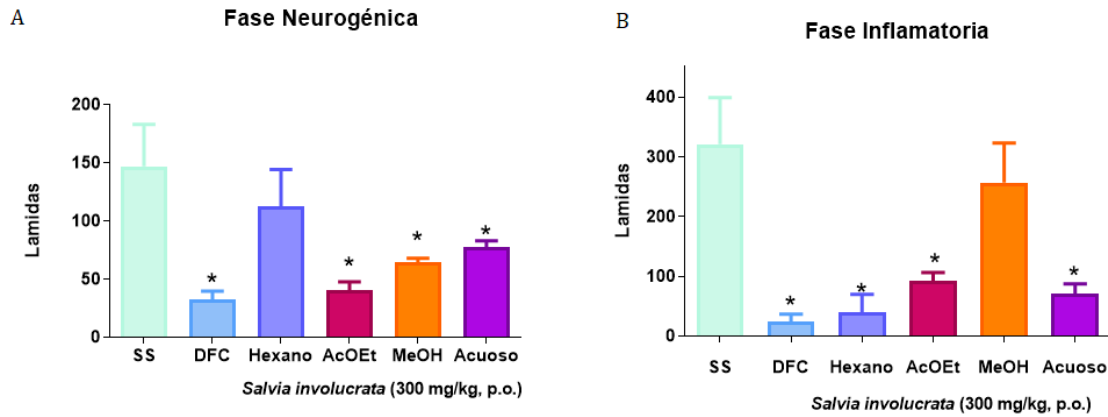


Figura 22. Evaluación del efecto antinociceptivo mediante la prueba de formalina. La gráfica muestra la relación entre lamidas (área bajo la curva) vs diferentes dosis evaluadas. (A) fase neurogénica, (B) fase inflamatoria. Solución salina (SS), diclofenaco (DFC). Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar de seis ratones. \* $p < 0.05$ .

A partir de los resultados observados en los ensayos biológicos se determinó que los extractos de acetato de etilo y metanol presentaron la mejor actividad antinociceptiva en ambos modelos, por lo que ambos extractos se probaron a las dosis de 3 y 30 mg/kg.

### 7.3.3 Curvas dosis-respuesta del extracto de AcOEt

#### - *Writhing*

El extracto de acetato de etilo mostró un comportamiento no dependiente de la dosis, observándose diferencias significativas con respecto al control a las dosis de 30 y 300 mg/kg (Figura 23).

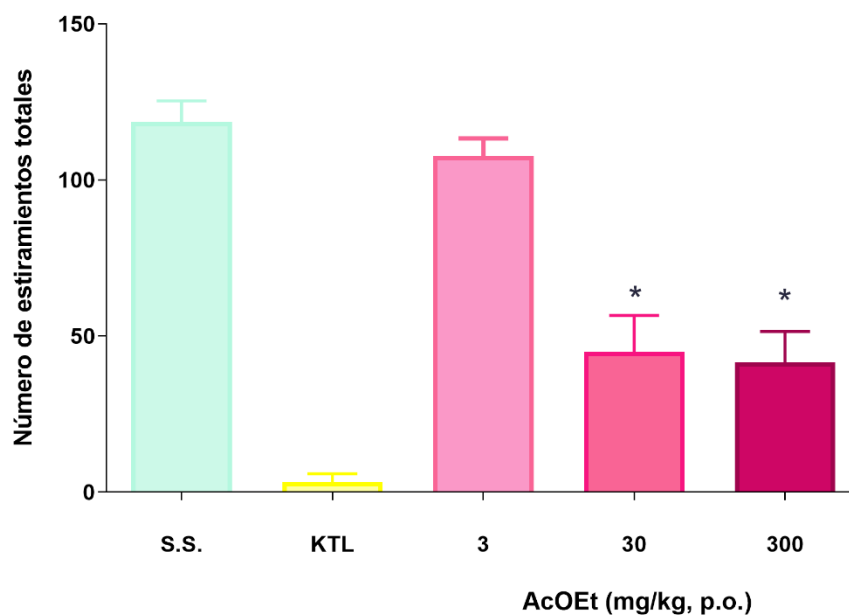


Figura. 23. Curva dosis-respuesta del extracto de AcOEt mediante el ensayo de “Writhing”. Solución salina (S.S.), ketorolaco (KTL). Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar de los estiramientos abdominales totales de seis ratones. \* $p < 0.05$ .

#### - *Formalina*

Las figuras 24 A y 24 B muestran que las tres dosis evaluadas tienen diferencias significativas con respecto al control en ambas fases: neurogénica e inflamatoria.

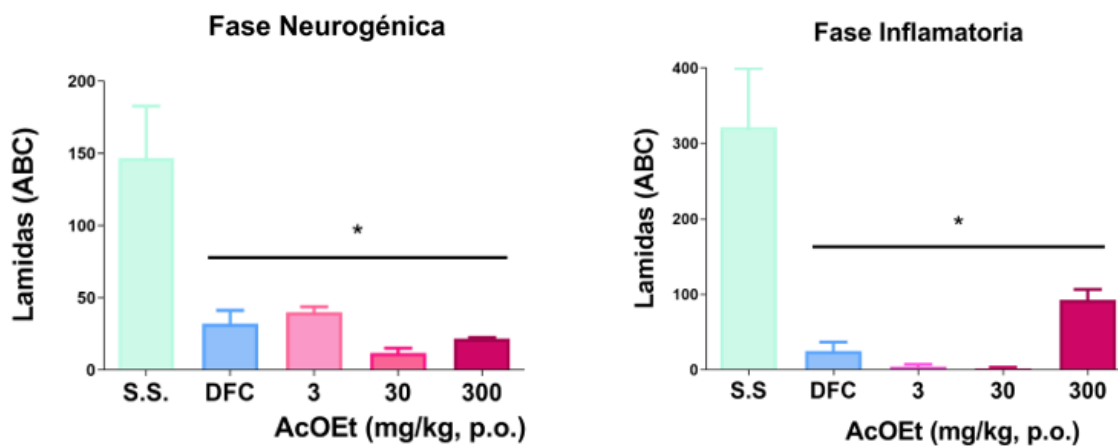


Figura. 24. Curva dosis-respuesta de la prueba de formalina del extracto de AcOEt. La gráfica muestra la relación entre lamidas (área bajo la curva) vs diferentes dosis evaluadas. Solución salina (S.S.), diclofenaco (DFC). (A) Fase neurogénica y (B) Fase inflamatoria. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar \* $p < 0.05$ .

#### 7.3.4 Curva dosis respuesta del extracto de MeOH

##### -Writhing

Los resultados obtenidos muestran que las dosis de 30 y 300 mg/kg presentan diferencias significativas con respecto al control. La dosis de 3 mg/kg reduce el número de estiramientos totales, sin embargo, no presenta diferencia significativa (Figura 25).

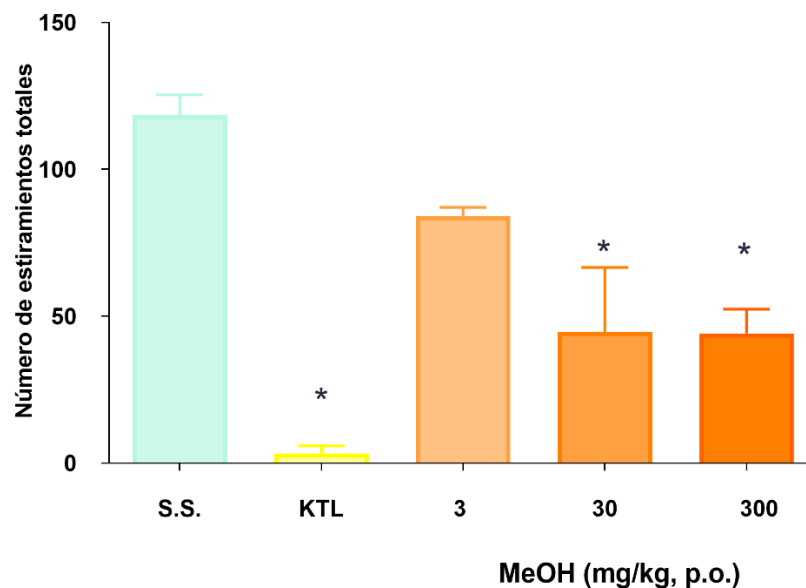


Figura 25. Curva dosis-respuesta del modelo de “Writhing” del extracto de MeOH. Solución salina (S.S.), ketorolaco (KTL). Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar de los estiramientos abdominales totales de seis ratones. \* $p < 0.05$ .

#### *-Formalina*

Los resultados obtenidos muestran que únicamente las dosis de 30 y 300 mg/kg presentaron diferencias significativas con respecto al control en la fase neurogénica (Figura 26 A). Por otro lado, durante la fase inflamatoria, la dosis que resulta no ser significativa con el control es la dosis de 300 mg/kg (Figura 26 B).

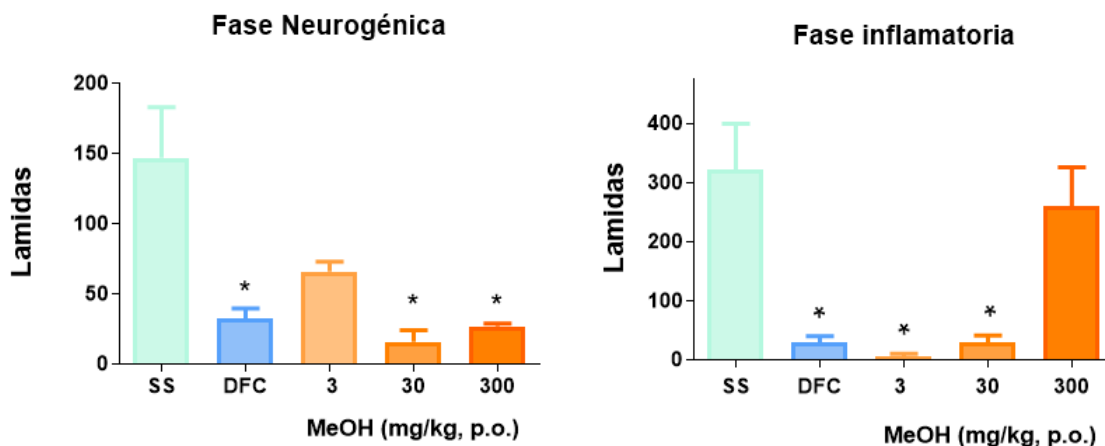


Figura 26. Curva dosis-respuesta de la prueba de formalina del extracto de MeOH. La gráfica muestra la relación entre lamidas (área bajo la curva) vs diferentes dosis evaluadas. Solución salina (SS), diclofenaco (DFC). (A) Fase neurogénica y (B) fase inflamatoria. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar \* $p < 0.05$ .

#### 7.4 Análisis por CLAR del extracto de AcOEt

El análisis cromatográfico del extracto de acetato de *S. involucrata* mostró un mayor número y abundancia de terpenoides (Cuadro 8). El Estigmasterol y el  $\beta$ -Sitosterol fueron los de mayor concentración con 38.98 y 35.07  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , respectivamente (Cuadro 8). El Ácido sinápico fue el único ácido fenólico identificado y a una baja concentración (0.048  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ). Con respecto a los flavonoides, la Apigenina, el Canferol, la Isoramnetina y la Quercetina fueron determinados en un rango de 0.129 a 0.395  $\mu\text{g}/\text{mg}$  (Cuadro 8).

Cuadro 8. Concentración de terpenoides y compuestos fenólicos identificados en el extracto de acetato de etilo de *Salvia involucrata* mediante CLAR.

Compuesto	TR (min)	Cantidad (µg/mg)
<b>Terpenoides</b>		
Ácido ursólico	2.68	15.58
Ácido oleanólico	4.39	5.83
Estigmasterol	2.98	38.98
α–Amirina	6.73	18.70
β–Sitosterol	18.32	35.07
<b>Ácidos fenólicos</b>		
Ácido sinápico	5.87	0.048
<b>Flavonoides</b>		
Apigenina	17.01	0.200
Canferol	17.35	0.395
Isoramnetina	18.66	0.305
Quercetina	13.34	0.129
TR: tiempo de retención		

#### 7.5 Elucidación estructural del compuesto aislado del extracto de AcOEt de *S. involucrata*

El fraccionamiento cromatográfico del extracto de acetato de etilo permitió purificar un compuesto de la fracción 17, con un rendimiento de 15.3 mg. Con los datos obtenidos mediante el uso de espectroscopia RMN-<sup>1</sup>H (Figura 27 y Cuadro 9) y RMN-<sup>13</sup>C (Figura 28 y Cuadro 10), los datos reportados en la *Human Metabolome Database* y en la *Spectral Database for Organic Compounds* y en concordancia con el análisis de CLAR dicho compuesto se identificó como Estigmasterol (24-etil-5,22-colestadien-3beta-ol).



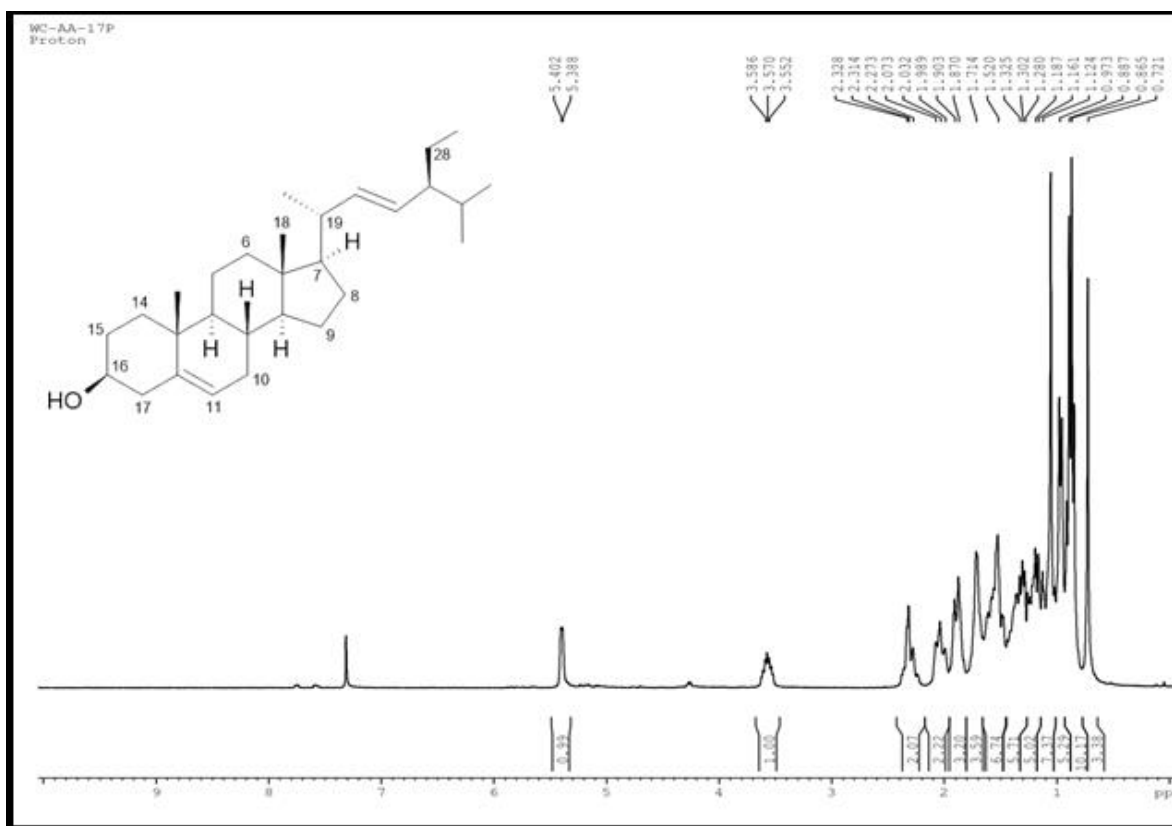


Figura. 27. RMN-<sup>1</sup>H del Estigmasterol

Cuadro 9. Señales del espectro de RMN-<sup>1</sup>H del Estigmasterol

No.	Átomo	Señal (ppm)
1	11	5.388
2	16	3.552
3	17	2.273
4	19,15,10	2.032
5	14	1.870
6	8	1.714
7	9,14,7,28,6	1.161
8	18	0.721

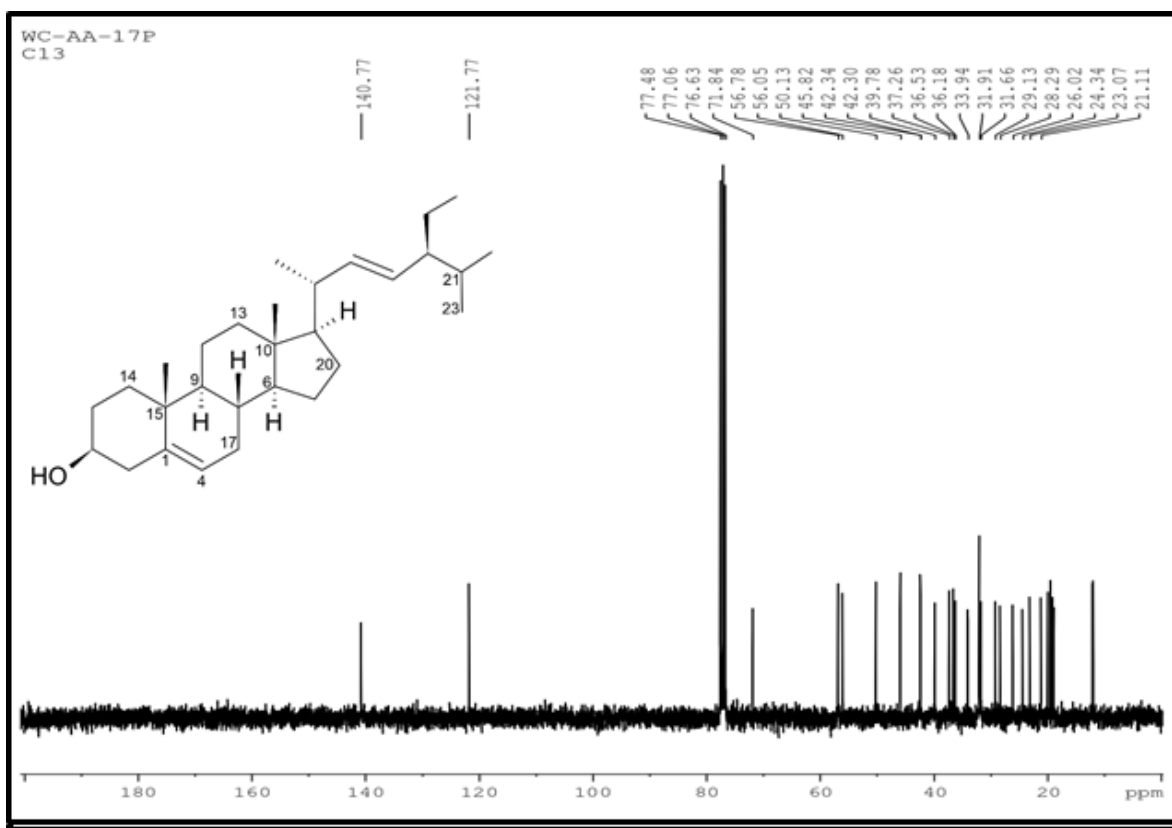


Figura 29. RMN- $^{13}\text{C}$  del Estigmasterol

Cuadro 10. Señales del espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del Estigmasterol

No.	Átomo	Señal (ppm)
1	1	140.77
2	4	120.17
3	6	56.05
4	9	50.13
5	10	42.37
6	13	39.78
7	14	37.26
8	15	36.18
9	17	31.66
10	20	28.29
11	21	24.34
12	23	21.11

#### 7.6 Cromatografía en columna del extracto de MeOH

Del extracto de metanol se obtuvieron cuatro precipitados correspondientes a las siguientes fracciones reunidas: 18-25, 26-37, 146-156 y 157-161. Debido a la contingencia por COVID-19, no fue posible continuar con su purificación, para su posterior elucidación estructural.

## 8. DISCUSIÓN

---

La evaluación *in vivo* de la toxicidad aguda de los extractos de *S. involucrata* determina que la DL<sub>50</sub> se encuentra por arriba de los 2000 mg/kg para todos los extractos evaluados pues ninguno de estos provocó signos de toxicidad y/o mortalidad, por lo que se les considera no tóxicos y dentro de la categoría 5 de acuerdo con la OCDE. La seguridad en el uso de esta salvia es consistente con los resultados obtenidos en otras especies del género, tal es el caso de *Salvia purpurea* Cav (Cuevas-Morales, 2022), *S. semiatrata* (Ortiz-Mendoza *et al.*, 2020) y *S. amarissima* (Moreno-Pérez, 2019) donde también se les reporta dentro de la categoría 5.

Dentro de la medicina tradicional mexicana, las Salvias han sido utilizadas como un recurso efectivo para el tratamiento de diversos problemas digestivos, dolor e inflamación, por mencionar algunos (Wu *et al.* 2012, Jenks & Kim 2013). Recientemente, diversas investigaciones farmacológicas han respaldado las propiedades antinociceptivas y antiinflamatorias de extractos y compuestos aislados de salvias mexicanas en diversos modelos murinos (Moreno-Pérez *et al.* 2019, 2021; Ortiz-Mendoza *et al.* 2020; Tlacomulco-Flores *et al.* 2020).

La administración oral de los extractos orgánicos, particularmente el de acetato de etilo y el de metanol de *S. involucrata* producen actividad antinociceptiva significativa en roedores en los modelos de estiramiento abdominal y formalina. Otros estudios han comprobado la efectividad antinociceptiva de los extractos de mediana y alta polaridad de salvias en el modelo de “Writhing”, como es el caso de *S. semiatrata*, donde los extractos de acetato de etilo y acetona/metanol presentaron actividad antinociceptiva (Ortiz-Mendoza, *et al.*, 2020) y el de *S. amarissima* donde dicho efecto se observó con los extractos de mediana y alta polaridad a la dosis de 300 mg/kg, siendo el extracto de mediana polaridad el que presentó mayor efectividad (Moreno-Pérez, 2019). Este último estudio coincide con los resultados obtenidos en este trabajo pues se observa que el extracto de acetato de etilo tiene el mejor efecto antinociceptivo en el modelo de estiramiento abdominal.

La evaluación en la prueba de formalina a la dosis de 300 mg/kg p.o. mostró que el extracto de hexano y el de metanol no fueron activos en la fase neurogénica e inflamatoria, respectivamente. Ambas fases tienen diferentes mecanismos de nocicepción, por un lado, la

fase neurogénica es aquella que comienza inmediatamente después de la inyección de formalina y abarca los primeros 10 minutos de la prueba como resultado de la activación directa de los nociceptores; mientras que la segunda fase que abarca de los 10 – 30 minutos, refleja un dolor de origen inflamatorio donde las prostaglandinas juegan un rol importante (Tjølsen *et al.*, 1992).

Se ha reportado que fármacos como la indometacina, naproxeno, hidroclorona y dexametasona presentan actividad antinociceptiva en la segunda fase (inflamatoria) de la prueba de formalina (Hunskarr & Hole, 1987), tal como se observa con el extracto de hexano. Por otro lado, también se ha documentado que analgésicos como la morfina, la codeína, el nefopam y la orfenadrina, presentan efectos antinociceptivos en ambas fases de esta prueba (Hunskarr & Hole, 1987). Este comportamiento se puede observar en los resultados obtenidos para el extracto de acetato de etilo y el extracto acuoso de *S. involucrata*, por lo que se puede inferir que estos extractos actuaron como un analgésico de acción central en los sujetos de estudio en este modelo.

Los datos derivados de las evaluaciones farmacológicas en este estudio han sido observados en otras especies de *Salvia*. Por ejemplo, los extractos hidroalcohólico (10-100 mg/kg, p.o.) y acuoso (10-1000 mg/kg) de *S. officinalis* mostraron tanto actividad antinociceptiva como antiinflamatoria en los modelos de “Writhing” y formalina en ratones (Rodrigues *et al.* 2012). Lo mismo se observó para los extractos de hexano, acetato de etilo y metanol de *S. divinorum* (100-400 mg/kg, p.o.) (Tlacomulco-Flores *et al.*, 2020).

Estudios fitoquímicos del género han demostrado que en los extractos de salvia están presentes una serie de metabolitos como Ácido ursólico, Estigmasterol y  $\alpha$ -Amirina (Imanshahidi & Hosseinzadeh, 2006) por mencionar algunos. Lo cual coincide con los resultados obtenidos mediante CLAR de *S. involucrata*, donde se identificaron 5 terpenos en el extracto de acetato de etilo, los cuales fueron: Ácido ursólico, Ácido oleanólico,  $\alpha$ -Amirina,  $\beta$ -Sitosterol y Estigmasterol; este último se logró purificar y elucidar estructuralmente mediante técnicas de RMN. Así mismo se observó que los terpenos fueron más abundantes con respecto a los compuestos fenólicos; resultados similares son reportados para *S. semiatrata* (Ortiz-Mendoza *et al.*, 2020) y para *S. amarissima* (Moreno-Pérez *et al.*, 2019).

Estudios previos han corroborado el efecto analgésico de algunos terpenos comunes en el género (Nogueira *et al.*, 2018). Se ha documentado la actividad antinociceptiva tanto del Ácido ursólico como el Ácido oleanólico en el modelo de “Writhing” (Maia *et al.*, 2006; González-Trujano *et al.*, 2012). En cuanto al estigmasterol, recientemente se comprobó su actividad antinociceptiva e inflamatoria en los modelos de placa caliente, “Writhing” y formalina; dichos efectos antiinflamatorios probablemente se encuentran mediados por receptores de glucocorticoides (Morgan *et al.*, 2021). En cuanto a la  $\alpha$ -Amirina se ha reportado que en combinación con  $\beta$ -Amirina inhiben la nocicepción en ambas fases del modelo de formalina (Otuki *et al.*, 2005). De igual forma, se ha demostrado que el  $\beta$ -Sitosterol disminuye la nocicepción en los modelos de placa caliente y “tail-flick” presentando un efecto dosis-dependiente, en dicho estudio Sakul y Okur (2021) concluyen que este terpeno actúa en el sistema nervioso central.

Con respecto a los compuestos fenólicos, los flavonoides detectados fueron la Apigenina, el Canferol, la Isoramnetina y la Quercetina. De dichos flavonoides, ya se han demostrado sus propiedades antinociceptivas, por ejemplo, se tiene registro de la actividad de la Apigenina en el modelo de “Writhing” a las dosis de 25 y 50 mg/kg, donde incluso se observa una mayor disminución de la conducta nociceptiva en comparación con el fármaco de referencia (diclofenaco 100mg/kg) (El Shoubaky *et al.*, 2016); para el caso del Canferol, la Isoramnetina y la Quercetina, se ha documentado su actividad antinociceptiva en las pruebas de formalina y placa caliente (Filho *et al.*, 2008; de Aquino, *et al.*, 2013; Hirota *et al.*, 2016). Es probable que la acción de estos metabolitos juegue un papel importante en la actividad del extracto de mediana polaridad de *S. involucrata*.

Particularmente del Ácido ursólico y la Quercetina se ha propuesto un mecanismo de acción favorecedor del efecto antinociceptivo, el cual, se atribuye a la capacidad de ambas moléculas para inhibir la expresión de la COX-2 (Lu *et al.*, 2010, Lesjak *et al.*, 2018), enzima encargada de la síntesis de PGs que son de gran importancia para los procesos inflamatorios. Tanto las PGs como los leucotrienos (LT) son mediadores de la respuesta inflamatoria; aumentan el flujo sanguíneo, la permeabilidad vascular y, en ciertas concentraciones, logran sensibilizar las terminaciones nerviosas, atenuando el dolor y la inflamación (Hassani *et al.*, 2015).

Los efectos antinociceptivos de las salvias principalmente se atribuyen a los terpenos. En un estudio reciente de *S. involucrata* aislaron y purificaron tres diterpenos neo-clerodanos, llamados involucratina A, involucratina B e involucratina C (Bustos-Brito *et al.*, 2021). Los terpenos neo-clerodanos son abundantes en especies de salvias, además, estructuras de este tipo han mostrado tener un efecto analgésico importante, como resultado de su alta afinidad con los receptores opioides (Nagase, 2011), tal es el caso de la Salvinorina A, molécula aislada de *S. divinorum* (Giroud *et al.*, 2000), el 7-ceto-neoclerodan-3,13-dien-18,19:15,16-diólida, aislado del extracto de acetato de etilo de *S. semiatrata* (Ortiz-Mendoza *et al.*, 2020), la amarisolida A obtenido de *S. amarissima* (Moreno-Pérez *et al.*, 2021) y la tilifodiolida aislada de *S. tiliifolia* (González-Chávez *et al.*, 2018).

Es posible que tanto los compuestos aquí identificados y sus respectivas concentraciones en el extracto de acetato de etilo, que fue el más activo, así como los terpenoides de tipo neo-clerodano aislados con anterioridad en *S. involucrata* sean los responsables del efecto antinociceptivo de dicho extracto.

## 9. CONCLUSIONES

---

En este estudio se presenta evidencia por primera vez del efecto antinociceptivo en modelos murinos de los extractos orgánicos y acuoso de *S. involucrata*, así como la presencia de compuestos fenólicos en el extracto de mediana polaridad. Así mismo, el consumo de esta planta es seguro en la dosis aguda evaluada, pues no se observaron efectos tóxicos.



## 10. REFERENCIAS

---

- Aguilar, A., Camacho, J.R., Chino, S., Jáckez, P., López, M.E. (1994). Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica. Instituto Mexicano del Seguro Social. México. 600 pp.
- Almaguer, G., García, R. & Vargas, V. (2009). La medicina tradicional indígena mexicana. En: Almaguer y Mas (Coord.). Interculturalidad en salud. Universidad Nacional Autónoma de México. P. 98.
- Alonso, J.R. (2003). Bosques y selvas tropicales como fuente de medicamentos. *Bol. Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 2 (2), 16-21
- Argueta, A., Gallardo, V. M. C., & Instituto Nacional Indigenista (México). (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. México, D.F: Instituto Nacional Indigenista.
- Argumedo-Delira, R., Parra-Delgado, H., Ramírez, T., Nieto, A., y Martínez, M. (2003). Isolation and Chemical Transformations of Some Anti-inflammatory Triterpenes from *Salvia mexicana* L. var. minor Benth. *Revista de la Sociedad Química de México*, 47 (2), 167-172
- Basbaum, A.I., Bautista, D. M., Scherrer, G. y Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* (139), 267-284. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.028
- Bautista, F. (2012). "Elucidación estructural y evaluacion de la actividad biologica de diterpenos tipo neo-clerodano aislados de *Salvia herbacea*, *S. shannoni* y *S. microphylla*". (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México, México. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/85112>
- Bedolla-García, B.Y. & Zamudio, S. (2017). Nueva especie de *Salvia* (Lamiaceae) del centro de México. *Phytoneuron* 66, 1–12.
- Bonica, J.J. (1990). The management of Pain (2<sup>nd</sup> ed.). Lea & Febiger, Philadelphia.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, 56(11), 317–333. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>
- Burke, A., Smyth, E. Fitzgerald, G. (2016). Agentes analgésicos-antipiréticos y antiinflamatorios; farmacoterapia de la gota En Goodman and Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica pp 673-680. México, D.F. McGraw-Hill.

- Bustos-Brito, C., Pérez-Juanchi, D., Rivera-Chávez, J., Hernández-Herrera, A. D., Bedolla-García, B. Y., Zamudio, S., Ramírez-Apan, T., Quijano, L., & Esquivel, B. (2021). Clerodane and 5 10-Seco-Clerodane-type diterpenoids from *Salvia involucrata*. *Journal of Molecular Structure*, 1237. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.130367>
- Chin, Y. W., Balunas, M. J., Chai, H. B., & Kinghorn, A. D. (2006). Drug discovery from natural sources. *The American Association of Pharmaceutical Scientists journal*, 8(2), E239–E253. <https://doi.org/10.1007/BF02854894>
- 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. *British journal of pharmacology and chemotherapy*, 32(2), 295–310. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1968.tb00973.x>
- Cuevas-Morales, C., Zavala-Ocampo, L. M., San Miguel-Chávez, R., González-Trujano, M. E., Basurto-Peña, F. A., Muñoz-Ocotero, V., & Aguirre-Hernández, E. (2022). Pharmacological evaluation of the antinociceptive activity and phytochemical analysis of active extracts of *Salvia purpurea* Cav. *Botanical Sciences*, 100(2), 383-396. <https://doi.org/10.17129/botsci.3013>
- Dawes, J., Andersson, D., Bennet, D., Bevan, S., McMahon, S. B. (2013). Inflammatory mediators and modulators of pain. Wall and Melzack's Textbook of Pain. 6, 48-67.
- de Aquino, A. B., Cavalcante-Silva, L. H. A., da Matta, C. B. B., Epifânio, W. A. D. N., Aquino, P. G. V., Santana, A. E. G., Alexandre-Moreira, M. S., & de Araújo-Júnior, J. X. (2013). The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae). *The Scientific World Journal*. <https://doi.org/10.1155/2013/218627>
- Echemendía-Salix, C.E. & Morón-Rodríguez, F.J. (2004). Tintura de hojas de *Psidium guajava* L. en pacientes con diarrea aguda simple. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 9(3).
- Esquivel, B. (2008). Rearranged Clerodane and Abietane Derived Diterpenoids from American *Salvia* Species. *Natural Product Communications*. 3(6), 989-1002. <https://doi.org/10.1177/1934578X0800300628>
- Esquivel, B. (2017). "Contribución al estudio químico sistemático del género *Salvia* (Lamiaceae) en México". (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México, México. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/88982>
- Esquivel-García, R., Pérez-Calix, E., Ochoa-Zarzosa, A., & García-Pérez, M. (2018). Ethnomedicinal plants used for the treatment of dermatological affections on the

- Purépecha Plateau, Michoacán, Mexico. *Acta botánica mexicana*, (125), e1339. <https://doi.org/10.21829/abm125.2018.1339>
- Filho, A. W., Filho, V. C., Olinger, L., & de Souza, M. M. (2008). Quercetin: further investigation of its antinociceptive properties and mechanisms of action. *Archives of pharmacal research*, 31(6), 713–721. <https://doi.org/10.1007/s12272-001-1217-2>
- Fink W. A., Jr (2005). The pathophysiology of acute pain. *Emergency medicine clinics of North America*, 23(2), 277–284. <https://doi.org/10.1016/j.emc.2004.12.001>
- Giroud, C., Felber, F., Augsburger, M., Horisberger, B., Rivier, L., & Mangin, P. (2000). *Salvia divinorum*: an hallucinogenic mint which might become a new recreational drug in Switzerland. *Forensic science international*, 112(2-3), 143–150. [https://doi.org/10.1016/s0379-0738\(00\)00180-8](https://doi.org/10.1016/s0379-0738(00)00180-8)
- Glick, L. B. (1967). Medicine as an Ethnographic Category : The Gimi of the New Guinea Highlands. *Ethnology* 6(1), 31–56.
- González-Chávez, M. M., Alonso-Castro, A. J., Zapata-Morales, J. R., Arana-Argáez, V., Torres-Romero, J. C., Medina-Rivera, Y. E., Sánchez-Mendoza, E., & Pérez-Gutiérrez, S. (2018). Anti-inflammatory and antinociceptive effects of tilifodiolide, isolated from *Salvia tiliifolia* Vahl (Lamiaceae). *Drug Development Research*, 79(4), 165–172. <https://doi.org/10.1002/ddr.21432>
- González-Trujano, M. E., Ventura-Martínez, R., Chávez, M., Díaz-Reval, I., & Pellicer, F. (2012). Spasmolytic and antinociceptive activities of ursolic acid and acacetin identified in *Agastache mexicana*. *Planta médica*, 78(8), 793–796. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1298416>
- Hassani, F. V., Rezaee, R., Sazegara, H., Hashemzaei, M., Shirani, K., & Karimi, G. (2015). Effects of silymarin on neuropathic pain and formalin-induced nociception in mice. *Iranian journal of basic medical sciences*, 18(7), 715–720.
- Hedge, C. (1992). A Global Survey of the Biogeography of the Labiatae. In: Harley, R.M. and Reynolds, T., Eds., *Advances in Labiatae Science*, Royal Botanic Gardens, Kew, 7-17.
- Heldt, H. (1997). *Plant biochemistry and molecular biology*. New York, Oxford University. 522 p.
- Hernández-Agero, T. O., Carretero Accame, M. E. & Villar del Fresno, A. M. (2002). *Salvia*. Fitoquímica, farmacología y terapéutica. *Farmacia Profesional*, 16(7), 60-64. Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia. UCM

- Hersch, M. (1999). De hierbas y herbolarios en el México actual. *Arqueología Mexicana*, 39, 60-65.
- Hirota, B. C. K., Paula, C. D. S., de Oliveira, V. B., da Cunha, J. M., Schreiber, A. K., Ocampos, F. M. M., Barison, A., Miguel, O. G., & Miguel, M. D. (2016). Phytochemical and antinociceptive, anti-inflammatory, and antioxidant studies of smilax larvata (Smilacaceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9894610>
- Huerta, C. (1997). La herbolaria: mito o realidad. CONABIO. *Biodiversitas* 12, 1-7.
- Human Metabolome Data Base [HMDB]. (2008). Showing metabocard for Stigmasterol (HMDB0000937). Recuperado de: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000937>.
- Hunskar, S., Hole, K. (1987). The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30, 103-114 [doi: 10.1016/0304-3959\(87\)90088-1](https://doi.org/10.1016/0304-3959(87)90088-1)
- Hunt, S. P., & Mantyh, P. W. (2001). The molecular dynamics of pain control. *Nature reviews. Neuroscience*, 2(2), 83–91. <https://doi.org/10.1038/35053509>
- Hyeh-Jean, J. Hee-Byung, C., So-Young, Park., Darrick, K. (1999). Preparation of amino acid conjugates of betulinic acid with activity against human melanoma. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 9(8), 1201-1204 [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(99\)00165-1](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(99)00165-1)
- Imanshahidi, M., & Hosseinzadeh, H. (2006). Pharmacology of Salvia on CNS 427 The Pharmacological Effects of Salvia species on the Central Nervous System. *Phytotherapy. Research*, 20, 427–437. <https://doi.org/10.1002/ptr>
- International Association for the Study of Pain. Subcommittee on Taxonomy (1979). Pain terms: a list with definitions and notes on usage. *Pain* 6 (3), 249-52.
- Islas, E. (2013). "Determinación del perfil de compuestos bioactivos fenólicos y triterpénicos pentacíclicos en salvia mexicana". (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/374238>
- Jacquier, C. (1997). El dolor: aspectos básicos y clínicos. Santiago de Chile: Mediterráneo.
- Jash, S., Gorai, D., Roy, R. (2016). Salvia genus and triterpenoids. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 7: 4710-4732.

- Jenks, A. A., & Kim, S. C. (2013). Medicinal plant complexes of *Salvia* subgenus *Calosphace*: An ethnobotanical study of new world sages. *Journal of Ethnopharmacology*, 146(1), 214–224. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.12.035>
- Jiménez-López, G., Debesa-García, F., Bastanzuri-Villares, T., Pérez-Peña, J., & Ávila-Pérez, J. (2003). Comportamiento de las reacciones adversas a los analgésicos y antiinflamatorios no esteroideos notificadas por el Sistema Cubano de Farmacovigilancia en el 2001. *Revista Cubana de Farmacia*, 37(3), 1.
- Kansal, A., & Hughes, J. (2016). Visceral pain. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, 17, (11), 543–547. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2016.08.013>
- Kantati, Y. T., Kodjo, K. M., Dogbeavou, K. S., Vaudry, D., Leprince, J., & Gbeassor, M. (2016). Ethnopharmacological survey of plant species used in folk medicine against central nervous system disorders in Togo. *Journal of Ethnopharmacology*, 181, 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.02.006>
- Koster, R., Anderson, M., De Beer, E.J., 1959. Acetic acid for analgesic screening. *Federation Proceedings* 18, 412.
- Kumar, M., Shete, A., Akbar, Z. (2010). A review on analgesic: from natural sources. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 1, 95–100.
- Lagarto-Parra, A., Tillán-Capó, J., Cabrera-González, Y. (1997). Toxicidad aguda oral del extracto fluido de *Mentha spicata* L. (hierbabuena). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 2(2), 6-8.
- Langford, D. J., Bailey, A. L., Chanda, M. L., Clarke, S. E., Drummond, T. E., Echols, S., Glick, S., Ingrao, J., Klassen-Ross, T., Lacroix-Fralish, M. L., Matsumiya, L., Sorge, R. E., Sotocinal, S. G., Tabaka, J. M., Wong, D., van den Maagdenberg, A. M., Ferrari, M. D., Craig, K. D., & Mogil, J. S. (2010). Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nature methods*, 7(6), 447–449. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1455>
- Lesjak, M., Beara, I., Simin, N., Pintać, D., Majkić, T., Bekvalac, K., Orčić, D., & Mimica-Dukić, N. (2018). Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. *Journal of Functional Foods*, 40, 68–75. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2017.10.047>
- Lima, C.F., Andrade, P.B., Seabra R.M., Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson, C. (2005). The drinking of a *Salvia officinalis* infusion improves liver antioxidant status in mice and rats. *Ethnopharmacology*, 97, 383–389.

- Liu, H., Ma, S., Xia, H., Lou, H., Zhu, F., Sun, L. (2018). Anti-inflammatory activities and potential mechanisms of phenolic acids isolated from *Salvia miltiorrhiza* f. *alba* roots in THP-1 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology* 222, 201–207.
- Loeser, J. D., & Treede, R. D. (2008). The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. In *Pain* 137(3), 473–477. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.04.025>
- López, F. A., Iturralde, F., Clerencia, S. M., Ortiz de Landázuri, J. (2007). Cap. 71 Dolor. En *Tratado de Geriatria* (pp. 721-731). Madrid, España: Ediciones En español.
- López-Lázaro, M. (2009). Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini Review of Medicine Chemistry*, 9, 31-59.
- Lozoya, X. 1999. Un paraíso de plantas medicinales. *Arqueología Mexicana* 39, 14-21.
- Maia, J.L., Lima-Junior, R.C., David, J.P., David, J.M., Melo, C.M., Campos, A. R., Santos, F.A., Rao, V.S. (2006). Oleanolic acid, a pentacyclic terpene attenuates capsaicin-induced nociception in mice: possible mechanisms. *Pharmacological Research*, 54, 282-286.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. & Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 79(5), 727-747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- Mann, J. Davidson, R.S. & Hobbs, J.B. (1994). Natural products. Their Chemistry and biological significance. Ed Longmann Cientific and Technical. Cap 5 Terpenoids, pp 289-359
- Martínez-Gordillo, M. Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M. R., Montiel, O. (2013). Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo, *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84(1), 30-86 <https://doi.org/10.7550/rmb.30158>
- Martínez-Gordillo, M., Bedolla-García, B., Cornejotenorio, G., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M. D. R., González-Gallegos, J. G., Lara-Cabrera, S. I., & Zamudio, S. (2017). Lamiaceae de México. *Botanical Sciences*, 95(4), 780–806. <https://doi.org/10.17129/botsci.1871>
- 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. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 83(1), 109–113. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2005.12.011>

- Mendoza, P.N. (2008). *Farmacología Médica*. México, Editorial Médica Panamericana.
- Merskey H. (1986). Classification of chronic pain. Descriptions of chronic syndromes and definitions. *Pain*, S3: S345-S356.
- Mertens, P., Blond, S., David, R., & Rigoard, P. (2015). Anatomy, physiology and neurobiology of the nociception: a focus on low back pain (part A). *Neuro-Chirurgie*, 61 Suppl 1, S22–S34. <https://doi.org/10.1016/j.neuchi.2014.09.001>
- Mishra, D., Ghosh, G., Kumar, P.S., Panda, P.K., (2011). An experimental study of analgesic activity of selective cox-2 inhibitor with conventional NSAIDs. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 4, 78–81.
- Misra, L. N., Dixit, A. K., & Sharma, R. P. (1997). High concentration of hepatoprotective oleanolic acid and its derivatives in *Lantana camara* roots. *Planta médica*, 63(6), 582. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957780>
- Molina-Mendoza J., Galván-Villanueva R., Patiño-Siliciano, A., Fernández-Nava, R. (2012). Plantas medicinales y listado florístico preliminar del municipio de Huasca de Ocampo, Hidalgo, México. *Polibotánica* 34, 239-271.
- Montgomery, P., Shank, B. C., Black, A. C. (2017). The role of pain classification systems in pain management. *Critical Care Nursing Clinics of North America*, 29, 407–418.
- Moreno-Pérez, G.F, Hernández-León, A., Valle-Dorado, M., Cano-Martínez, A., Narváez-González, F., Aguirre-Hernández, E., Salgado-Ceballos, H. & González-Trujano, M.E. (2021). Neo-clerodane diterpenic influence in the antinociceptive and anti-inflammatory properties of *Salvia circinnata* Cav. *Journal of Ethnopharmacology*, 268, 113550. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113550>
- Moreno-Pérez, G.F., Gonzalez-Trujano, M.E., Martínez-Gordillo, M.J., Miguel-Chávez, R., Basurto-Peña, F.A., Dorazco-González, A., & Aguirre-Hernández, E. (2019). Amarisolide A and pedalitin as bioactive compounds in the antinociceptive effects of *Salvia circinata* (Lamiaceae). *Botanical Sciences* 97(3): 355-365. <https://doi.org/10.17129/botsci.2187>
- Morgan, L. V., Petry, F., Scatolin, M., de Oliveira, P. V., Alves, B. O., Zilli, G., Volfe, C., Oltramari, A. R., de Oliveira, D., Scapinello, J., Müller, L. G. (2021). Investigation of the anti-inflammatory effects of stigmasterol in mice: insight into its mechanism of action. *Behavioural pharmacology* 32(8), 640–651. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000658>

- Munin, A., Edwards-Lévy, F. (2011). Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics*, 3(4): 793–829.
- Nagase, H. 2011. Chemistry of Opioids. London: Springer
- Nambo, C.A. 2015. Etnobotánica de Santiago Huaucilla, Oaxaca y evaluación farmacológica de *Zinnia peruviana*. (Tesis de Licenciatura). UNAM. Facultad de Ciencias. México, D.F., 119 pp.
- Neira, G. A. M., Ramírez, G. M. B. (2005). Actividad antibacteriana de extractos dos especies de guayaba contra *Streptococcus mutans* y *Escherichia coli*. *Actualidades Biológicas*. 27(1), 27-30.
- Newall C.A., Anderson L.A., Phillipson J.D. Herbal Medicines. (1996). A Guide for Healthcare Professionals. London: The Pharmaceutical Press: 231-248
- Niv, D., & Devor, M. (2004). Chronic Pain as a Disease in its Own Right. In *Pain Practice* 4 (3). <http://www.cochrane.org/>.
- Nogueira, A. O., Oliveira, Y. I. S., Adjafre, B. L., de Moraes, M. E. A., Aragão, G. F. (2018). Pharmacological effects of the isomeric mixture of alpha and beta amyrin from *Protium heptaphyllum* a literature review. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 22, 1–22.
- NOM-062-ZOO-1999. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. México, D.F., 22 de agosto de 2001.
- O'Neil, C. K., Hanlon, J. T., & Marcum, Z. A. (2012). Adverse effects of analgesics commonly used by older adults with osteoarthritis: Focus on non-opioid and opioid analgesics. In *American Journal of Geriatric Pharmacotherapy* 10(6), 331–342. <https://doi.org/10.1016/j.amjopharm.2012.09.004>
- OCDE (2001). Guiderline for testing of chemicals. Acute oral toxicity- acute toxic class method. Recuperado de: [https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/fedddocs/oecd/oecd\\_gl423.pdf](https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/fedddocs/oecd/oecd_gl423.pdf)
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (1978). Promoción y desarrollo de la medicina tradicional: informe de una reunión de la OMS. Serie de informes técnicos; no. 622. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/41183>
- Ortiz-Mendoza, N., Zavala-Ocampo, L.M., Martínez-Gordillo, M.J., González-Trujano, M.E., Basurto-Peña, F.A, Bazany-Rodríguez, I.J, Rivera, C.J.A., Dorazco-González, A, Aguirre-Hernández, E. (2020). Antinociceptive and anxiolytic-like effects of a neo-



- clerodane diterpene from *Salvia semiatrata* aerial parts. *Pharmaceutical Biology*, 58, 620-629. <https://doi.org/10.1080/13880209.2020.1784235>.
- Otuki, M. F., Ferreira, J., Lima, F. V., Meyre-Silva, C., Malheiros, A., Muller, L. A., Cani, G. S., Santos, A. R., Yunes, R. A., & Calixto, J. B. (2005). Antinociceptive properties of mixture of alpha-amyrin and beta-amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 313(1), 310–318. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.071779>
- Park, S.H., Sim, Y., Kang, Y., Kim, S., Kim, C., Kim, S., Suh, H. (2013). Mechanisms involved in the antinociceptive effects of orally administered oleanolic acid in the mouse. *Archives Pharmaceutic Review* 36, 905-911.
- Pinho-Ribeiro, F. A., Verri, W. A., Jr, & Chiu, I. M. (2017). Nociceptor Sensory Neuron-Immune Interactions in Pain and Inflammation. *Trends in immunology*, 38(1), 5–19. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.10.001>
- Pinho-Ribeiro, F. A., Zarpelon, A. C., Fattori, V., Manchope, M. F., Mizokami, S. S., Casagrande, R., & Verri, W. A., Jr (2016). Naringenin reduces inflammatory pain in mice. *Neuropharmacology*, 105, 508–519. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.02.019>
- Pironi, A. M., de Araújo, P. R., Fernández, M. A., Salgado, H. R. N., Chorilli, M. (2018). Characteristics, biological properties and analytical methods of ursolic acid: a review. critical reviews. *Analytical Chemistry* 48: 86–93.
- Puebla-Díaz, F. (2005). Tipos de dolor y escala terapéutica de la O.M.S.: Dolor iatrogénico. *Oncología (Barcelona)*, 28(3), 33-37.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L, Lamantia, A.S., James, O.M., Williams, S. (2001) Neuroscience. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates Nociceptors.
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria* 27(1), 76-89.
- El Shoubaky, G. A., Abdel-Daim, M. M., Mansour, M. H., & Salem, E. A. (2016). Isolation and Identification of a Flavone Apigenin from Marine Red Alga *Acanthophora spicifera* with Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities. *Journal of experimental neuroscience*, 10, 21–29. <https://doi.org/10.4137/JEN.S25096>

- Ramamoorthy, T. & Elliot M. (1998). Lamiaceae en México; diversidad, distribución, endemismo y evolución. En diversidad biológica de México; orígenes y distribución. México, Instituto de Biología, UNAM. p 501-525.
- Reisfield, A. S. (1993). The botany of *Salvia divinorum* (Labiatae). *SIDA, Contributions to Botany*, 15(3), 349–366. <http://www.jstor.org/stable/41967014>
- Riedel, W., & Neeck, G. (2001). Nociception, pain, and antinociception: current concepts. *Zeitschrift fur Rheumatologie* 60 (6), 404–415.
- Rivera H., Rosales D.F., Aguirre G.H., (2007). Recomendaciones específicas para el manejo del síndrome doloroso abdominal en los servicios de urgencias. *CONAMED*, 12(3), 4-23.
- Rodríguez-Hahn, L., Esquivel, B., Sánchez, C., Estebanes, L., Caidonas, R., Soriano-García, M., Toscano, R., Ramamoorthy, T. (1989). Diterpene isolated from *Salvia fruticulosa*. *Phytochemistry* 28, 567:570.
- Saeidnia, S., Gohari, A., Malmir, M., Moradi-Afrapoli, F. & Ajani, Y. (2011). Tryptophan and sterols from *Salvia limbata*. *Journal of Medicinal Plants*, 10, 41-44.
- Şakul, A. A., & Okur, M. E. (2021). Beta-sitosterol and its antinociceptive mechanism action. In *Ankara Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi*, 45(2), 238–252. University of Ankara. <https://doi.org/10.33483/jfpau.882831>
- Sarukhán, J., P. Koleff, J. Carabias, J. Soberón, R. Dirzo, J. Llorente-Bousquets, G. Halffter, R. González, I. March, A. Mohar, S. Anta & J. de la Maza. (2009). Capital natural de México. Síntesis: conocimiento actual, evaluación y perspectiva de sustentabilidad. *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*. México. D.F. México. 100 p.
- Simón-Arceo, K., González-Trujano, M. E., Coffeen, U., Fernández-Mas, R., Mercado, F., Almanza, A., Contreras, B., Jaimes, O., & Pellicer, F. (2017). Neuropathic and inflammatory antinociceptive effects and electrocortical changes produced by *Salvia divinorum* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 206, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.05.016>
- Singh, S., Majumdar, D.K., (1995). Analgesic activity of *Ocimum sanctum* and its possible mechanism of action. *International Journal of Pharmacognosy*, 33, 188–192.

- Sociedad Española del Dolor. (2016). Manual de Medicina del Dolor: Fundamentos, evaluación y tratamiento. España: Editorial Medica Panamericana.
- Spectral Database for Organic Compounds [SDOC]. (1999). SDBS-13C NMRSDBS No. 10900CDS-01-758. Recuperado de: [https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre\\_index.cgi](https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre_index.cgi)
- Tejon, M., Pérez, G., Gil M., Olivares, L., Rodrigo, C., Barreda, D. (2016) Fundamentos para una prescripción segura de AINES: riesgo cardiovascular, riesgo gastrointestinal y complicaciones renales. *Boletín Farmacoterapéutico de Castilla La Mancha*, (7), 1-11.
- Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*. 51(1), 5-17. doi: 10.1016/0304-3959(92)90003-T.
- Tlacomulco-Flores, L. L., Déciga-Campos, M., González-Trujano, M. E., Carballo-Villalobos, A. I., & Pellicer, F. (2020). Antinociceptive effects of *Salvia divinorum* and bioactive salvinorins in experimental pain models in mice. *Journal of ethnopharmacology*, 248, 112276. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112276>
- Topçu G. (2006). Bioactive triterpenoids from *Salvia* species. *Journal of natural products*, 69(3), 482–487. <https://doi.org/10.1021/np0600402>
- Trescot, A.M., Datta, S., Lee, M., Hansen, H. (2008). Opioid pharmacology. *Pain Physician* 11, 133-153.
- Turk, D.C., Okifuji, A. (2001). Pain terms and taxonomies of pain. Pain terms and taxonomies of Pain. In Loeser JD, ed. *Bonica's Management of Pain*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 17-24.
- Valitova, J. N., Sulkarnayeva, A. G., & Minibayeva, F. v. (2016). Plant sterols: Diversity, biosynthesis, and physiological functions. In *Biochemistry (Moscow)* 81(8), 819–834. Maik Nauka Publishing / Springer SBM. <https://doi.org/10.1134/S0006297916080046>
- Velasco L. 1999. Representación de algunas plantas medicinales en la arqueología. *Arqueología Mexicana*, 39: 24-29.
- 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 serotonergic synergism. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 110: 255-264.

- Walker, J. B., Sytsma, K. J., Treutlein, J., Wink, M. (2004). *Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe Mentheae. *American Journal of Botany*, 91(7), 1115–1125. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.7.1115>
- Walker, J. B., Sytsman., K. J., Treutlein, J., Wink, M. (2004). *Salvia* (Lamiaceae): Molecular phylogenetic evidence for multiple origins of the staminal lever. *Annals of Botany* 44, 211-278.
- Wu, Y. B., Ni, Z. Y., Shi, Q. W., Dong, M., Kiyota, H., Gu, Y. C., & Cong, B. (2012). Constituents from salvia species and their biological activities. *Chemical Reviews*, 112, (11),5967–6026. <https://doi.org/10.1021/cr200058f>
- Xiu-Chacón, G. A. (1998). El arte curativo de los Mayas y los primeros médicos de la Península de Yucatán, México. *Revista Biomédica* 9, 38-43.
- Xu, K., Chu, F., Li, G., Xu, X., Wang, P., Song, J., Zhou, S., Lei, H. (2014). Oleanolic acid synthetic oligoglycosides: a review on recent progress in biological activities. *Phamazie* 69, 483-495.
- Zimmermann M. (1986). Ethical considerations in relation to pain in animal experimentation. *Acta physiologica Scandinavica. Supplementum*, 554, 221–233.