



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRUEBAS DE CALIDAD Y EFICACIA DEL PREPARADO TRADICIONAL DE
Salvia microphylla KUNTH (LAMIACEAE)

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q.F.B. GABRIELA GARCÍA MARÍN

TUTORA:

DRA. RACHEL MATA ESSAYAG

FACULTAD DE QUIMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
VOCAL	Dra. Helgi Helen Francisca Jung Cook
VOCAL	Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava
VOCAL	Dra. María Eva González Trujano
SECRETARIO	Dra. Guadalupe Esther Ángeles López

Lugar donde se realizó el trabajo de tesis:

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

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó gracias al apoyo económico de los proyectos DGAPA PAPIIT IN203523 y CONACyT CB CY011226.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría (CVU 846078).

A la Dra. Rachel Mata por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, la confianza y apoyo para el desarrollo de este proyecto. Muchas gracias.

A la Dra. Araceli Pérez Vásquez por su paciencia, por todo el apoyo, tiempo y orientación que me brindó a lo largo de mis estudios.

A la Dra. Isabel Rivero Cruz, por su asesoría y apoyo técnico para el desarrollo de este proyecto.

Al M. en C. Rafael Torres Colín del Instituto de Biología de la UNAM, por su valioso apoyo en la identificación de la especie vegetal *Salvia microphylla*.

A la Dra. María Eva González Trujano del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz por su gran apoyo en la evaluación farmacológica de la especie estudiada y su valiosa aportación en este trabajo.

A los Dres. Ricardo Reyes Chilpa, Helgi Helen Francisca Jung Cook, Martha Lydia Macías Rubalcava y Dra. Guadalupe Esther Ángeles López por sus valiosos comentarios y aportaciones para la escritura de esta tesis.

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

A mis compañeros y amigos del laboratorio 124.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABLAS	8
RESUMEN	10
ABSTRACT.....	12
1. ANTECEDENTES.....	14
1.1. Generalidades del género <i>Salvia</i>	14
1.1.1. Fitoquímica	16
1.2. <i>Salvia microphylla</i>	17
1.2.1. Usos tradicionales	18
1.2.2. Composición química y propiedades biológicas de <i>S. microphylla</i>	18
1.3. Dolor y nocicepción	21
1.3.1. Dolor	22
1.3.2. Nocicepción	24
1.3.3. Tratamiento del dolor.....	25
1.3.4. Modelos de estudio.....	27
2. JUSTIFICACIÓN.....	30
3. HIPÓTESIS.....	31
4. OBJETIVOS.....	31
4.1. Objetivo general	31
4.2. Objetivos particulares.....	31
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL	32
5.1. Material vegetal	32
5.2. Preparación del extracto acuoso (EA).....	32
5.3. Obtención del aceite esencial (EO).....	32

5.4	Ensayos biológicos.....	33
5.4.1.	Animales	33
5.4.2.	Prueba de estiramiento abdominal.....	33
5.4.3.	Prueba de formalina	34
5.4.4.	Análisis estadístico	34
5.5.	Procedimientos generales.....	35
5.5.1.	Caracterización de compuestos aislados	35
5.5.2.	Análisis cromatográficos.....	35
5.6.	Estudios químicos de la especie <i>Salvia microphylla</i> Kunth.....	36
5.6.1.	Fraccionamiento y análisis del extracto acuoso	36
5.7.	Análisis de compuestos volátiles.....	41
5.7.1.	Análisis e identificación de compuestos volátiles mediante micro extracción en fase sólida con espacio de cabeza (MEFS-EC).....	41
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
6.1.	Evaluación del efecto antinociceptivo del preparado tradicional de <i>S. microphylla</i>	43
6.1.1.	Prueba de estiramiento abdominal	43
6.1.2.	Prueba de la formalina.....	45
6.2.	Estudio fitoquímico de la especie <i>Salvia microphylla</i>	49
6.3.	Análisis e identificación de compuestos volátiles	51
6.4.	Perfil cromatográfico del extracto acuoso	55
7.	CONCLUSIONES	59
8.	PERSPECTIVAS	60
	REFERENCIAS.....	61
	ANEXOS	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución del género <i>Salvia</i> (Lamiaceae).....	14
Figura 2. <i>Salvia microphylla</i> Kunth. (A) Flores vivas; (B) Planta completa fresca; (C) Distribución de la especie en territorio mexicano.	18
Figura 3. Sistema neuronal involucrado en la percepción del dolor.	23
Figura 4. Curso temporal del efecto antinociceptivo del EA en el modelo de estiramiento abdominal.	44
Figura 5. Efecto antinociceptivo de EA en el modelo de estiramiento abdominal.	44
Figura 6. Efecto antinociceptivo de EA en la prueba de formalina.	47
Figura 7. Efecto antinociceptivo de EO en la prueba de formalina.	48
Figura 8. Efecto antinociceptivo de AR en la prueba de formalina.	49
Figura 9. Compuestos aislados de <i>S. microphylla</i>	50
Figura 10. Cromatogramas de iones totales obtenido por CG-EM de compuestos volátiles de <i>S. microphylla</i> obtenidos por el método de MEFS-EC.....	52
Figura 11. Perfil cromatográfico CLAE-EM del extracto acuoso total con detección ESI (-).....	56
Figura 12. Espectros de masas (ESI-) de picos mayoritarios del perfil CLAE-EM. (A-B) Ácidos cafeoil-quinicos (C) Ácido rosmarínico.....	57

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Modelos de nocicepción.....	28
Tabla 2. Algunas plantas utilizadas en México para el alivio del dolor.....	30
Tabla 3. Compuestos volátiles de <i>S. microphylla</i> identificados por el método de MEFS-EC.....	53
Tabla 4. Compuestos volátiles identificados por CG-EM en aceite esencial de <i>S. microphylla</i>	54

ABREVIATURAS

ABC	Área Bajo la Curva
AcOEt	Acetato de etilo
A _R	Área relativa
CCA	Cromatografía en Columna Abierta
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CH ₃ OH- <i>d</i> ₄	Metanol deuterado
EA	Extracto acuoso
ESI	Ionización por electroespray
MeOH	Metanol
DMSO	Dimetilsulfóxido
H ₂ O	Agua
Hz	Hertz
<i>i.p.</i>	Administración intraperitoneal
IR	Espectroscopía de Infrarrojo
<i>S. microphylla</i>	<i>Salvia microphylla</i> Kunth (Lamiaceae)
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
CLAE	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
CLAE-EM	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplada a la Espectrometría de Masas
MEFS-EC	Microextracción en Fase Sólida en Espacio de Cabeza
MeOH	Metanol
MEXU	Herbario Nacional de México
mg	miligramo
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sodio
NX	Naloxona
OMS	Organización Mundial de la Salud
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de protón
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13
<i>s.c.</i>	Administración subcutánea
<i>t_R</i>	Tiempo de retención
TR	Tramadol
UV	Espectroscopía de luz Ultravioleta
VEH	Vehículo

RESUMEN

En el presente estudio se describe el potencial antinociceptivo del preparado tradicional (infusión) y aceite esencial de *Salvia microphylla* Kunth (Lamiaceae) en dos modelos animales: el de estiramiento abdominal “writhing” y la prueba de la formalina, ambos en ratones. Los resultados demostraron que la infusión (30, 100 y 300 mg/kg, s.c.) produce una respuesta antinociceptiva significativa con respecto al control que recibió el vehículo en el modelo de estiramiento abdominal. La dosis más baja se administró también por la vía intraperitoneal y la respuesta fue significativamente mejor, y comparable al del control positivo tramadol (30 mg/kg, i.p.). En la prueba de la formalina la infusión de la planta produjo un efecto antinociceptivo significativo a partir de la dosis de 100 mg/kg (i.p.) en la fase neurogénica. En la fase inflamatoria todas las dosis ensayadas (30, 100 y 300 mg/kg, i.p.) disminuyeron significativamente los comportamientos nociceptivos, en forma similar al control positivo tramadol. El compuesto mayoritario de la infusión, el ácido rosmarínico (**31**), demostró una participación en el efecto antinociceptivo del extracto en la prueba de formalina, especialmente en la dosis más alta (100 mg/kg, i.p.) en ambas fases del experimento.

La eficacia antinociceptiva del aceite esencial (10, 30 y 100 mg/kg, i.p.) se estableció en la prueba de formalina, donde se presenta un efecto dependiente de la dosis con respuesta significativamente diferente al vehículo a partir de la dosis de 30 mg/kg en ambas fases del experimento. Estos resultados dan sustento al uso tradicional de la planta para el alivio del dolor.

El estudio fitoquímico del extracto activo permitió el aislamiento de los ácidos 3-cafeoilquínico (**28**), 4-cafeoilquínico (**29**), 5-cafeoilquínico (**30**), y rosmarínico (**31**), además de cuatro flavonoides, la hesperetina (**32**), la orientina (**33**) y una mezcla (1:1) de hiperósido (**34**) e isoquercitrina (**35**), galactosódido y glucósido de la quercetina, respectivamente. El perfil cromatográfico del extracto acuoso indicó que los ácidos son los compuestos predominantes, en particular el ácido rosmarínico (**31**).

El volatiloama de *S. microphylla* fue analizado mediante microextracción en fase sólida del material vegetal, con exposición del espacio de cabeza a diferentes

fibras (polidimetilsiloxano, polidimetilsiloxano/divinilbenceno, divinilbenceno/carboxeno/polidimetilsiloxano y carboxeno/polidimetilsiloxano) y posterior análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Este análisis permitió establecer que el β -cariofileno (**21**), el γ -eudesmol (**24**), el β -eudesmol (**23**) y el deshidroxiisocalamendiol (**61**) son los compuestos mayoritarios del volátiloma. El aceite esencial, analizado por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, contiene principalmente α -eudesmol (**22**), guaiol (**59**), dihidroxiisocalamendiol (**61**), γ -eudesmol (**24**), β -cariofileno (**21**) y eucaliptol (**40**).

ABSTRACT

This study describes the antinociceptive potential of the traditional preparation (infusion) and essential oil of *Salvia microphylla* Kunth (Lamiaceae) in two pharmacological models, namely the writhing and formalin tests in mice. The results showed that the infusion (30, 100, and 300 mg/kg, s.c.) produced a significant antinociceptive response compared to the control group in the writhing test. The lower dose was also administered intraperitoneally, and the response was significantly better and comparable to that observed in the positive control tramadol (30 mg/kg, *i.p.*). In the formalin test, during the neurogenic phase, the infusion produced a significant antinociceptive effect at the higher doses (100 and 300 mg/kg) tested. In the inflammatory phase, all tested doses (30, 100, and 300 mg/kg, *i.p.*) significantly decreased the nociceptive behavior resembling that obtained with the positive control tramadol. Rosmarinic acid (**31**) showed participation in the antinociceptive effect of the extract in the formalin test, especially at the dose of 100 mg/kg (*i.p.*) in both phases of the experiment.

The antinociceptive efficacy of essential oil (10, 30, and 100 mg/kg, *i.p.*) was established in the formalin test; the pharmacological action was dose-dependent with a significantly different response from the vehicle at the dose of 30 mg/kg in both phases of the experiment. These results support the traditional use of this plant for the treatment of pain.

The phytochemical study of the active extract allowed the isolation of 3-caffeoylquinic (**28**), 4-caffeoylquinic (**29**), 5-caffeoylquinic (**30**), and rosmarinic (**31**) acids, as well as the flavonoids hesperetin (**32**), orientin (**33**) and a mixture (1:1) of hyperoside (**34**) and isoquercitrin (**35**). Compounds **34** and **35** are quercetin galactoside and glucoside, respectively. The chromatographic profile of the aqueous extract indicated that acids were the most abundant compounds, specially rosmarinic acid (**31**).

The plant material solid phase microextraction, expose to the headspace to polydimethylsiloxane, polydimethylsiloxane/divinylbenzene, divinylbenzene/carboxene/polydimethylsiloxane, and carboxene/polydimethylsiloxane fibers, and the subsequent analysis by gas

chromatography coupled to mass spectrometry allowed establishing the volatile composition of the plant. The main compounds were β -caryophyllene (**21**), γ -eudesmol (**24**), β -eudesmol (**23**) and dehydroxy-isocalamendiol (**61**). The essential oil analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry allowed the identification of the main compounds α -eudesmol (**22**), guaiol (**59**), dihydroxy-isocalamendiol (**61**), γ -eudesmol (**24**) β -caryophyllene (**21**) and eucalyptol (**40**).

1. ANTECEDENTES

1.1. Generalidades del género *Salvia*.

Salvia L., del latín *salvare* (ser salvado), es el género más rico en especies (~1000) de la familia Lamiaceae, que en su mayoría son aromáticas y perennes. México es considerado el lugar con mayor diversidad de especies de *Salvia* (~500), y de éstas 63 se localizan en el estado de Oaxaca (Cornejo-Tenorio e Ibarra-Manríquez, 2011; Hernandez-Leon et al., 2021).

La distribución de *Salvia* es casi cosmopolita (Figura 1) con los principales centros de diversidad en el suroeste de Asia y América (Lara-Cabrera, 2021). Las especies del género se han introducido en otras regiones del mundo con mucho éxito (Royal Botanic Gardens 2022).

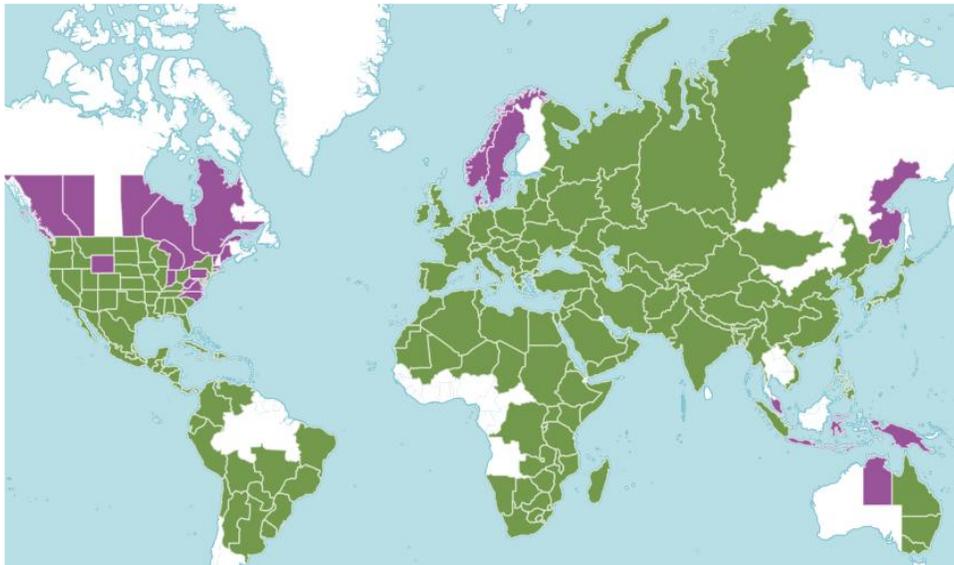


Figura 1. Distribución del género *Salvia* (Lamiaceae). Imagen obtenida de powo.science.kew.org [en línea]. Consultado el 17 de agosto de 2022. Código de color, verde: género nativo; morado: género introducido. Disponible en <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30000096-2>.

Las plantas son herbáceas con tallos tetraédricos, hojas simples, opuestas y decusadas carentes de estípulas y flores en inflorescencias bracteadas, cimosas o racemosas. Las flores son zigomorfas y pentámeras con cáliz bilabiado persistente

con cinco sépalos parcialmente soldados en una estructura tubulosa. La corola está constituida por cinco pétalos soldados.

Las especies del género *Salvia* tienen aplicaciones variadas entre las que destacan su uso ornamental, medicinal (Abd Rashed & Rathi, 2021; Afonso et al., 2021; Baricevic et al., 2001; Coffeen & Pellicer, 2019; Díaz, 2014; Ezema et al., 2022; Hafez Ghoran et al., 2022; Hernandez-Leon et al., 2021; Ortiz-Mendoza et al., 2022, 2022; Rodrigues et al., 2012; Valizadeh et al., 2021), alimenticio (Sharifi-Rad et al., 2018) y culinario (Kintzios, 2000). De acuerdo con revisiones recientes, muchas especies de *Salvia* tienen una amplia historia de uso medicinal; de tal forma, que la mayoría se emplea para el tratamiento de trastornos de los sistemas digestivo, genitourinario, nervioso y respiratorio (Ortiz-Mendoza 2022); otras se usan como agentes antidiabéticos, antioxidantes, hipolipemiantes (Alfonso et al., 2021; Rashed, et al., 2021), anticancerígenos, antivirales (Ezema et al., 2022; Hafez Ghoran et al., 2022), antibacterianos, antidepresivos, ansiolíticos, antifúngicos, antiprotozoarios, antinociceptivos, antiinflamatorios, neuroprotectores, y antihipertensivos (Hernandez-Leon et al., 2021; Ortiz-Mendoza et al., 2022). La propiedad medicinal de mayor interés para este trabajo es la analgésica, ya que el alivio del dolor es uno de los principales atributos de las especies del género (Baricevic et al., 2001; Hernandez-Leon et al., 2021; Rodrigues et al., 2012; Valizadeh et al., 2021; inter alia).

Las especies más conocidas a nivel global son *Salvia officinalis* L., *Salvia hispánica* L., *Salvia divinorum* Epling & Játiva-M y *Salvia miltiorrhiza*. La primera es de origen Mediterráneo y fue utilizada por los antiguos griegos y romanos para tratar varias enfermedades. Su uso se extendió durante la edad media, y hasta nuestros días se mantiene como agente curativo (Ghorbani & Esmailizadeh, 2017; Hamidpour et al., 2014; Pizani et al., 2022; Poullos et al., 2020). *Salvia hispánica* L. es originaria de México y Guatemala y tradicionalmente se ha cultivado en ambientes tropicales y subtropicales. Los aztecas y mayas la utilizaron con fines medicinales y ceremoniales. Los numerosos usos culinarios, medicinales, artísticos y religiosos convirtieron al grano y su harina en las materias primas más usadas de la época de la conquista española, formando parte de los cuatro granos

más importantes. Las semillas se usan actualmente como un alimento funcional, ya que contiene proteínas, antioxidantes, fibra dietética, vitaminas y minerales, y un alto contenido de un aceite rico en ácidos omega 3 (Motyka et al., 2022).

Salvia divinorum Epling & Játiva-M es conocida popularmente como "yerba María", es una planta mazateca utilizada en varias ceremonias rituales con fines adivinatorios; se dice que las hojas producen visiones. Sus propiedades se atribuyen a la presencia de un diterpenoide llamado salvinorina A, un agonista de los receptores opioides tipo K (Coffeen & Pellicer, 2019; Díaz, 2014).

Finalmente, *Salvia miltiorrhiza* Bunge, conocida también como salvia china o danshen, es muy valorada en la medicina tradicional china, principalmente para el tratamiento de afecciones cardiovasculares y cerebrovasculares. Además, sus propiedades anticancerígenas y hepatoprotectoras se han comprobado para tratar enfermedades del hígado y del sistema nervioso central (Jung et al., 2020).

1.1.1. Fitoquímica

Las especies de *Salvia*, gracias a su popularidad en la medicina tradicional y gran variedad de aplicaciones, han sido objeto de muchos estudios químicos. Al menos 134 especies de *Salvia* han sido analizadas químicamente, caracterizándose por la biosíntesis de sesquiterpenoides, diterpenoides, sesterpenoides, triterpenoides y flavonoides (Ortiz-Mendoza et al., 2022; Wu et al., 2012).

Los diterpenoides representan el grupo más numeroso con 545 compuestos identificados. A su vez, el subgrupo más grande de diterpenoides corresponde al de los abietanos con 365 entidades químicas, seguido por 138 clerodanos. Dos abietanos típicamente encontrados en el género *Salvia* son el ferruginol y el iguestol, mismos que presentan un anillo aromático. Otros abietanos comunes del género son la horminona, la 7-acetilhorminona y la roileanona; estos últimos han sido aislados de al menos 14 especies del género. Los derivados de isocarnosol son también comunes, en particular, el 16-hidroxycarnosol que ha mostrado actividad anticancerígena contra diferentes líneas celulares derivadas de tumores

humanos [A2780 (ovario) y HBL-100 (mama)]. Otros diterpenoides comunes en el género, incluyen al rosmanol, un 6,20-epoxiabietano, y la salvinatorina A.

Otro grupo de metabolitos especializados abundantes en las salvias son los triterpenoides, principalmente derivados del ácido oleanólico y el ursólico (Topçu, 2006).

Los compuestos fenólicos aislados del género incluyen monómeros y oligómeros de ácidos cafeicos los cuales son antioxidantes, anticoagulantes y protectores celulares (Wang et al., 2007). El ácido salvianólico L, un dímero de ácido rosmarínico, es uno de los más comunes.

El género *Salvia* también se caracteriza por la producción de flavonoides, incluidas flavonas, flavanonas, flavonoles, glicosilados o no (Veitch et al., 1998).

Finalmente, las especies de *Salvia* son ricas en aceites esenciales constituidos principalmente por monoterpenoides y sesquiterpenoides. Los monoterpenoides que se encuentran con mayor frecuencia en sus aceites son α -pineno, β -pineno, 1,8-cineol, mentol, limoneno, y γ -terpineno. Entre los sesquiterpenoides se encuentran el α -humuleno y el β -cariofileno. Estos compuestos son generalmente los responsables de los efectos analgésicos de estas plantas (Hafez Ghoran et al., 2022; Ortiz-Mendoza et al., 2022).

1.2. *Salvia microphylla*

Salvia microphylla Kunth, comúnmente llamada “mirto”, es un arbusto erecto de hasta 1.2 m, frecuentemente muy ramificado y fragante. Sus hojas son más anchas abajo que en la punta, con borde ondulado y pocos dientes. Tiene racimo de flores color rojo brillante (frecuentemente variable, por ejemplo, rosado o magenta) con dos a cuatro flores en la parte terminal de la planta (Figura 2) (Missouri Botanical Garden, 2022). Esta especie, originaria de México, se distribuye desde Arizona hasta Guatemala, y fue introducida con éxito en Argentina, Grecia, Marruecos, norte de Nueva Zelanda, Portugal, España, Texas, Túnez y Uruguay (Royal Botanic Gardens, 2022).

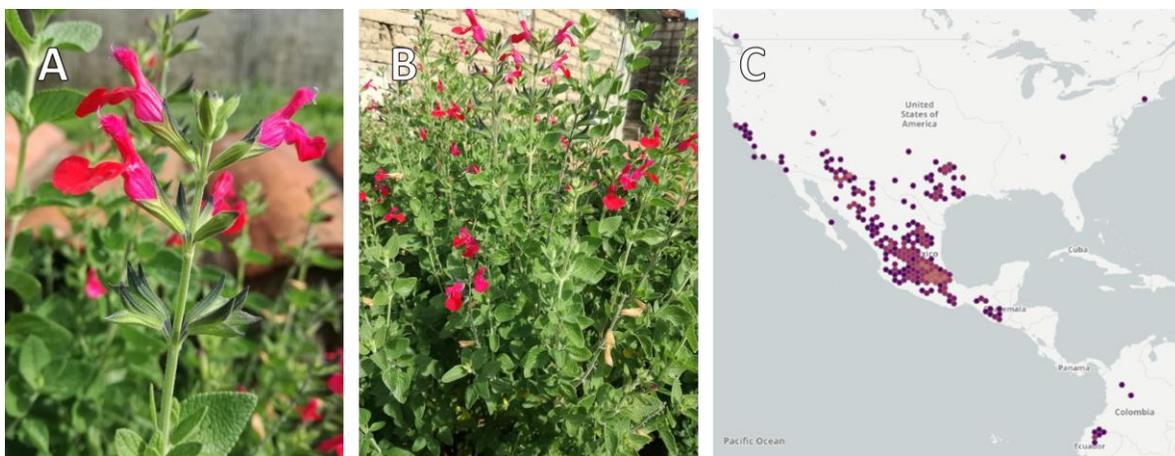


Figura 2. *Salvia microphylla* Kunth. (A) Flores vivas; (B) Planta completa fresca; (C) Distribución de la especie en territorio mexicano. Imagen obtenida de <https://www.gbif.org> [en línea]. Consultado el 22 de agosto de 2022. Disponible en <https://www.gbif.org/species/2927045>.

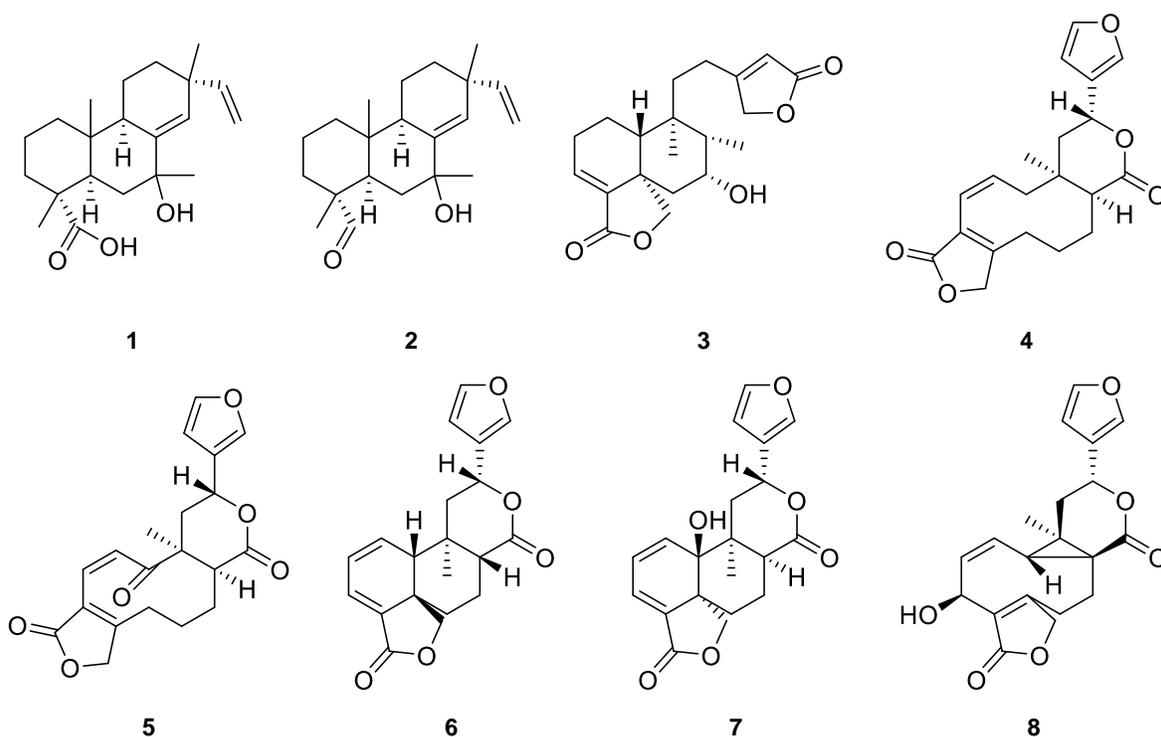
1.2.1. Usos tradicionales

La infusión de las hojas y flores del “mirto” se utiliza como somnífero, y para tratar problemas gastrointestinales, dolor e inflamación de estómago, diarrea, cólicos intestinales, e indigestión. En algunas regiones se hace referencia a su uso medicinal para problemas gineco-obstétricos como cólicos menstruales, hemorragia vaginal, infertilidad y limpieza postparto. También se ha documentado su aplicación para el dolor de oído. En algunas ocasiones la planta se usa externamente para aliviar la irritación de la piel, granulomas, reumas, y el lavado de heridas. Finalmente, cabe señalar que *S. microphylla* es altamente valorada para hacer “limpias” y el tratamiento de enfermedades culturales como “susto”, “mal de aire” y “mal de ojo” (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009; Jenks y Kim, 2013; Ordóñez Díaz, María de Jesús, 2018).

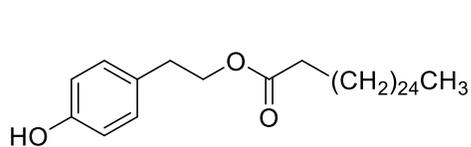
1.2.2. Composición química y propiedades biológicas de *S. microphylla*

A partir de un extracto elaborado con acetona de las hojas y tallos de *S. microphylla*, Esquivel et al. (1987) aislaron y caracterizaron el ácido 7 α -hidroxisandaracopimárico (**1**), el 7,15-isopimaradien-14 α -18-diol (**2**) y el 7 α -hidroxi-

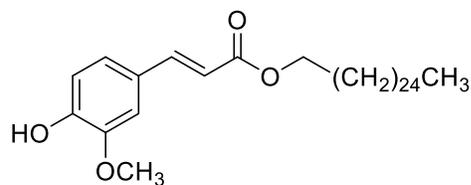
neoclerodano-3,13-dieno-18,19: 15,16-diolido (**3**). Posteriormente Bautista *et al.* (2013, 2014) obtuvieron a partir de un extracto de acetona de las hojas y flores de la planta dos nuevos 5,10-*seco-neo*-clerodanos, las salvimicrophyllinas A y B (**4** y **5**); dos nuevos *neo*-clerodanos, las salvimicrophyllinas C, D (**6** y **7**), y un clerodano denominado microphyllandiolido (**8**). El producto **8** presentó actividad antiprotozoaria, misma que podría estar asociada al uso de la planta para el tratamiento de diarrea y enfermedades estomacales (Calzada & Bautista, 2020).



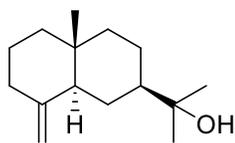
A partir del extracto de acetona de *S. microphylla* recolectada en Turquía, Aydoğmuş *et al.* (2006) lograron el aislamiento de nueve entidades químicas: dos ésteres fenólicos [éster de ácido 2-(*p*-hidroxifenil)etil eicosaheptanóico (**9**), hexacosilferulato (**10**)], varios sesquiterpenoides [β -eudesmol (**11**), 8 α -hidroxi- β -eudesmol (**12**)], triterpenoides [3-acetato de eritrodil (**31**), ácido oleanólico (**14**), lupeol (**15**) y β -sitosterol (**16**)] y un diterpenoide [ácido 12-metil éter carnósico (**17**)]. El extracto de la planta y el producto **17** mostraron actividad antibacteriana moderada contra *Staphylococcus aureus*.



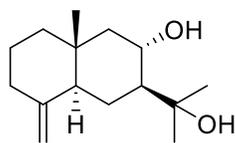
9



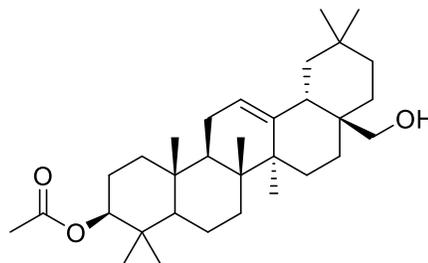
10



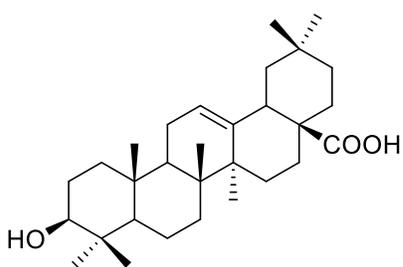
11



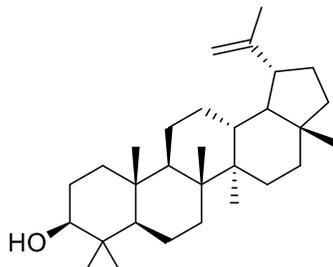
12



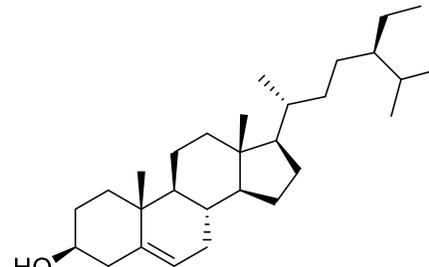
13



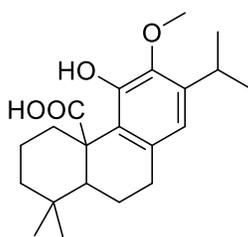
14



15

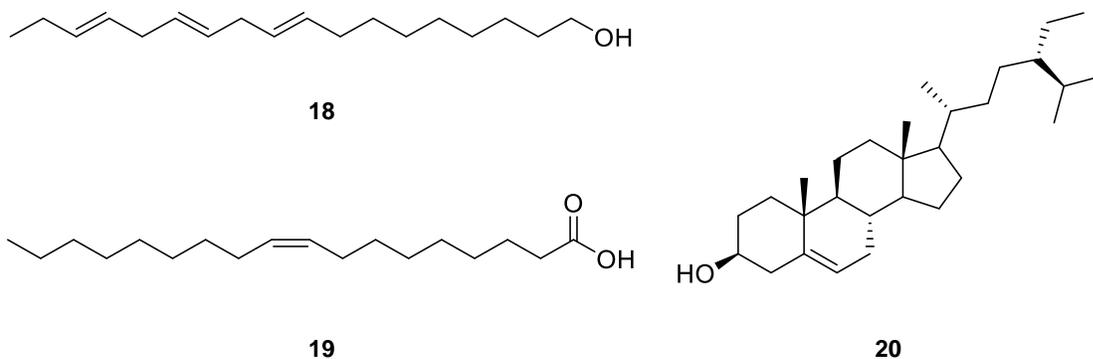


16

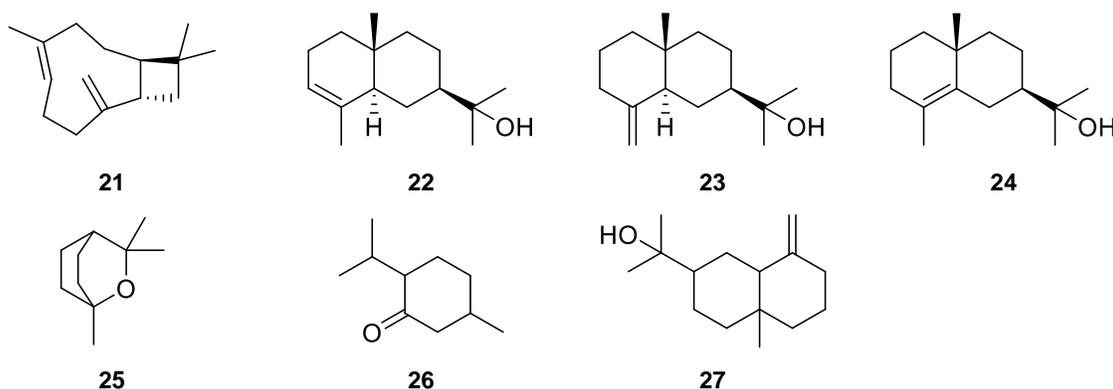


17

Salvia microphylla también ha sido investigada por su acción insecticida contra *Spodoptera frugiperda*. El extracto de hexano de las partes aéreas (tallo, hojas y flor) ocasionó mortalidad de las larvas y las pupas del insecto en un 65 % y 82.5%, respectivamente. Por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) se identificaron los compuestos mayoritarios del extracto activo que fueron caracterizados como los ácido palmítico (**18**) y oléico (**19**), y el β -sitosterol (**20**) (Romo-Asunción et al., 2016).



El aceite esencial de *S. microphylla* es también un eficiente bactericida y antioxidante, efectos que se asocian a sus compuestos mayoritarios: el β -cariofileno (**21**), varios isómeros del eudesmol (α , β y γ) (**22**, **23**, **24**), el 1,8-cineol (**25**), la *p*-mentan-3-ona (**26**) y el β -selinenol (**27**) (Chouit et al., 2021; Khadhri et al., 2022; Lima et al., 2012).



1.3. Dolor y nocicepción

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, 2021) define el dolor como una experiencia sensorial y emocional desagradable, que está asociada o que parece asociada a un daño tisular real o potencial. Aunque el dolor se refiera a la experiencia subjetiva del daño real o inminente, la nocicepción hace referencia al proceso fisiológico o patológico en la percepción del mismo. Las consecuencias de dicha codificación pueden ser autonómicas (por ejemplo, presión arterial elevada) o conductuales (reflejo de abstinencia motora o comportamiento nociceptivo más complejo). La complejidad de los sistemas nociceptivos, que

finalmente producen dolor, aumentó durante la evolución para evitar daños, lesiones o agravamiento de estas mismas (Mischkowski et al., 2018).

Aunque la nocicepción y el dolor parecen estar estrechamente relacionados, la evidencia clínica también demostró que pueden dissociarse uno del otro. Cuando es pertinente, la nocicepción y el dolor son críticos para la supervivencia. Ambos ofrecen un sistema de alarma que tiene la capacidad de iniciar una respuesta adaptada inmediata, puede evolucionar hacia mejores respuestas adaptativas a través del aprendizaje asociativo emocional. A pesar de esta importante función fisiológica, también es fundamental “silenciar” la nocicepción o el dolor cuando pierden su pertinencia como sistema de alarma, como es el caso en que una lesión o riesgo de lesión identificada se anticipa al dolor o cuando el dolor se vuelve crónico o se disocia de una lesión real (Barrot, 2012).

1.3.1. Dolor

El dolor no es simplemente una sensación generada por los nociceptores, sino un fenómeno perceptivo con cualidades emocionales particulares; la sensación del dolor debe ser tal que requiera una atención inmediata (Woolf, 2004). Parece tener dos propiedades: (a) una sensación corporal y (b) un efecto aversivo. Cada uno de estos, a su vez, puede caracterizarse a lo largo de otras dimensiones: la sensación puede ser externa (presión y temperatura) o interna (dolor y ardor), y el efecto puede pertenecer al nivel de excitación o emociones cualitativamente diferentes (ira, miedo o tristeza) (Fernandez & Turk, 1992).

En la Figura 3 se esquematiza el proceso de transmisión de dolor. Para lograr la percepción del dolor, terminaciones nerviosas, presentes en la mayoría de los tejidos del cuerpo, tienen receptores específicos del dolor que responden a estímulos dañinos o potencialmente dañinos. En segundo lugar, la terminación nerviosa sensible en el tejido y el nervio unido a ella forman una unidad denominada nociceptor aferente primario. El nociceptor aferente primario contacta con las neuronas de transmisión del dolor de segundo orden en la médula espinal.

Las neuronas de segundo orden transmiten el mensaje a través de vías bien definidas a los centros superiores (Osterweis et al., 1987).

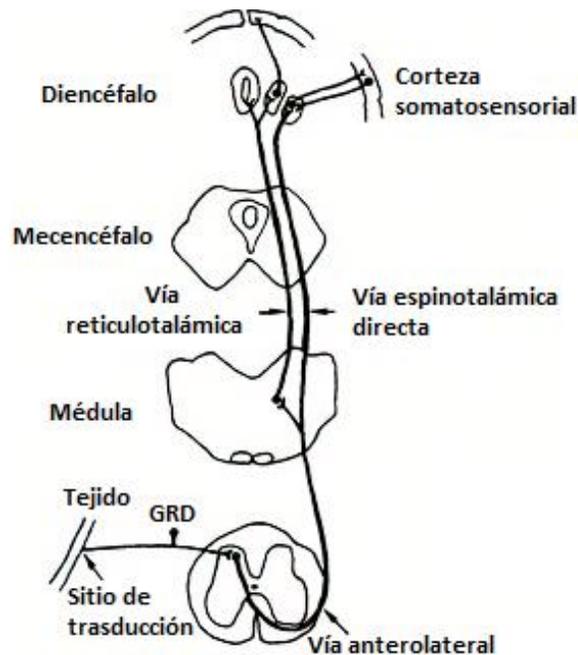


Figura 3. Sistema neuronal involucrado en la percepción del dolor. GRD: Ganglio de la raíz dorsal. Tomado de Institute of Medicine (US) Committee on Pain (1987) y traducido al español.

Generalmente el dolor se clasifica en diferentes tipos dependiendo del mecanismo fisiológico (Thai y Fainsinger, 2011):

- **Dolor nociceptivo:** Causado por la activación de las fibras nerviosas nociceptivas por destrucción física del tejido o por procesos químicos, térmicos o de presión. El dolor somático nociceptivo puede deberse a una lesión en la piel, los músculos, los tejidos blandos o los huesos y puede tener un fuerte componente relacionado con el incidente o el movimiento. El dolor nociceptivo visceral es normalmente difícil de localizar y constante.
- **Dolor neuropático:** Es causado por una lesión en el tejido nervioso, ya sea central, periférico o incluso del sistema autónomo. Muchas veces se difunde a través del nervio y sus raíces. Este tipo de dolor puede asociarse con disestesia (entumecimiento y hormigueo), hiperalgesia (respuesta

exagerada a un estímulo doloroso), dolor lacerante y alodinia (dolor experimentado por un estímulo que normalmente no produce dolor).

- Dolor nociplásico: Surge de la nocicepción alterada, no hay evidencia clara de daño tisular real o potencial que provoque la activación de los nociceptores periféricos, evidencia de enfermedad o lesión del sistema somatosensorial que causa el dolor. Aunque a menudo se busca un factor causal por lo general no es evidente. Los factores predisponentes comunes incluyen antecedentes familiares de dolor, antecedentes de experiencias dolorosas y factores psicosociales (Fitzcharles et al., 2021).
- Dolor inflamatorio: Es el incremento de la sensibilidad debido a una respuesta inflamatoria asociada al daño de un tejido, la percepción y respuesta a estímulos nocivos que se producen durante una respuesta inflamatoria o inmunitaria (Vasko, 2009).
- Dolor mixto: Es una superposición compleja de los diferentes tipos de dolor conocidos (nociceptivo, neuropático, nociplásico) en cualquier combinación, actuando simultáneamente y/o concurrentemente para causar dolor en la misma área del cuerpo. Cualquiera de los mecanismos puede ser clínicamente más predominante en cualquier momento. El dolor mixto puede ser agudo o crónico. Este tipo de manifestación del dolor es común en enfermedades como el cáncer (Freynhagen et al., 2019).

1.3.2. Nocicepción

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés), define nocicepción como el proceso neural de codificar estímulos nocivos, lo que quiere decir que es el proceso en el cual se incluyen los mecanismos con los cuales se identifica un estímulo dañino que es detectado por el sistema nervioso periférico, codificado, transferido y tratado (Barrot, 2012).

Un estímulo nocivo es aquel que puede causar daños en el tejido ya sea mecánico y por exposición a temperaturas extremas o daños químicos. La transducción del daño puede ser realizada por una variedad de nociceptores somatosensoriales

tanto en el sistema nervioso periférico como en vísceras y tejidos profundos (Sneddon, 2018). Los nociceptores hacen la transición del dolor agudo al dolor inflamatorio cuando persiste la duración del estímulo y los nociceptores liberan sus marcadores proinflamatorios, sensibilizando las células locales sensibles (Armstrong & Herr, 2022). El estudio nociceptivo tiene una gran significancia clínica, los individuos son conscientes de la presencia de una herida gracias a los nociceptores que se encuentran a lo largo del organismo y el tratamiento de estas heridas o daños son de suma importancia, por lo que la necesidad de modelos para su estudio es necesaria (Le Bars et al., 2002).

1.3.3. Tratamiento del dolor

A pesar de tener funciones de protección y alarma, el padecimiento de dolor es desagradable e incluso puede considerarse una enfermedad en sí misma cuando es crónico, y provoca debilidad en los individuos, insomnio, afectando las actividades diarias. El dolor es una de las principales razones por la que se busca atención médica y por lo tanto es fundamental conocer los diferentes mecanismos por los que se pueda atender, ya sean tratamientos alopáticos o tradicionales (Torres Méndez, 2020; Wang & Thyagarajan, 2022). Actualmente en México existen guías generadas para el tratamiento del dolor que dependen directamente de la evaluación de la intensidad (leve, moderado, y fuerte) (Torres Méndez, 2020).

Entre los fármacos más utilizados se encuentran los analgésicos antiinflamatorios, entre los que se encuentran el naproxeno, diclofenaco, celecoxib, etoricoxib; todos ellos actúan como inhibidores de enzimas ciclooxigenasas (COX-1 y 2) y por lo tanto reducen la formación de prostaglandinas (potentes inductores de inflamación). A pesar de la efectividad analgésica de estos medicamentos, también se conocen importantes efectos secundarios en el tracto gastrointestinal generados por la inhibición de COX-1 por lo que los inhibidores selectivos de COX-2, como el celecoxib y etoricoxib, son una buena opción de tratamiento para el dolor (Kidd & Urban, 2001; Wang & Thyagarajan, 2022).

Algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional han semejado los efectos analgésicos de estos fármacos, por ejemplo, el extracto de AcOEt de *S. officinalis*, así como el carnosol y ácido carnósico, presentes en la planta, demostraron disminuir la formación de prostaglandina E₂ (PGE₂), un mediador inflamatorio biosintetizado por COX-2, mediante la inhibición de la isoenzima PGE₂ Microsomal Sintasa-1 en sangre humana total (Bauer et al., 2012). El extracto metanólico de *S. miltiorrhiza* reduce la formación de prostaglandina D₂ y mediante un fraccionamiento biodirigido se determinó que la tanshinona I era el principio activo (Kim et al., 2002).

Otra familia de fármacos ampliamente utilizados para el tratamiento del dolor son los moduladores del sistema opioide, entre los que se distinguen opioides débiles (tramadol, codeína) y fuertes (buprenorfina, morfina, fentanilo) aunque su aplicación está limitada por el desarrollo de tolerancia (Lueptow et al., 2018). Los receptores opioides se encuentran típicamente ubicados en sistema periférico, y existen cuatro tipos: mu (μ), delta (δ), kappa (κ), y los de tipo 1 (ORL-1, por sus siglas en inglés). Los agonistas de estos receptores activan las mismas vías de transducción por mecanismos diferentes, lo que se traduce en diferentes efectos farmacológicos. Así, por ejemplo, los agonistas de los receptores μ como el fentanilo son muy eficaces para el tratamiento del dolor, pero provocan depresión respiratoria y estreñimiento; mientras que los agonistas de los receptores κ son analgésicos potentes, no causan depresión respiratoria ni producen dependencia, pero provocan disforia. Es importante señalar que el uso sinérgico de opioides con diferentes mecanismos tiene un gran potencial para el alivio del dolor y la disminución de los efectos secundarios (Álamo, 2016; Wang & Thyagarajan, 2022).

Algunas plantas del género *Salvia* han demostrado actividad antinociceptiva que involucran el mecanismo opioide, por ejemplo, los extractos acuoso y butanólico de hojas de *S. officinalis* (Qnais et al., 2010), el extracto de AcOEt de *S. circinnata*, (Fernando et al., 2021), y el extracto de AcOEt de *S. divinorum* (Tlacomulco-Flores et al., 2020).

En el tratamiento cotidiano del dolor también es común encontrar otros fármacos como el paracetamol (acetaminofen) que no cuenta con un mecanismo de acción claro; medicamentos antidepresivos que inhiben selectivamente la recaptación de serotonina y norepinefrina, como la duloxetina y el antidepresivo tricíclico amitriptylina; y medicamentos antiepilépticos, como la gabapentina y pregabalina, que son utilizados para el tratamiento de neuralgia y dolor neuropático mediante la regulación de canales de calcio, disminuyendo así la liberación de neurotransmisores excitatorios como el glutamato (Chincholkar, 2018; Milani & Davis, 2022).

1.3.4. Modelos de estudio

La investigación preclínica y la ciencia básica del dolor son objeto de estudios importantes para lograr un tratamiento eficiente del mismo. La investigación preclínica terapéutica debe asociar los modelos de dolor a las pruebas nociceptivas para ser relevantes.

La ausencia de comunicación verbal en animales es un obstáculo para la evaluación del dolor, hay circunstancias en las que puede surgir la duda si el animal realmente está sintiendo dolor (puede haber respuestas vocales como chillidos o gemidos). Por otro lado, es mucho más difícil asegurar que un animal no siente dolor porque no presenta signos físicos típicos o comportamientos evidentes, pero la única forma de determinarlo es por sus reacciones (Le Bars et al., 2002).

Cuando la información nociceptiva se detecta son generados una serie de eventos que incluyen: una respuesta conductual, reflejos somáticos y auto-somáticos, respuestas reflejas para proteger el organismo o llegar a la homeostasis. Estos sucesos permiten adaptar métodos para evaluar la nocicepción. Algunos modelos animales se basan en la latencia de la aparición de una conducta de evasión, generalmente un reflejo de retirada de la pata o la cola, la cual depende del umbral de estímulo (Barrot, 2012).

Los distintos modelos nociceptivos incluyen estímulos eléctricos, térmicos, mecánicos y químicos. Algunos de estos modelos (Tabla 1) se basan en la latencia de aparición de un comportamiento de evitación o en el umbral de estímulo necesario para provocar un comportamiento de evitación (Barrot, 2012).

Tabla 1. Modelos de nocicepción.

Modelo	Modalidad	Estímulo	Parámetro	Especie	Estándar
Retirada de cola	Térmico	T fija	Latencia de retiro (s)	Rata, ratón	+++
Plato caliente	Térmico	T fija	Latencia retirada/Salto (s)	Rata, ratón	+++
Plantar®	Térmico	T fija	Latencia de retiro (s)	Rata, ratón	+++
Plato frío	Térmico	T fija	Conteo (num)	Rata, ratón	+/-
Prueba de Acetona	Térmico	Aplicación en gota	Conteo (num) o duración (s) de comportamiento nociceptivo	Rata, ratón	+
Plato caliente dinámico	Térmico	Rampa de T	Conteo y umbral de respuesta (T)	Rata, ratón	+
Plato frío dinámico	Térmico	Rampa de T	Conteo y umbral de respuesta (T)	Rata, ratón	+/-
Von Frey	Mecánico	Presión fija múltiple	Umbral de retirada (g)	Rata, ratón	+++
Randall-Selitto	Mecánico	Rampa de presión	Umbral de retirada (g) o vocalización	Rata	+++
Prueba de formalina	Químico	Inyección de pata	Conteo (num)	Rata, ratón	+++
Jump-flinch	Eléctrico	Rampa de intensidad eléctrica	Umbral de retirada (μ A) o vocalización	Rata	+

+++; Clásico, modelo estandarizado; ++, prueba reciente; +, pruebas con algunas dificultades técnicas; +/-, procedimientos delicados; s, segundos; num, número; T, temperatura; g, gramos.

Los estímulos eléctricos son cuantificables, reproducibles, no invasivos y producen señales aferentes sincronizadas. Estos estímulos tienen muchas desventajas,

para empezar, no es un estímulo natural, el animal no lo encontraría en la naturaleza, pero permite estudiar los comportamientos de evitación o condicionamiento al miedo. Algunas respuestas que se observan al utilizar estimulación eléctrica son vocalización, estremecimiento o respuesta de escape (Barrot, 2012; Le Bars et al., 2002).

Los modelos que involucran temperatura son utilizados como un estímulo de dolor agudo con respuestas entre 5 y 10 s, la temperatura normalmente puede ser controlada y medida. Una ventaja es que los receptores involucrados en este proceso son más selectivos y por lo tanto indican un mecanismo nociceptivo más certero. El estímulo puede detenerse automáticamente una vez que se haya obtenido una respuesta del roedor para evitar o limitar el riesgo de quemaduras, a pesar de que estas pruebas permiten repeticiones, también puede haber variaciones por estrés en el animal. Por otro lado, los estímulos mecánicos se clasifican en relación con la intensidad o duración del estímulo que genera respuesta desde vocalizaciones a conductas motoras complejas y la prueba debe ser suspendida tan pronto se obtiene una respuesta (Bannon & Malmberg, 2007; Barrot, 2012; Le Bars et al., 2002).

Finalmente, los estímulos químicos requieren de un agente irritante que produzca la nocicepción y permita la evaluación preclínica, es el procedimiento más utilizado. Los comportamientos producidos en estas pruebas son variados, bien identificados y pueden ser distinguidos muy claramente, permitiendo un conteo del comportamiento. Esta clase de estímulos pueden simular correctamente el dolor en naturaleza además de los dolores viscerales (Le Bars et al., 2002).

2. JUSTIFICACIÓN

La herbolaria en México ofrece numerosos recursos vegetales para el tratamiento del dolor. En la Tabla 2 (Moreno Pérez et al., 2020) se indican algunos ejemplos de estas especies que son valoradas por un sector grande de la población, en particular por la escases de recursos o por el alto costo de algunos medicamentos. Sin embargo, no existe información alguna acerca de la eficacia preclínica, y mucho menos clínica, así como la seguridad y calidad de estas plantas. Este es el caso del mirto.

Tabla 2. Algunas plantas utilizadas en México para el alivio del dolor.

Nombre común	Nombre científico	Tipo de dolor	Preparación
Diente de león	<i>Taraxacum officinale</i> F. H. Wigg. (Asteraceae)	Riñones, muscular	Ingeridas e infusión
Té negro	<i>Sphaeralcea angustifolia</i> (cav.) G. Don (Malvaceae)	Estomacal	Infusión
Muicle	<i>Justicia spicigera</i> Schltld. (Acanthaceae)	Estomacal, menstrual	Decocción
Orégano	<i>Petroselinum crispum</i> (Mill.) Fuss (Apiaceae)	Infusión	Estomacal
Perejil	<i>Petroselinum crispum</i> (Mill.) Fuss (Apiaceae)	Muelas, reumático, estomacal	Masticado, jugo, infusión
Mirto	<i>Salvia microphylla</i> Kunth (Lamiaceae)	Estomacal, menstrual	Infusión
Cempasúchil	<i>Tagetes erecta</i> L. (Asteraceae)	Estomacal	Decocción
Sábila	<i>Aloe vera</i> (L.) Burm. F. (Asphodelaceae)	Muscular, reumático	Cataplasma

En este contexto surge la presente investigación, que pretende contribuir al uso racional de los recursos vegetales medicinales de México, en este caso de *S. microphylla* mediante el establecimiento de algunos parámetros de eficacia y calidad. Además, esta especie tiene la ventaja de que crece con facilidad y no se encuentra en peligro de extinción, por lo que su uso como fitofármaco es prometedor.

3. HIPÓTESIS

Los antecedentes etnofarmacológicos de la especie *Salvia microphylla*, así como consideraciones de tipo quimiotaxonómicas permiten suponer que:

El extracto acuoso de *Salvia microphylla* preparado por infusión posee propiedades antinociceptivas debido a la presencia de compuestos abundantes con propiedades farmacológicas.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar la eficacia preclínica de extractos de *Salvia microphylla* como agente antinociceptivo utilizando diferentes modelos animales e iniciar su análisis y pruebas de identidad de la droga cruda para definir la naturaleza de los principios activos.

4.2. Objetivos particulares

- Determinar el potencial antinociceptivo del preparado tradicional y del aceite esencial de *S. microphylla*, utilizando las pruebas de formalina y estiramiento abdominal en ratones, para establecer la eficacia preclínica de la especie.
- Establecer el perfil cromatográfico de la infusión de *S. microphylla* mediante cromatografía de líquidos para contribuir al desarrollo de los parámetros de identidad de la especie.
- Establecer la composición química de la infusión de *S. microphylla* mediante procedimientos fitoquímicos y de identificación convencionales.
- Establecer el volatiloma de la planta mediante el análisis por CG-EM del aceite esencial obtenido por hidrodestilación y de aquellos productos presentes en el espacio de cabeza luego de una microextracción en fase sólida con el propósito de contribuir al establecimiento de las pruebas de identidad de la planta.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1. Material vegetal

Las partes aéreas (tallos, hojas y flores) de *Salvia microphylla* fueron recolectadas en el municipio Santiago Suchilquitongo, Etlá, Oaxaca, en mayo de 2019. Un segundo lote fue recolectado en Ixtlán de Juárez, Oaxaca, en junio de 2021. Una muestra del material vegetal de cada lote fue depositada en el Herbario Nacional (MEXU) Instituto de Biología, UNAM, con número de identificación 1512111 y 1524729, respectivamente. El material vegetal se secó a temperatura ambiente y al aire libre, posteriormente se pulverizó en un molino de cuchillas Thomas Wiley Modelo 4.

5.2. Preparación del extracto acuoso (EA)

El extracto acuoso se preparó mediante la técnica de infusión utilizando 10 g de material vegetal (partes aéreas secas y molidas) y 250 mL de agua destilada en ebullición. La mezcla planta-agua se dejó reposar durante 30 min y al cabo de ese tiempo se filtró el extracto. El extracto acuoso total se concentró a sequedad utilizando un rotaevaporador (BUCHI R-II-HB) adaptado a una bomba de vacío (BUCHI V-710). El proceso se repitió cuantas veces fue necesario hasta obtener 20 g de extracto seco (13.37% de rendimiento).

5.3. Obtención del aceite esencial (EO)

El aceite esencial se preparó por hidrodestilación utilizando un aparato tipo Clevenger modificado. Para ello, se colocaron 100 g de las partes aéreas, secas y molidas del vegetal en 1 L de agua destilada. Luego de recuperar 450 mL del destilado se realizó un reparto con 300 mL de diclorometano (por triplicado). La fase orgánica resultante se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró al vacío para obtener un aceite color amarillo con un rendimiento de 302.2 mg (0.30 % m/m). El aceite esencial se sometió a un análisis de CG-EM con el método descrito en el apartado 5.5.2.

5.4 Ensayos biológicos

5.4.1. Animales

Se utilizaron ratones Swiss Webster (25-30 g de peso) del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz” (INPRFM). Los animales se mantuvieron en un laboratorio de temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) en ciclos de luz y oscuridad de 12 h. La alimentación de los animales fue *ad libitum* con comida estándar (Rodent diet 5001, Lab Diet USA) y agua. Los experimentos se llevaron a cabo siguiendo las especificaciones del comité de ética e investigación del INPRFM con el proyecto aprobado NC-123280.0.

En ambos modelos animales utilizados (estiramiento abdominal y prueba de formalina, se utilizó como control positivo tramadol (TR), un eficaz analgésico con un mecanismo de inhibición de la recaptura de la serotonina y noradrenalina, además de actuar vía mecanismo opioide, principalmente como agonista de los receptores μ (Boora, 2007; Munro, 2009). La naloxona (1 mg/kg, *i.p.*, antagonista de receptores opioides) se utilizó para explorar un posible mecanismo de acción involucrado como parte del sistema de inhibición de la nocicepción. Este antagonista se administró 15 min antes del vehículo o tratamiento. Este mecanismo se evaluó en ambos modelos de dolor.

5.4.2. Prueba de estiramiento abdominal

Para inducir las contracciones abdominales características de este modelo se administró ácido acético al 1% (0.1 mL/10 g, *i.p.*), las cuales consistieron en extensión exagerada del abdomen combinada con el estiramiento de las extremidades posteriores. El agente algogénico se administró 30 min después de recibir el tratamiento e inmediatamente se registró el comportamiento nociceptivo. El conteo de la conducta nociceptiva se realizó en periodos de 5 min (0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25 y 25-30 min).

Los ensayos se llevaron a cabo en ocho grupos experimentales con al menos seis animales cada uno. Los grupos fueron los siguientes:

- 1) Vehículo (Solución salina).
- 2-4) Extracto acuoso en dosis independientes (EA, 30, 100 y 300 mg/kg, s.c.).
- 5) Extracto acuoso en administración intraperitoneal (*i.p.*) (30 mg/kg).
- 6) Fármaco antinociceptivo de referencia, tramadol *i.p.* (TR, 30 mg/kg).
- 7) Antagonista de opioides endógenos, naloxona *i.p.* (1 mg/kg).
- 8) Naloxona *i.p.* combinada con el extracto acuoso s.c. (1 mg/kg, 100 mg/kg).

5.4.3. Prueba de formalina

Treinta min después de la administración (*i.p.*) del tratamiento se administró formalina al 1% (20 μ L) subplantar como agente algogénico. Posteriormente, los ratones fueron colocados individualmente en cilindros de vidrio con espejos para el conteo de la respuesta. Dos comportamientos diferentes fueron considerados: el número de sacudidas y tiempo invertido en la lamida de la pata administrada. La actividad nociceptiva se midió en dos periodos: la fase temprana considerada desde los 0 a 5 min (fase neurogénica) y la fase tardía desde los 5 a los 30 min (fase inflamatoria) después de administrar el agente algógeno formalina.

Los tratamientos administrados consisten en el extracto acuoso (EA, 30, 100 y 300 mg/kg, *i.p.*), aceite esencial (EO, 10, 30 y 100 mg/kg, *i.p.*), y ácido rosmarínico (AR, 30 y 100 mg/kg, *i.p.*). EA (100 mg/kg, *i.p.*) también se administró en presencia del antagonista naloxona (1 mg/kg, s.c.).

5.4.4. Análisis estadístico

Los resultados son expresados como la media \pm error estándar de la media (EEM). El área bajo la curva (ABC) fue calculado a partir de las curvas de curso temporal utilizando el método de los trapecios. En cada uno de los modelos analizados se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de la prueba de Dunnet. Para la comparación de grupos específicos se realizó la prueba t de student no pareada. $p < 0.05$ es considerado estadísticamente significativo. El análisis estadístico se llevó a cabo en el programa GraphPad Prism (v 8.0).

5.5. Procedimientos generales

5.5.1. Caracterización de compuestos aislados

La caracterización estructural de los metabolitos aislados se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos. Los espectros de infrarrojo (IR) se obtuvieron por la técnica de reflectancia (FTIR-ATR9 en un espectrómetro FTIR/FIR Spectrum 400. (Perkin Elmer, Waltham, MA, EU). Las mediciones UV se realizaron con un espectrofotómetro UV-vis Perkin-Elmer Lambda 2.

Los espectros de RMN se realizaron en un equipo JEOL ECA-500 (RMN-¹H 600 MHz y RMN-¹³C 151 MHz) empleando como disolvente CH₃OH-*d*₄. Los espectros de masas de alta resolución fueron obtenidos en espectrómetros Thermo LTQ Orbitrap XL (Waltham, MA, EUA) en modo positivo o negativo.

5.5.2. Análisis cromatográficos

La cromatografía en capa fina (CCF) se realizó en placas de aluminio de 0.25 mm de grosor recubiertas de gel de sílice (60 F₂₅₄, malla 3-5 mm, ASTM) de varias dimensiones utilizando diferentes sistemas de elución según el caso. Como agente revelador se utilizó una solución de sulfato cérico amoniacal en H₂SO₄ y posterior calentamiento a 110 °C por un minuto aproximadamente. Las placas también se visualizaron con una lámpara de luz UV (λ 254 y 356 nm). La CCF preparativa se realizó en placas de vidrio de 20x20 cm de 1 mm de grosor recubiertas con gel de sílice. La Cromatografía en Columna Abierta (CCA) se llevó a cabo en columnas de vidrio de diferentes dimensiones empacadas con Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich-Fluka, MO, EUA) y con mezclas de elución de metanol y acetona en diferentes proporciones.

La cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) se realizó en un equipo Waters con bomba cuaternaria, detector de arreglo de fotodiodos (PDA, por sus siglas en inglés) y un detector de dispersión de luz evaporativo (ELSD, por sus siglas en inglés), acoplado con un inyector automático y recolector de fracciones, con una

columna XBridge Shield RP18 5 μm . El control del equipo, la adquisición y el procesamiento de datos se realizó con el programa Empower version 3.0 (Waters).

Para determinar el perfil cromatográfico del extracto acuoso se utilizó un cromatógrafo Agilent Technologies 1200 equipado con un detector de triple cuadrupolo (QqQ) LC/MS 6410 y con ionización electrospray. La determinación del perfil cromatográfico se realizó en una columna ZORBAX Extend-C18 con un tamaño de partícula 5 μm , diámetro interno 4.6 mm y 150 mm de longitud.

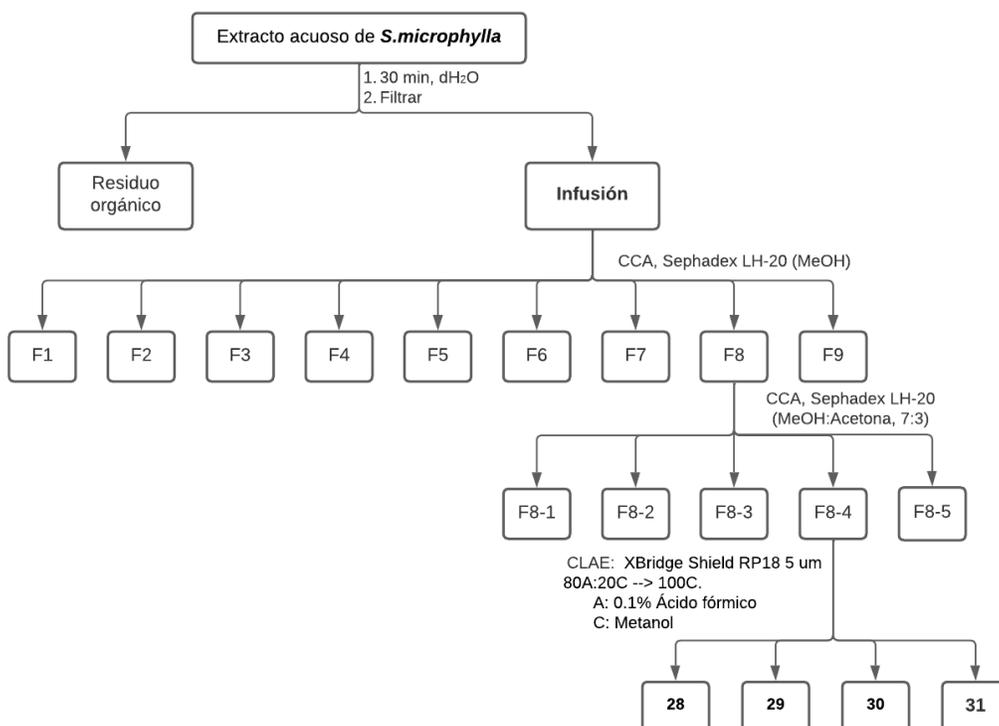
Los análisis por CG-EM se realizaron en un cromatógrafo de gases Agilent serie 6890N equipado con un detector de espectrómetro de masas de tiempo de vuelo LECO PEGASUS III (MS-TOF; Agilent Technology, Palo Alto, California, EE. UU.), utilizando una Columna capilar de 5% difenil-95% dimetilpolisiloxano (DB-5) (20 m \times 0.18 mm \times 0.18 μm de espesor de película) (Agilent J&W Scientific, Palo Alto, California, EE. UU.). Las condiciones de CG-MS fueron: flujo del gas portador (He): 1,0 mL/min; split 20:1; volumen de inyección: 1,0 μL ; inyector y temperatura de la línea de transferencia de MS: 300 y 250 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. La rampa de temperatura del horno: 40 $^{\circ}\text{C}$ mantenida durante 3 min, con aumentos de 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta alcanzar 300 $^{\circ}\text{C}$ donde se mantiene durante 15 min, isotérmicamente. Modo de ionización: impacto electrónico a 70 eV; escaneo de rango de masa: 33-500 m/z. La identificación de los componentes se llevó a cabo mediante la inyección conjunta de la muestra con una solución que contiene la serie homóloga de n-alcanos (C7–C30) para establecer los índices de retención (índices de Kovats). Para la identificación de los compuestos se compararon los patrones de fragmentación e índices de retención reportados en la base de datos del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, por sus siglas en inglés) (NIST Standard Reference Data, 2021).

5.6. Estudios químicos de la especie *Salvia microphylla* Kunth.

5.6.1. Fraccionamiento y análisis del extracto acuoso

El extracto acuoso de *S. microphylla* (EA, 5.52 g) se resuspendió en MeOH y la fracción soluble se sometió a un fraccionamiento primario por medio de una CCA

en Sephadex LH-20 (volumen de lecho de 400 mL) usando como fase móvil MeOH. Se obtuvieron 9 fracciones primarias (F₁-F₉) que fueron reunidas por similitud cromatográfica. La fracción F₈ (578.7 mg) fue sometida nuevamente a CCA con Sephadex LH-20 (acetona:MeOH, 3:7) para generar cinco fracciones secundarias (F₈₋₁ - F₈₋₅). La fracción F₈₋₄ se sometió a un tercer fraccionamiento mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) utilizando las condiciones que se indican en el Esquema 1. Este proceso generó los compuestos **28** (2.4 mg), **29** (9.8 mg), **30** (3.8 mg) y **31** (11 mg). El procedimiento general se muestra en el Esquema 1.



Esquema 1. Aislamiento de compuestos mayoritarios del extracto acuoso.

Ácido 3-cafeoilquínico (28): Sólido blanco; IR (FT-IR) ν_{\max} 3314.86, 1684.06, 1598.95, 1113.65 cm^{-1} ; UV λ_{\max} 204.45, 215.16, 327.57; ESI-MS m/z 353.0887 [M-H]⁻. RMN-¹H (600 MHz, CH₃OH-*d*₄) δ_{H} (ppm) 7.59 (d, J = 15.9 Hz, H-8'), 7.06 (d, J = 2.1 Hz, H-2'), 6.95 (dd, J = 8.0, 2.1 Hz, H-6'), 6.78 (d, J = 8.0 Hz, H-5'), 6.32 (d,

$J = 15.9$ Hz, H-8'), 5.38 (d.a., $J = 3.9$ Hz, H-3), 4.13 (dt, $J = 8.2, 4.4$ Hz, H-5), 3.69 (dd, $J = 8.2, 3.9$ Hz, H-4), 2.19 – 2.13 (m, H-6), 2.00 – 1.95 (m, H-2); RMN-¹³C (151 MHz, CH₃OH-*d*₄) δ_c (ppm) 178.2 (C-7), 169.4 (C-9'), 149.9 (C-4'), 147.3 (C-3'), 147.2 (C-7'), 128.4 (C-1'), 123.3 (C-6'), 116.9 (C-5'), 116.2 (C-8'), 115.6 (C-2'), 76.0 (C-1), 74.9 (C-4), 73.3 (C-3), 69.1 (C-5), 41.4 (C-2), 37.2 (C-6).

Ácido 4-cafeoilquínico (29): Sólido blanco; IR (FT-IR) ν_{\max} 3329.96, 1692.15, 1598.15, 1116.36 cm⁻¹; UV λ_{\max} 204.45, 215.16, 327.57; ESI-MS m/z 353.0887 [M-H]⁻. RMN-¹H (600 MHz, CH₃OH-*d*₄) δ_H (ppm) 7.65 (d, $J = 15.9$ Hz, H-7'), 7.08 (d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 6.98 (dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz, H-6'), 6.79 (d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 6.38 (d, $J = 15.9$ Hz, H-8'), 4.82 (dd, $J = 9.3, 3.0$ Hz, H-4), 4.33 – 4.25 (m, H-5), 2.24 – 1.99 (m, H-2).; RMN-¹³C (151 MHz, CH₃OH-*d*₄) δ_c (ppm) 176.9 (C-7), 168.4 (C-9'), 148.9 (C-4'), 146.5 (C-3'), 146.2 (C-7'), 127.2 (C-1'), 122.3 (C-6'), 115.8 (C-5'), 115.1 (C-8'), 114.7 (C-2'), 78.6 (C-4), 76.1 (C-1), 69.0 (C-3), 65.0 (C-5), 42.1 (C-2), 37.8 (C-6).

Ácido 5-cafeoilquínico (30): Sólido blanco; IR (FT-IR) ν_{\max} 3315.82, 1696.01, 1598.83, 1176.07, 1115.58 cm⁻¹; UV λ_{\max} 204.86, 300.19, 327.71; ESI-MS m/z 353.089 [M-H]⁻. RMN-¹H (600 MHz, CH₃OH-*d*₄) δ_H (ppm) 7.57 (d, $J = 15.9$ Hz, H-7'), 7.06 (d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 6.97 (dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz, H-6'), 6.79 (d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 6.28 (d, $J = 15.9$ Hz, H-8'), 5.36 (dt, $J = 8.6, 4.6$ Hz, H-5), 4.18 (s.a., H-3), 3.73 (dd, $J = 8.6, 3.1$ Hz, H-4), 2.25 – 2.18 (m, H-6), 2.11 – 2.07 (m H-2); RMN-¹³C (151 MHz, CH₃OH-*d*₄) δ_c (ppm) 177.4 (C-7), 168.9 (C-9'), 149.7 (C-4'), 147.2 (C-3'), 147.0 (C-7'), 128.0 (C-1'), 123.1 (C-6'), 116.6 (C-5'), 115.5 (C-8'), 115.3 (C-2'), 72.2 (C-5), 71.8 (C-1), 71.7 (C-4), 73.9 (C-3), 39.2 (C-2), 38.4 (C-6).

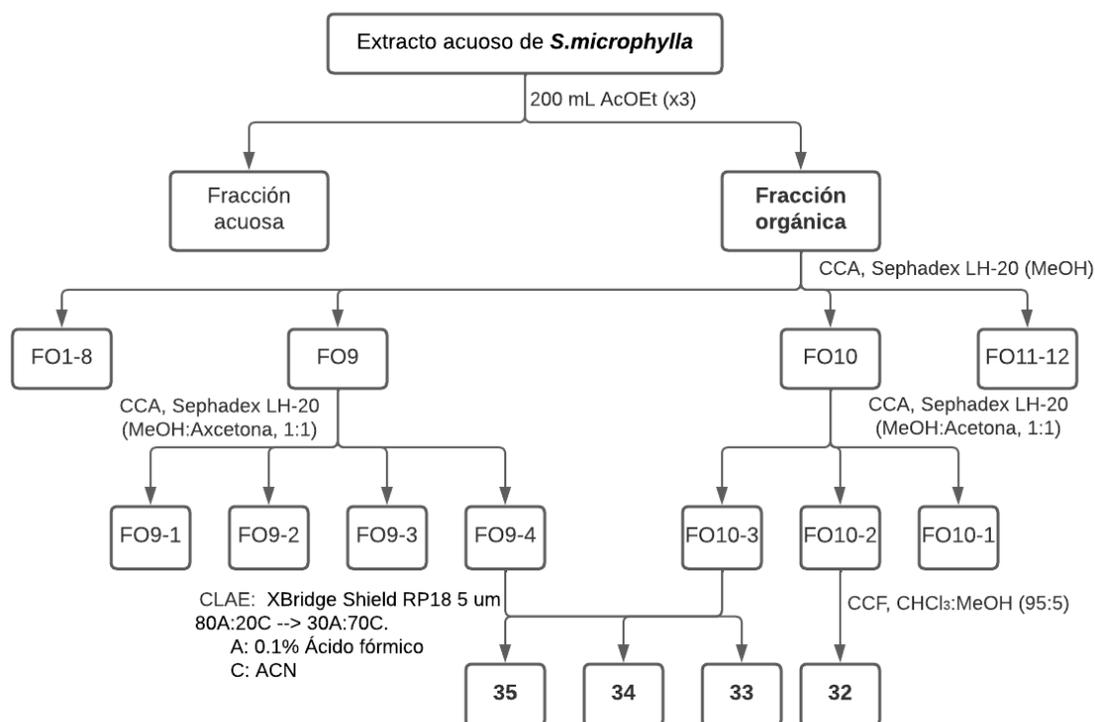
Ácido rosmarínico (31): Sólido blanco; IR (FT-IR) ν_{\max} 3310.89, 1598.86, 1153.58 cm⁻¹; UV λ_{\max} 203.58, 289.79, 328.57; ESI-MS m/z 359.079 [M-H]⁻. RMN-¹H (600 MHz, CH₃OH-*d*₄) δ_H (ppm) 7.56 (d, $J=15.9$ Hz, H-7), 7.05 (d, $J=2.1$ Hz, H-2), 6.96 (dd, $J=8.2, 2.1$ Hz, H-6), 6.79 (d, $J=8.2$ Hz, H-5), 6.77 (d, $J=2.1, H-2'$), 6.71 (d, $J=8.1$ Hz, H-5'), 6.63 (dd, $J=8.1, 2.1, H-6'$), 6.28 (d, $J=15.9$ Hz, H-8), 5.19 (dd, $J=8.4, 4.2$ Hz, H-8'), 3.11 (dd, $J=14.3, 4.2$ Hz, H-7'a), 3.01 (dd, $J=14.3, 8.4$ Hz, H-7'b).

5.6.1.1. Obtención de fracción orgánica de la infusión

La fracción orgánica de la infusión (ver apartado 5.2.) se obtuvo mediante el método de reparto. La infusión se colocó en un embudo de separación y se agregaron 200 mL de AcOEt. El embudo se agitó vigorosamente y se dejó reposar hasta la separación de las dos fases, el procedimiento se llevó a cabo por triplicado. La fracción orgánica se recuperó en un matraz, se filtró sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró al vacío en un rotaevaporador. El rendimiento de la fracción fue de 47.2 mg (0.47% con base en el peso del material seco), este proceso se repitió hasta obtener 1.2 g de la fracción orgánica.

5.6.1.2. Aislamiento de metabolitos secundarios de la fracción orgánica.

La fracción orgánica fue resuspendida en MeOH y se fraccionó por medio de una CCA sobre Sephadex LH-20 (volumen de lecho de 400 mL); MeOH se usó como fase móvil. Al cabo de la elución se obtuvieron 12 fracciones (FO₁-FO₁₂). FO₉ (34 mg) y FO₁₀ (34.9 mg) se sometieron a un segundo fraccionamiento en CCA sobre Sephadex LH-20 (acetona:MeOH, 1:1) para generar cuatro y tres fracciones, respectivamente. De la fracción FO₁₀₋₂ (15 mg) se obtuvieron, mediante CCF preparativa (CHCl₃: MeOH, 95:5), 7 mg de hesperetina (**32**). Las fracciones FO₉₋₄ y FO₁₀₋₃ se combinaron (12 mg) y la fracción resultante se sometió a un proceso de separación por CLAE; como resultado se obtuvieron 3 mg de orientina (**33**) y 5 mg de una mezcla de hiperósido (**34**) e isoquercitrina (**35**). Los procedimientos recién descritos se resumen en el Esquema 2.



Esquema 2. Aislamiento de metabolitos secundarios de la fracción orgánica del extracto acuoso.

Hesperetina (32): Sólido blanco; IR (FT-IR) ν_{\max} 3268.69, 1588.29, 1271.28 cm^{-1} ; UV λ_{\max} 203.74, 286.65; ESI-MS m/z 301.0725 [M-H]⁻. RMN-¹H (600 MHz, CH₃OH-*d*₄) δ_{H} (ppm) 6.91 (d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 6.90 (d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 6.87 (dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz, H-6'), 5.86 (d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 5.83 (d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.27 (dd, $J = 12.6, 3.1$ Hz, H-2), 3.82 (s, OCH₃), 3.02 (dd, $J = 17.1, 12.6$ Hz, H-3a), 2.67 (dd, $J = 17.1, 3.1$ Hz, H-3b); RMN-¹³C (151 MHz, CH₃OH-*d*₄) δ_{C} (ppm) 197.2 (C-4), 168.7 (C-7), 165.1 (C-5), 164.4 (C-9), 149.1 (C-4'), 147.5 (C-3'), 132.9 (C-1'), 118.7 (C-6'), 114.2 (C-2'), 112.3 (C-5'), 103.3 (C-10), 96.9 (C-6), 96.1 (C-8), 79.9 (C-2), 56.1 (OCH₃), 43.8 (C-3).

Orientina (33): Sólido amarillo; ESI-MS m/z 447.0943 [M-H]⁻. RMN-¹H (600 MHz, CH₃OH-*d*₄) δ_{H} (ppm) 7.54 (s.a., H-2'), 7.50 (d, $J = 8.4$ Hz, H-6'), 7.40 (s.a., H-5'), 6.52 (s, H-3), 6.26 (s, H-6), 4.98 (d, $J = 9.9$ Hz, H-1''), 4.12 (t, $J = 9.4$ Hz, H-2''), 3.98 (d, $J = 12.1$ Hz, H-6''a), 3.85 (dd, $J = 12.2, 5.8$ Hz, H-6''b), 3.69 (t, $J = 9.4$ Hz,

H-4''), 3.53 (d, $J = 9.1$ Hz, H-3''), 3.47 (m, H-5''). RMN-¹³C (151 MHz, CH₃OH-*d*₄) δ_c (ppm) 184.6 (C-4), 167.1 (C-2), 165.1 (C-7), 163.0 (C-5), 158.5 (C-9), 150.1 (C-4'), 147.5 (C-3'), 124.4 (C-1'), 121.3 (C-6'), 115.3 (C-2'), 114.6 (C-5'), 105.5 (C-8), 104.4 (C-10), 104.0 (C-3), 99.8 (C-6), 83.3 (C-5''), 80.7 (C-3''), 75.7 (C-1''), 73.3 (C-2''), 72.7 (C-4''), 63.6 (C-6'').

Mezcla de (34 y 35): Sólido amarillo; IR (FT-IR) ν_{\max} 3234.00, 1598.79, 197.01 cm⁻¹; UV λ_{\max} 205.29, 255.83, 356.50; ESI-MS m/z 463.0893 [M-H]⁻. RMN-¹H (600 MHz, CH₃OH-*d*₄) δ_H (ppm) 7.82 (d, $J = 2.2$ Hz, H-2'''), 7.69 (d, $J = 2.2$ Hz, H-2'), 7.56 (dd a., H-6', H-6'''), 6.85 (d, $J = 8.4$ Hz, H-5'''), 6.84 (d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.36 (s.a., $J =$, H-8, H-8''), 6.17 (s.a., H-6, H-6''), 5.23 (d, $J = 7.2$ Hz, H-1'''''), 5.14 (d, $J = 7.8$ Hz, H-1'''''), 3.83 (d.a., $J = 3.0$ Hz, H-4'''''), 3.80 (dd, $J = 9.7, 7.8$ Hz, H-2'''''), 3.70 (dd, $J = 11.8, 2.4$ Hz, H-6a'''''), 3.62 (dd, $J = 11.2, 6.0$ Hz, H-6a'''''), 3.52 – 3.57 (m, H-3''''', 6b''''', 6a'''''), 3.48 – 3.45 (m, H-2''''', H-5'''''), 3.41 (t, $J = 9.0$ Hz, H-3'''''), 3.33 (t, $J = 9.2$ Hz, H-4'''''), 3.21 (ddd, $J = 9.0, 6.0, 2.4$ Hz, H-5'''''); RMN-¹³C (151 MHz, CH₃OH-*d*₄) δ_c (ppm) 179.5 (C-4, C-4''), 166.1 (C-7, C-7''), 163.0 (C-5, C-5''), 159.0 (C-2), 158.8 (C-2''), 158.4 (C-9, C-9''), 149.9 (C-4'), 149.8 (C-4'''), 145.9 (C-3'), 145.8 (C-3'''), 135.8 (C-3), 135.6 (C-3''), 123.2 (C-6'), 123.1 (C-6''), 122.9 (C-1', C-1''), 117.8 (C-2''), 117.6 (C-2'), 116.1 (C-5'''), 116.0 (C-5'), 105.7 (C-10, C-10''), 105.6 (C-10), 105.4 (C-1'''''), 99.9 (C-6, C-6''), 94.7 (C-8, C-8''), 78.4 (C-5'''''), 78.1 (C-3'''''), 77.2 (C-5'''''), 75.7 (C-2'''''), 75.1 (C-4'''''), 73.2 (C-2'''''), 71.2 (C-4'''''), 70.0 (C-3'''''), 62.5 (C-6'''''), 61.9 (C-6''''').

5.7. Análisis de compuestos volátiles

5.7.1. Análisis e identificación de compuestos volátiles mediante micro extracción en fase sólida con espacio de cabeza (MEFS-EC)

La obtención de los compuestos volátiles se efectuó también mediante la técnica de microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (MEFS-EC). Para ello, en un vial sellado herméticamente con un tapón de polipropileno PTFE/recubierto con un septo de silicona de 30 mL se colocaron 100 mg de *S. microphylla* seca y molida, 50 mg de cloruro de sodio y 15 mL de agua grado HPLC. Las condiciones

experimentales para la extracción fueron una temperatura de 60°C y un tiempo de extracción de 15 min con agitación de 450 rpm. En el procedimiento se utilizaron cuatro fibras de MEFS (Supelco Technology, St. Louis, Mo., EE. UU.): una fibra de polidimetilsiloxano (PDMS; 100 μm . Fibra roja), una fibra de polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB; 65 μm . Fibra azul), una fibra de divinilbenceno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/Carboxen/PDMS; 50/30 μm . Fibra gris) y una fibra de carboxeno/polidimetilsiloxano (Carboxen/PDMS; 75 μm . Fibra negra). Todas las fibras se expusieron en el espacio de cabeza (EC) con el objetivo de adsorber los compuestos volátiles. El acondicionamiento de las fibras antes del análisis de CG-EM se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las proporciones relativas de los componentes individuales presentes se calcularon con base en las áreas de cada uno de los picos en el cromatograma de iones totales (CIT) y se reportan como porcentaje de la suma de todas las áreas de los picos presentes en el cromatograma iónico. Todas las muestras se analizaron por triplicado. Los compuestos fueron identificados por comparación de sus índices de retención y de los espectros de masas generados con los reportados en la base de datos del National Institute of Standards and Technology (NIST).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Evaluación del efecto antinociceptivo del preparado tradicional de *S. microphylla*

6.1.1. Prueba de estiramiento abdominal

El modelo de estiramiento abdominal es una herramienta para la detección de agentes analgésicos o antiinflamatorios. Esta prueba consiste en la inducción de dolor periférico al administrar un agente irritante como el ácido acético (Dzoyem et al., 2017). Este tipo de modelo tiene la ventaja de estimar el dolor visceral y/o abdominal que no es fácilmente localizado y que se puede difundir del lugar de origen (Yam et al., 2020). En la Figura 4 y 5 se puede observar que, al administrar subcutáneamente el extracto acuoso a los roedores a las dosis de 30, 100, y 300 mg/kg hay una respuesta antinociceptiva significativa ($p < 0.05$) respecto al control. La dosis de 30 mg/kg se administró también por vía intraperitoneal, y la respuesta fue significativamente mejor respecto al vehículo y comparable al del control positivo tramadol (30 mg/kg, *i.p.*).

Con el objetivo de estimar la participación de los receptores a opioides endógenos como posible mecanismo de acción del extracto se realizó un experimento en presencia de la naloxona (NX, 1 mg/kg, *i.p.*) como antagonista de estos receptores 15 min antes del tratamiento con EA (100 mg/kg, *s.c.*). Para comparar el efecto antinociceptivo de la dosis de 100 mg/kg sola o en combinación de naloxona se realizó una prueba t de student donde no se encuentra diferencia significativa ($p > 0.05$).

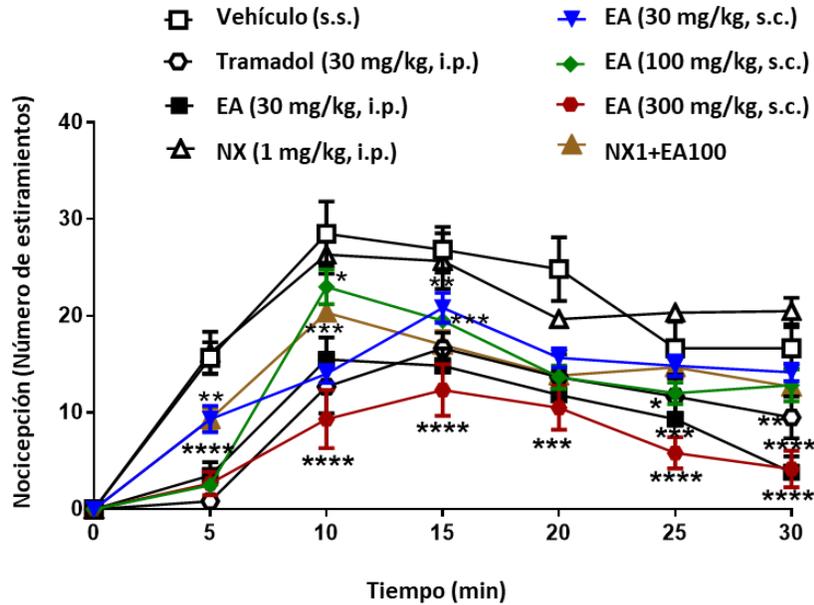


Figura 4. Curso temporal del efecto antinociceptivo del EA en el modelo de estiramiento abdominal. Extracto Acuoso (EA) y fármaco de referencia Tramadol (TR) en comparación con el vehículo (s.s. 0.9%). Naloxona (1 mg/kg, *i.p.*) fue ensayada sola y en combinación con EA (100 mg/kg, *s.c.*). ANOVA de dos vías seguido por la prueba de Dunnet. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. $n = 6$.

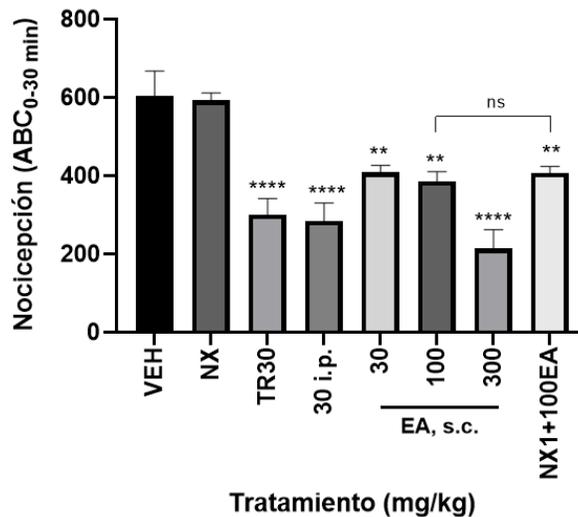


Figura 5. Efecto antinociceptivo de EA en el modelo de estiramiento abdominal. EA y tramadol (TR) en comparación con el vehículo (VEH, s.s., *i.p.*). Naloxona (NX, 1 mg/kg, *i.p.*) se ensayó sola y en combinación con EA (100 mg/kg, *s.c.*). ANOVA de una vía seguido de prueba de Dunnet: comparación contra el vehículo. *t* de student no pareada: comparación entre grupos EA (100 mg/kg, *s.c.*) en presencia o ausencia de NX (1 mg/kg, *i.p.*). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. $n = 6$.

6.1.2. Prueba de la formalina

La formalina es un agente químico que causa daño tisular y por lo tanto un efecto nociceptivo en los roedores. El agente algógeno genera conducta estereotipada como son lamidas y sacudidas de la extremidad afectada (Langford y Mogil, 2008). La prueba de la formalina en roedores es ampliamente utilizada para la evaluación de agentes analgésicos. El modelo de dolor presenta un curso temporal bifásico, con una fase “temprana” o “aguda” (5-10 min) seguida de un periodo de reposo (10 min) donde no hay conducta o es mínima. Finalmente, se observa una fase “tardía”, en la cual el animal responde con lamidas o sacudidas. Ambas fases involucran dos mecanismos diferentes, la “temprana” ocurre por el daño directo por la estimulación química de los nociceptores (fase neurogénica), mientras que la fase “tardía” genera sensibilización central e inflamación periférica (Hunskar y Hole, 1987; Tjølsen et al., 1992).

El EA de *S. microphylla* produjo un efecto antinociceptivo con respuesta dependiente de la dosis en la fase neurogénica que fue significativa ($p < 0.001$) a partir del tratamiento con 100 mg/kg, y en comparación con el vehículo en el comportamiento de lamida (Figura 6A). La respuesta antinociceptiva también se observó en el comportamiento de sacudidas (Figura 6B) donde hay diferencia significativa ($p < 0.01$) desde la dosis más baja (30 mg/kg, *i.p.*). En este experimento la respuesta antinociceptiva se redujo en ambas fases. En la fase inflamatoria (Figuras 6C y 6D) los efectos del EA fueron más relevantes ya que todas las dosis disminuyeron drásticamente los comportamientos nociceptivos (sacudidas) similar al control positivo TR.

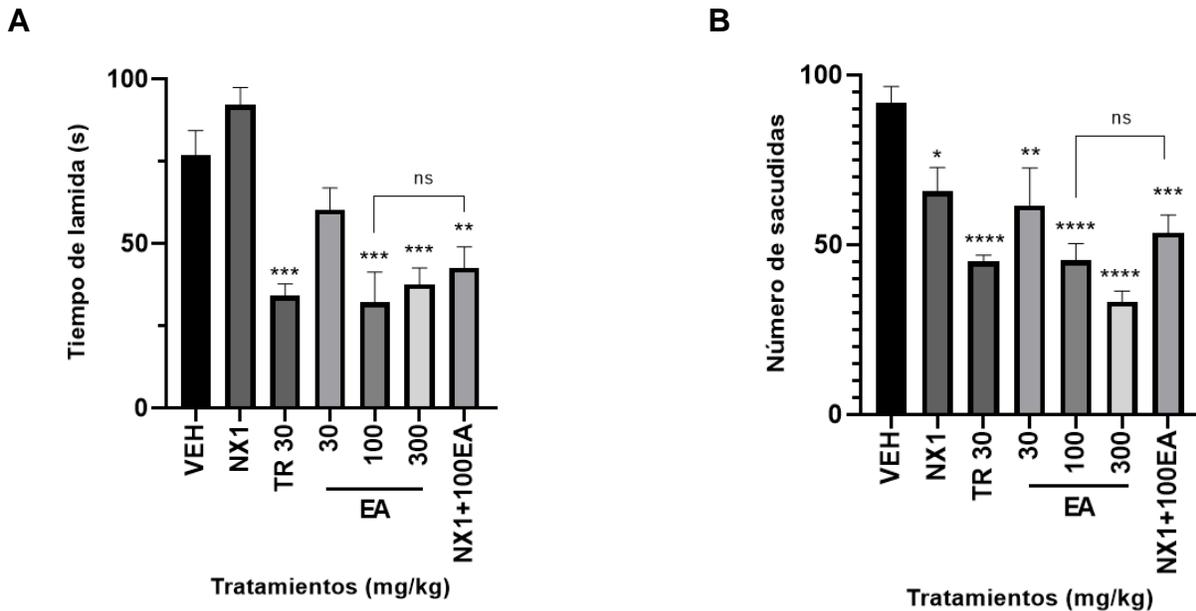
A diferencia de la fase neurogénica, cuando se utilizó la NX (1 mg/kg, *i.p.*) en conjunto con el EA (100 mg/kg, *i.p.*) se demostró una participación parcial de los receptores a opioides endógenos en la fase inflamatoria de la prueba, específicamente para el comportamiento de sacudida donde hay diferencia significativa ($p < 0.05$) (Figura 6D).

En conjunto los resultados obtenidos con ambos modelos de dolor sugieren que el extracto acuoso de *S. microphylla* ejerce un efecto antinociceptivo, principalmente antiinflamatorio.

El efecto antinociceptivo de EO de *S. microphylla* se evaluó en la prueba de formalina (Figura 7), donde se ve un claro efecto dosis dependiente en ambas fases del experimento, siendo la dosis más alta (100 mg/kg, *i.p.*) la que muestra mejores resultados mientras la dosis menor (10 mg/kg, *i.p.*) no presenta diferencia estadística con el vehículo.

Por otro lado, el ácido rosmarínico (AR) aislado del extracto activo fue evaluado en dos diferentes dosis (30 y 100 mg/kg, *i.p.*) muestra un buen efecto en ambas fases (Figura 8), particularmente en el comportamiento de sacudida, que es una respuesta más espontánea y que no depende de otros factores (como el caso de la lamida, que requiere que el animal pose su atención en la pata afectada) (Wheeler-Aceto & Cowan, 1991a, 1991b). La dosis de 100 mg/kg (*i.p.*) fue la que mostró mejor respuesta. Los resultados de este compuesto aislado permiten atribuir parcialmente el efecto antinociceptivo del preparado tradicional (Figura 6) a este compuesto mayoritario.

Fase neurogénica (0-5 min)



Fase inflamatoria (20-25 min)

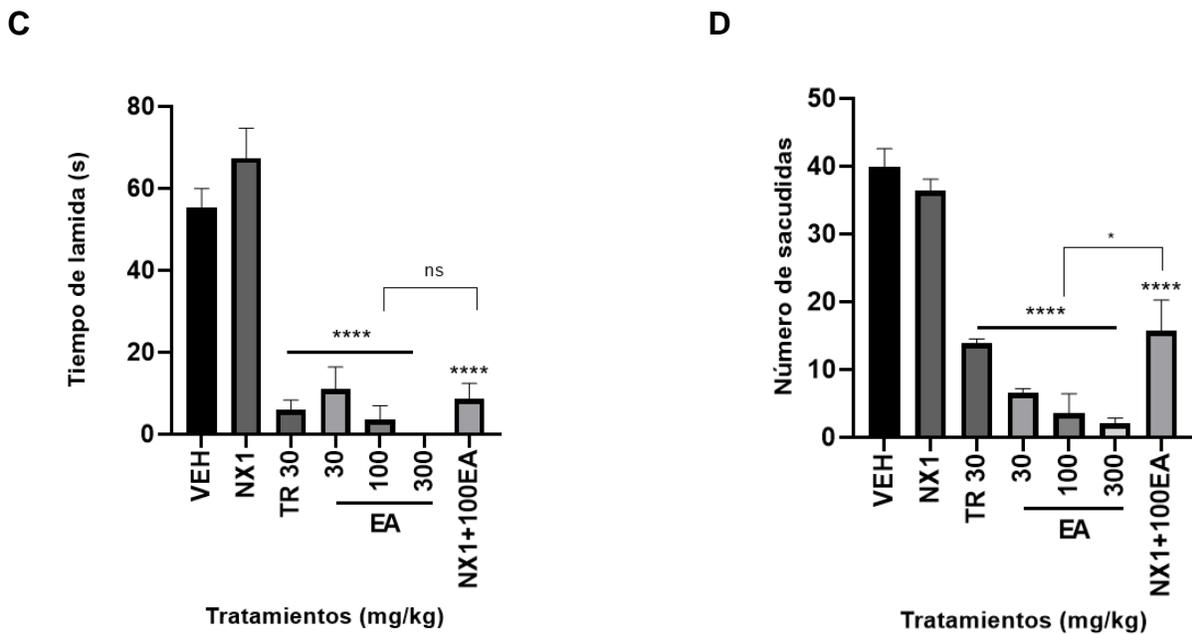
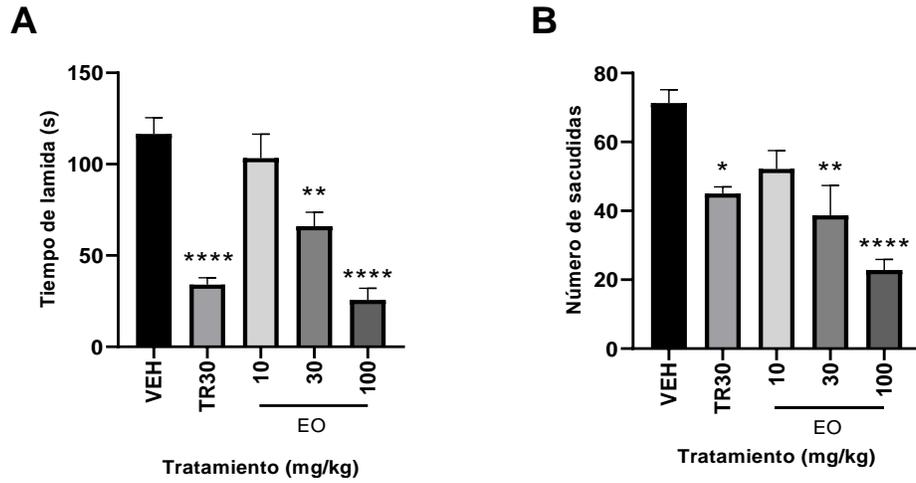


Figura 6. Efecto antinociceptivo de EA en la prueba de formalina. EA a diferentes dosis (30, 100, 300 mg/kg, *i.p.*) y un control positivo (TR, 30 mg/kg *i.p.*) en comparación con VEH (s.s., *i.p.*) y en presencia de naloxona (NX, 1 mg/kg). Fase neurogénica: (A) comportamiento de lamida y (B) comportamiento de sacudida. Fase inflamatoria: (C) comportamiento de lamida y (D) comportamiento de sacudida. ANOVA de una vía seguido de prueba de Dunnet: comparación contra el vehículo. *t* de student no pareada: comparación entre grupos EA (100 mg/kg, *i.p.*) en presencia o ausencia de NX (1 mg/kg, *i.p.*). **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001, *****p*<0.0001. *n*=6.

Fase neurogénica (0-5 min)



Fase inflamatoria (20-25 min)

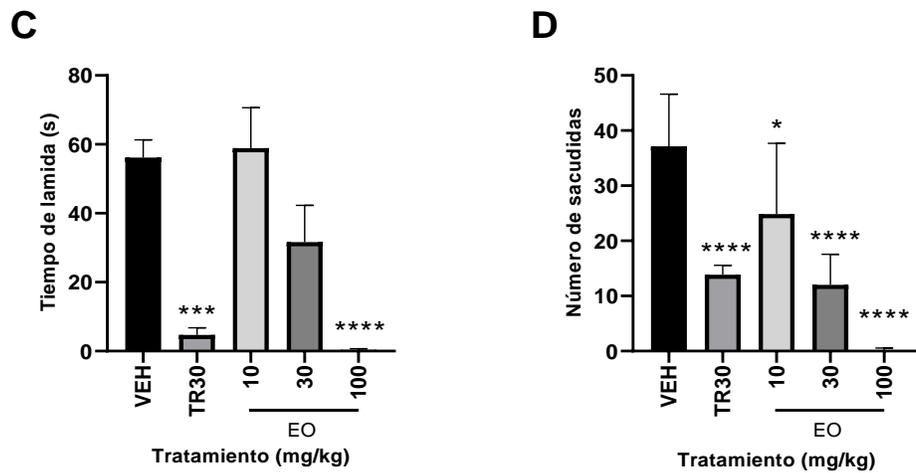


Figura 7. Efecto antinociceptivo de EO en la prueba de formalina. EO a diferentes dosis (10, 30, 100 mg/kg, *i.p.*) y un control positivo (TR, 30 mg/kg *i.p.*) en comparación con VEH (s.s., *i.p.*). Fase neurogénica: (A) comportamiento de lamida y (B) comportamiento de sacudida. Fase inflamatoria: (C) comportamiento de lamida y (D) comportamiento de sacudida. ANOVA de una vía seguido de prueba de Dunnet: comparación contra el vehículo. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. n=6.

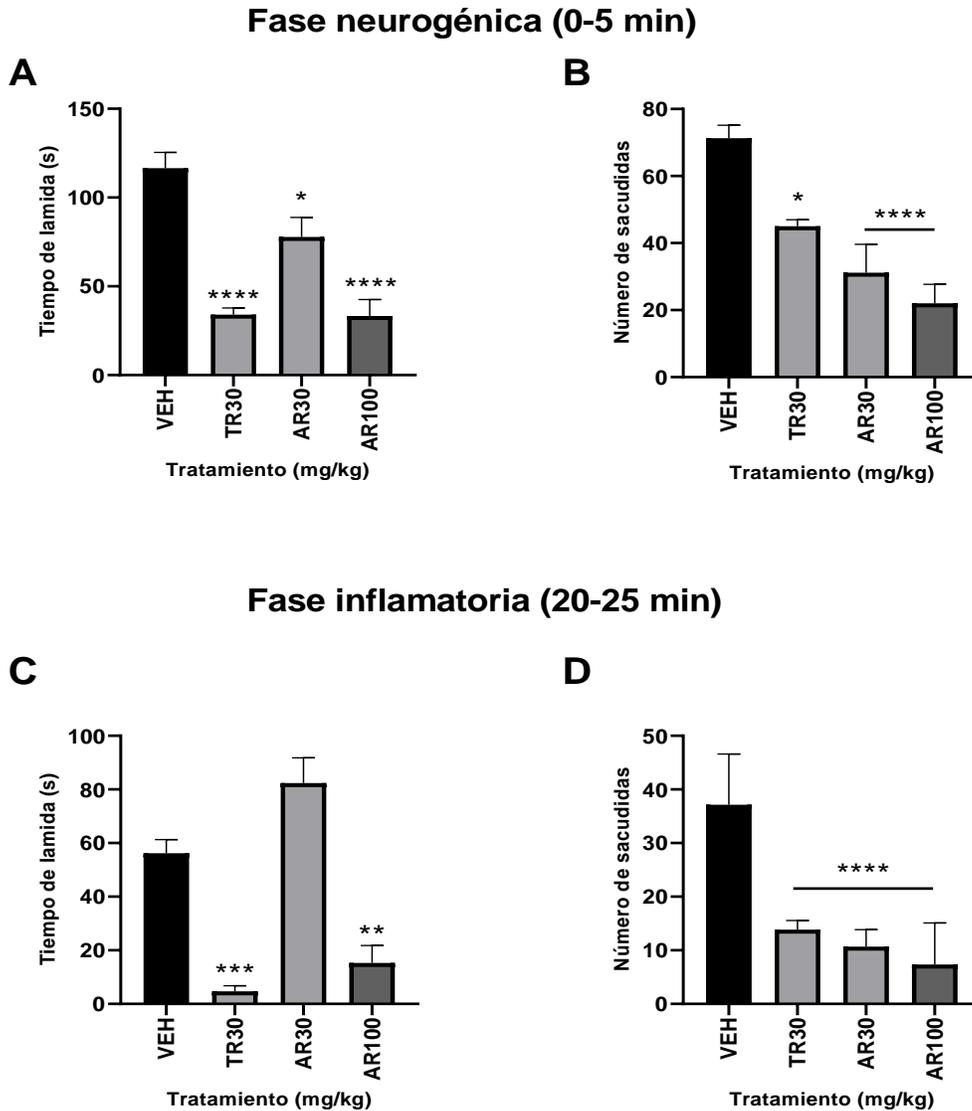


Figura 8. Efecto antinociceptivo de AR en la prueba de formalina. AR a diferentes dosis (30, 100 mg/kg, i.p.) y un control positivo (TR, 30 mg/kg i.p.) en comparación con VEH (s.s., i.p.). Fase neurogénica: (A) comportamiento de lamida y (B) comportamiento de sacudida. Fase inflamatoria: (C) comportamiento de lamida y (D) comportamiento de sacudida. ANOVA de una vía seguido de prueba de Dunnet: comparación contra el vehículo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. $n = 6$.

6.2. Estudio fitoquímico de la especie *Salvia microphylla*

El estudio químico de la planta se realizó sobre la infusión, considerando que es el preparado de uso tradicional y que además demostró un efecto antinociceptivo

En los anexos se resumen los datos espectroscópicos, incluyendo los espectros, de todos los compuestos aislados.

6.3. Análisis e identificación de compuestos volátiles

Los antecedentes etnofarmacológicos de la especie *S. microphylla* indican que se utiliza principalmente bajo la forma de infusión, pero también se cuenta con registros de usos en forma de cataplasmas o aromaterapia (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009). Estos métodos sugieren la participación de los compuestos volátiles en el efecto terapéutico de la planta, por lo que se llevó a cabo el análisis del volátiloma (compuestos orgánicos volátiles) de la planta.

El estudio de los volátiles de *S. microphylla* se realizó utilizando la planta seca y molida mediante MEFS-EC para posterior análisis por CG-EM. Para el proceso de microextracción se emplearon cuatro tipos de fibras y así detectar el mayor número posible de compuestos en el espacio de cabeza, con base en la afinidad de los volátiles con los diferentes recubrimientos de las fibras. Cada fibra está recubierta con materiales químicamente diferentes por lo que su afinidad por los diferentes compuestos volátiles será también distinta (Yang et al., 2013). Así, la fibra cubierta con polidimetilsiloxano (PDMS; 100 μm) tiene mayor afinidad por compuestos no polares; la de polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB; 65 μm) adsorbe productos de polaridad media; la fibra revestida con divinilbenceno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS; 50/30 μm) es afín a una gran variedad de compuestos; y, por último, la de carboxeno/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS; 75 μm) adsorbe mejor a compuestos no polares (Wasielewska et al., 2013).

En la Figura 10 se observan los cromatogramas de iones totales generados en las extracciones con cada una de las fibras. En total se logró la identificación de 32 compuestos volátiles de *S. microphylla* (Tabla 3), entre los que destaca el β -cariofileno (**21**) como compuesto mayoritario en la fibra recubierta con PDMS (10.7%). También se encontró en una alta proporción en las fibras recubiertas con PDMS/DVB y CAR/PDMS (8.5 y 4.9%, respectivamente). Estos resultados se

encuentran en armonía con los previamente reportados para el aceite esencial de esta especie (Chouit et al., 2021; Khadhri et al., 2022; Lima et al., 2012). El compuesto γ -eudesmol (**24**) también fue aislado como mayoritario en las fibras recubiertas con PDMS/DVB y PDMS (14.96 y 8.70% respectivamente), mientras que su isómero β -eudesmol (**23**) solo fue identificado en la fibra con DVB/CAR/PDMS (8.33%), en la cual se observó dehidroxi-isocalamendiol (**61**) como compuesto mayoritario (9.27%). Asimismo, el producto **61** se encontró en altas proporciones en las fibras de PDMS y CAR/PDMS (8.49 y 6.04%, respectivamente).

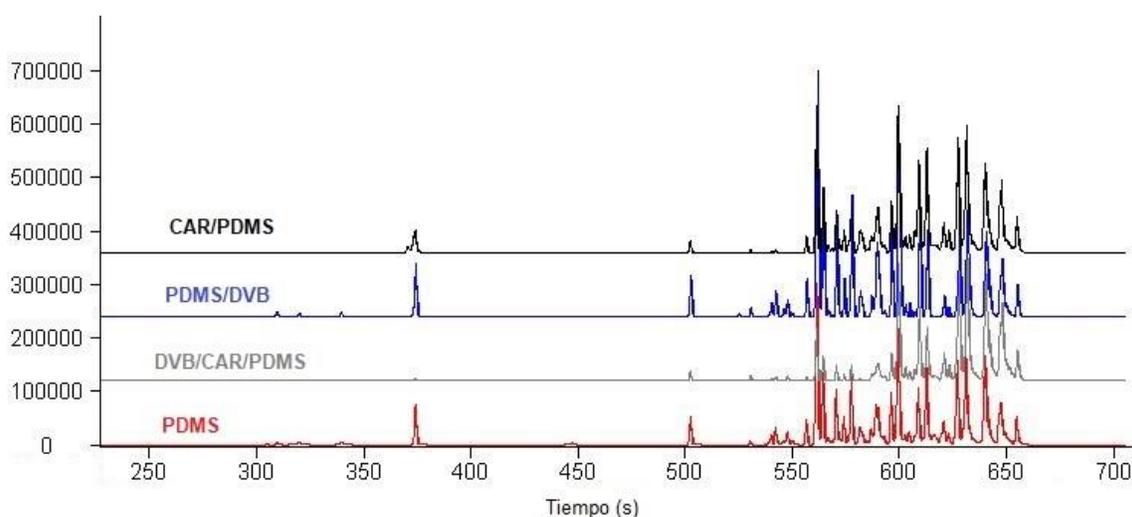


Figura 10. Cromatogramas de iones totales obtenido por CG-EM de compuestos volátiles de *S. microphylla* obtenidos por el método de MEFS-EC. Cada análisis se llevó a cabo por triplicado.

Tabla 3. Compuestos volátiles de *S. microphylla* identificados por el método de MEFS-EC.

No	Compuesto	IR ^a	Composición (%)			
			PDMS	DVB/CAR-PDMS	PDMS/DVB	CAR/PDMS
36	α-pineno	918	0.58	-	0.29	0.81
37	Canfeno	932	5.67	-	0.67	2.24
38	β-Pineno	960	1.68	-	1.29	-
39	β-Thujeno	1011	-	-	3.18	3.46
40	Eucaliptol	1013	5.11	-	3.18	3.46
41	Acetato de Isobornil	1269	4.03	2.11	4.17	2.27
42	α-Cubebeno	1334	1.54	0.83	1.41	0.82
43	β-Cubebeno	1374	0.93	1.81	0.49	-
44	Gurjuneno	1395	1.09	0.45	1.11	0.87
21	β-Cariofileno	1407	10.70	3.37	8.50	4.91
45	γ-Elemeno	1415	3.34	1.34	4.08	1.89
46	Humuleno	1441	1.70	0.37	0.85	1.54
47	Germacreno D	1450	5.27	0.65	2.90	2.05
48	R-Cupareno	1461	-	-	-	1.97
49	Cadine-1,4-dieno	1481	4.03	3.67	4.08	3.79
50	4,11-selinadieno	1483	-	-	4.16	3.79
51	α-Guaieno	1483	4.03	3.67	4.08	3.79
52	γ-Cadineno	1499	1.47	1.17	2.07	1.54
53	δ-Cadineno	1507	-	5.35	6.30	6.19
54	Calameneno	1508	6.61	5.35	6.30	6.19
55	α-Calacoreno	1528	-	0.30	0.28	1.14
56	Germacreno B	1534	2.67	2.70	3.69	5.15
57	Diepicedrene-1-oxido	1543	6.72	4.27	-	7.26
58	Oxido de cariofileno	1571	0.54	0.75	0.67	-
59	Guaiol	1583	4.76	6.79	5.70	4.55
60	Hinesol	1616	-	9.27	7.48	6.53
24	γ-Eudesmol	1616	8.70	9.27	14.96	6.04
61	Dihidroxi-isocalamendiol	1617	8.49	9.27	-	6.04
62	β-Vatireno	1619	-	9.63	-	-
23	β-Eudesmol	1638	-	8.33	-	-
63	Cadaleno	1658	-	-	-	3.54
64	Valeranona	1662	2.19	1.77	1.58	3.54
TOTAL			91.84	92.48	93.47	95.40

^a Índice de retención en columna no polar (DB-5) del compuesto identificado.

También se obtuvo el aceite esencial de *S. microphylla*, utilizando el método de hidrodestilación y se analizó por CG-EM. Por este método se identificaron 34 compuestos siendo los mayoritarios el α -eudesmol (**22**) y guaiol (**59**), seguidos por el dihidroxi-isocalamendiol (**61**), γ -eudesmol (**24**) β -cariofileno (**21**) y eucaliptol (**40**). Los resultados, que se presentan en la Tabla 4, tienen gran congruencia con los identificados por MEFS-EC. Es importante mencionar que la aplicación de un procedimiento MEFS-EC puede acortar los tiempos de evaluación de la calidad del material vegetal y proporcionar información útil del volatilo de la especie. Éste se considera uno de los métodos de preparación de muestras más eficientes, rápidos y amigables con el medio ambiente (Dawidowicz et al., 2016).

El efecto farmacológico del aceite esencial puede asociarse a los compuestos mayoritarios que se muestran en la Tabla 4. Diversos aceites esenciales son eficaces agentes antinociceptivos, entre ellos el de *Peperomia serpens* (Sw.) Loud, rico en α -eudesmol (**22**), β -cariofileno (**21**) y humuleno (**46**), tiene buen efecto antinociceptivo en las pruebas de estiramiento abdominal y de formalina (Pinheiro et al., 2011). La esencia de *Tagetes lucida* Cav. posee un alto contenido de β -cariofileno (**21**) y tanto el producto como la esencia fueron activos como agente antinociceptivo en las pruebas de la formalina y estiramiento abdominal (Hernandez-Leon et al., 2020). También, la esencia de *Croton conduplicatus*, rica en β -cariofileno (**21**), óxido de cariofileno (**58**) y alcanfor (**65**), fue analizada en las pruebas de formalina y de placa caliente disminuyendo los efectos nociceptivos del agente algogénico (De Oliveira Júnior et al., 2017). Estos datos permiten suponer que el efecto del aceite esencial de *S. microphylla* está asociado a los compuestos mayoritarios α -eudesmol (**22**), guaiol (**59**), dihidroxi-isocalamendiol (**61**), γ -eudesmol (**24**) β -cariofileno (**21**) y eucaliptol (**40**).

Tabla 4. Compuestos volátiles identificados por CG-EM en aceite esencial de *S. microphylla*.

No	Compuesto	IR ^a	Composición (%)
36	α-pineno	940	0.28
37	Canfeno	956	0.30
38	β-Pineno	984	0.43
40	Eucaliptol	1040	4.06
65	Camfor	1161	0.88
66	Borneol	1181	1.04
67	Terpinen-4-ol	1191	0.09
68	α-Terpineol	1202	0.12
69	Acetato de bornilo	1300	2.07
42	α-Cubebeno	1367	0.08
70	Ylangeno	1394	0.37
71	α-Copaeno	1398	0.41
45	γ-Elemeno	1422	0.02
72	α-Gurjunene	1437	0.53
21	β-Cariofileno	1449	5.49
73	Cadina-3,5-dieno	1471	0.44
46	Humuleno	1483	0.35
74	cis-Muurolo-4(15),5-dieno	1492	1.25
75	γ-Muuroloeno	1499	0.31
76	α-Muuroloeno	1504	0.25
77	Cubebol	1522	3.09
52	γ-Cadineno	1543	1.32
78	β-Cadineno	1546	1.84
54	Calameneno	1550	3.07
79	Elemol	1574	6.64
80	Octahydro-4,4,8,8-tetramethyl-4α	1588	4.23
59	Guaiol	1626	14.48
61	Dihidroxi-isocalamendiol	1642	10.47
24	γ-Eudesmol	1665	8.11
81	Selin-6-en-4α-ol	1675	2.94
23	β-Eudesmol	1691	15.79
82	Bulnesol	1700	1.74
64	Valeranona	1714	3.37
83	Isocalamenediol	1788	0.44
TOTAL			96.29

^a Índice de retención en columna no polar (DB-5) del compuesto identificado.

6.4. Perfil cromatográfico del extracto acuoso

Con el objetivo de establecer el perfil cromatográfico de la infusión de *S. microphylla* se utilizó cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas (CLAE- EM) con ionización por electroespray (ESI) en modalidad negativa; esta técnica permite el análisis de matrices con compuestos principalmente polares, poco volátiles y/o termolábiles, ya sea de forma cuantitativa o cualitativa, gracias a la obtención de espectro de masas correspondiente a cada compuesto separado. Además, permite determinar la identidad química de la especie de

estudio. La organización mundial de la salud (OMS) recomienda técnicas analíticas cromatográficas para control de calidad de las plantas por ser métodos sensibles, rápidos y confiables (Kumar et al., 2022).

En la Figura 11 se aprecian los compuestos mayoritarios (t_R = 3.6, 4.3 y 12.3 min). Al analizar los espectros de masas correspondientes (Figura 12) se pudieron identificar los ácidos cafeoil-quinicos **28-30** y rosmarínico (**31**), compuestos que fueron aislados y caracterizados de la fracción más polar del extracto acuoso. Dado que los ácidos cafeoil-quinicos poseen t_R similares, se visualizan como dos picos mayoritarios (t_R = 3.6, 4.3; A_R =8.55, 18.40%) considerando que al tiempo 4.3 min se encuentra una mezcla de ácidos. En el tiempo 12.3 min (A_R =15.36%) se detectó el ácido rosmarínico (**31**) que, al ser el compuesto mayoritario, puede ser propuesto como marcador principal para el desarrollo de pruebas de calidad de la especie.

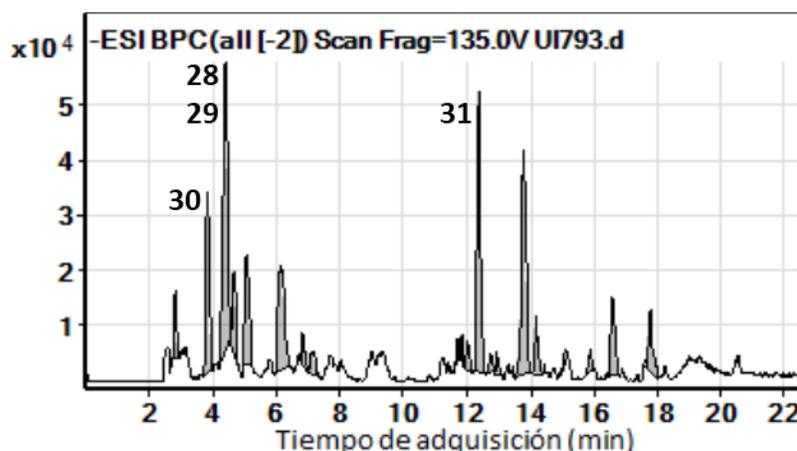


Figura 11. Perfil cromatográfico CLAE-EM del extracto acuoso total con detección ESI (-). Fase móvil: gradiente ácido fórmico al 0.1% (A)-ACN 100% (B): 0 min, 20% B; 5 min 20% B; 15 min 95% B; 35 min 95% B; 37 min 20% B Flujo: 0.50 mL/min.

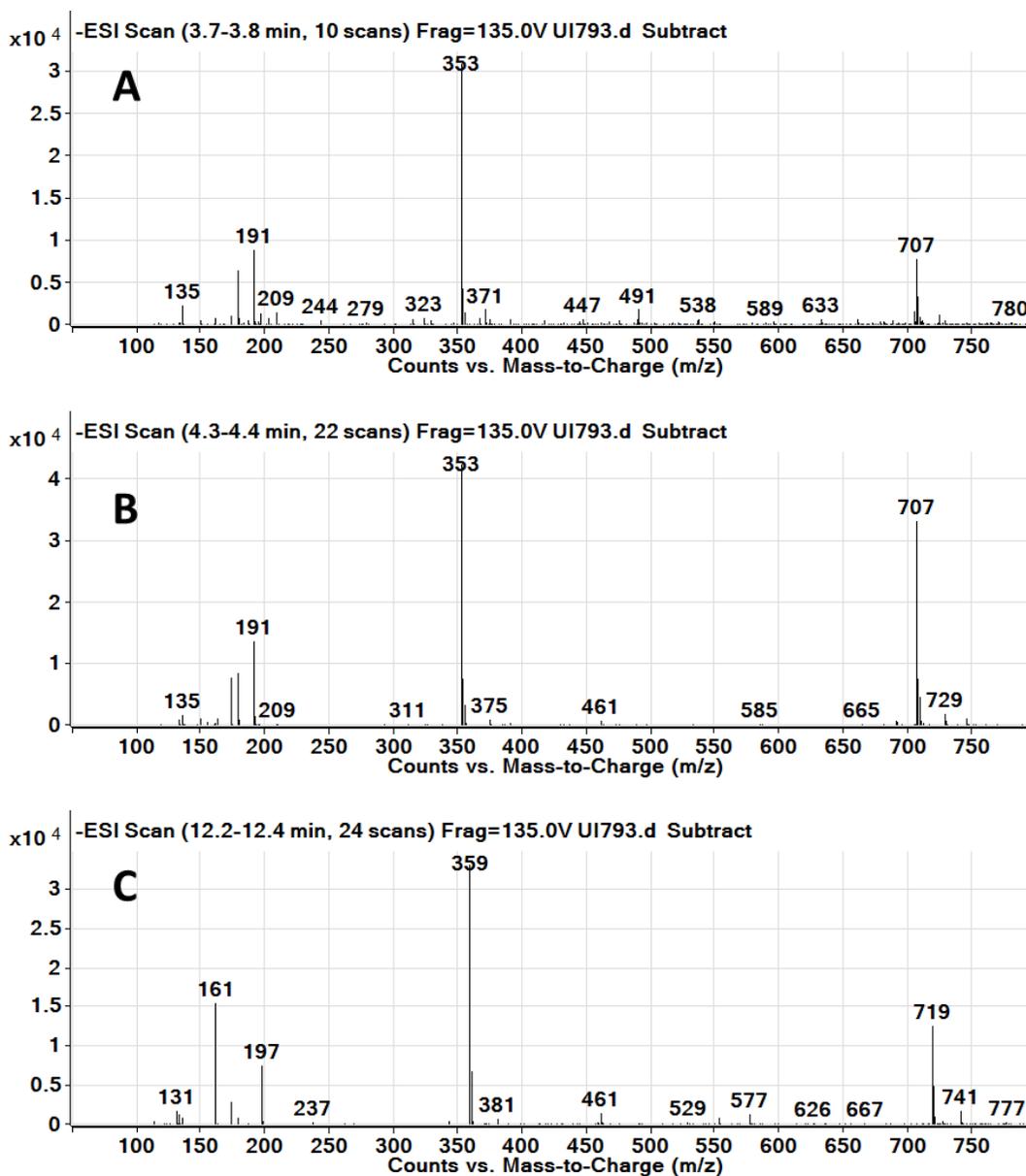


Figura 12. Espectros de masas (ESI-) de picos mayoritarios del perfil CLAE-EM. (A-B) Ácidos cafeoil-quínicos (C) Ácido rosmarínico.

La presencia de los productos **28-31** (Figura 9) en el extracto acuoso de *S. microphylla*, podrían explicar parcialmente la respuesta antinociceptiva del preparado tradicional (Bagdas et al., 2020; Castillejos-Ramírez et al., 2021; Dos Santos et al., 2010; Ferreira et al., 2006). Reportes previos han demostrado que el ácido rosmarínico (**31**), compuesto mayoritario de la infusión, tiene efectos antiinflamatorios y analgésicos, entre otros (Boonyarikpunchai et al., 2014; Hitl et

al., 2021). Investigaciones clínicas de infusiones con un alto contenido de ácido rosmarínico demostraron la disminución de dolor en pacientes con osteoartritis (Connelly et al., 2014; Scholey et al., 2014). Por otro lado, extractos con alto contenido de ácido clorogénico (**30**) y sus derivados tienen efectos antinociceptivos en diferentes modelos animales, incluyendo el de la inflamación crónica CFA (adyuvante completo de Freund) (Hamann et al., 2019), y las pruebas de la formalina y retirada de cola (Yonathan et al., 2006).

Es importante señalar que los flavonoides aislados en el extracto acuoso de *S. microphylla* también influyen en su respuesta biológica. La hesperetina (**32**), ha demostrado tener afinidad con receptores μ -opioides en estudios *in-vitro* (Higgs et al., 2013), mientras que la hesperedina induce un efecto antinociceptivo en modelos *in vivo* (Loscalzo et al., 2011). Se ha comprobado también que la hesperetina inhibe la expresión de COX-2 *in vitro*, y por ende genera una actividad antiinflamatoria (Hirata et al., 2005). Por otro lado, la orientina (**33**) es un compuesto bioactivo prometedor frecuentemente encontrado en plantas medicinales, con efectos antioxidantes, antivirales, antibacterianos, antiinflamatorios, vasodilatadores, cardioprotectores, neuroprotectores, y antinociceptivos (Lam et al., 2016). Así el compuesto **33** generó un efecto antinociceptivo dosis dependiente en los modelos de estiramiento abdominal y capsaicina (Da Silva et al., 2010). Mientras que la fracción orgánica del extracto acuoso de *Melampodium divaricatum* rico en hiperósido (**34**) e isoquercitrina (**35**), presentó actividad antinociceptiva en el modelo de la formalina (Pérez-Vásquez et al., 2021); estos productos además han demostrado actividades anticancerígena, antiinflamatoria y neuroprotectora (Raza et al., 2017; Wang et al., 2022).

7. CONCLUSIONES

- La eficacia antinociceptiva del preparado tradicional de *S. microphylla* se estableció en las pruebas de la formalina y estiramiento abdominal. El efecto farmacológico demostrado puede estar relacionado con la presencia en el preparado tradicional de los ácidos 3-cafeoil quínico (**28**), 4-cafeoil quínico (**29**), 5-cafeoil quínico (**30**) y rosmarínico (**31**), y los flavonoides hesperetina (**32**), orientina (**33**), hiperósido (**34**) e isoquercitrina (**35**).
- Se estableció la actividad antinociceptiva del compuesto mayoritario del preparado tradicional, el ácido rosmarínico (**31**), en la prueba de la formalina. De acuerdo con los resultados obtenidos en la evaluación, este producto participa parcialmente en la actividad del extracto acuoso total.
- La eficacia antinociceptiva del aceite esencial de *S. microphylla* se estableció en la prueba de la formalina, actividad que se asocia *a priori* con la presencia de α -eudesmol (**22**), guaiol (**59**), dihidroxi-isocalamendiol (**61**), γ -eudesmol (**24**) β -cariofileno (**21**) y eucaliptol (**40**) en el volatilo de la planta.
- El perfil cromatográfico del extracto acuoso se estableció con la finalidad de contribuir al desarrollo de pruebas de calidad de *S. microphylla*. El ácido rosmarínico (**31**) se propone como marcador químico para las pruebas de identidad y composición de esta especie.
- El análisis del volatilo de la especie por MEFS-EC permitió identificar al β -cariofileno (**21**), γ -eudesmol (**24**), β -eudesmol (**23**) y dehidroxi-isocalamendiol (**61**) como los volátiles más abundantes de la planta. El análisis por MEFS-EC acoplado al CG-EM será de utilidad como prueba de identidad de la droga cruda del mirto.

8. PERSPECTIVAS

- Determinar la eficacia preclínica de los productos mayoritarios del aceite esencial como agentes antinociceptivos.
- Analizar el extracto orgánico total en búsqueda de otros metabolitos que puedan influir en la actividad antinociceptiva de *Salvia microphylla*.
- Desarrollar y validar un método cromatográfico para el establecimiento de pruebas de calidad y composición para contribuir con el uso racional de la especie.
- Generar las monografías tipo OMS y farmacopéica con los resultados obtenidos en este trabajo y los que se lograr completar en un futuro cercano.

REFERENCIAS

- Abd Rashed, A., & Rathi, D.-N. G. (2021). Bioactive Components of *Salvia* and Their Potential Antidiabetic Properties: A Review. *Molecules*, 26(10), 10. <https://doi.org/10.3390/molecules26103042>
- Afonso, A. F., Pereira, O. R., & Cardoso, S. M. (2021). *Salvia* Species as Nutraceuticals: Focus on Antioxidant, Antidiabetic and Anti-Obesity Properties. *Applied Sciences*, 11(20), 20. <https://doi.org/10.3390/app11209365>
- Álamo, C. (2016). ¿Existen argumentos para combinar un opioide con otro opioide? *Revista de la Sociedad Española del Dolor*. <https://doi.org/10.20986/resed.2016.3450/2016>
- Armstrong, S. A., & Herr, M. J. (2022). Physiology, Nociception. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551562/>
- Aydoğmuş, Z., Yeşilyurt, V., & Topcu, G. (2006). Constituents of *Salvia microphylla*. *Natural Product Research*, 20(8), 775-781. <https://doi.org/10.1080/14786410500462843>
- Bagdas, D., Gul, Z., Meade, J. A., Cam, B., Cinkilic, N., & Gurun, M. S. (2020). Pharmacologic Overview of Chlorogenic Acid and its Metabolites in Chronic Pain and Inflammation. *Current Neuropharmacology*, 18(3), 216. <https://doi.org/10.2174/1570159X17666191021111809>
- Bannon, A. W., & Malmberg, A. B. (2007). Models of Nociception: Hot-Plate, Tail-Flick, and Formalin Tests in Rodents. *Current Protocols in Neuroscience*, 41(1), 8.9.1-8.9.16. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0809s41>
- Baricevic, D., Sosa, S., Della Loggia, R., Tubaro, A., Simonovska, B., Krasna, A., & Zupancic, A. (2001). Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: The relevance of ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, 75(2), 125-132. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00396-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00396-2)
- Barrot, M. (2012). Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*, 211, 39-50. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.12.041>
- Bauer, J., Kuehnl, S., Rollinger, J. M., Scherer, O., Northoff, H., Stuppner, H., Werz, O., & Koeberle, A. (2012). Carnosol and Carnosic Acids from *Salvia officinalis* Inhibit Microsomal Prostaglandin E2 Synthase-1. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 342(1), 169-176. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.193847>
- Bautista, E., Toscano, R. A., & Ortega, A. (2014). 5,10-seco-neo-Clerodanes and neo-Clerodanes from *Salvia microphylla*. *Journal of Natural Products*, 77(4), 1088-1092. <https://doi.org/10.1021/np4009893>
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009). *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/>
- Boonyarikpunchai, W., Sukrong, S., & Towiwat, P. (2014). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid isolated from *Thunbergia laurifolia* Lindl.

Pharmacology Biochemistry and Behavior, 124, 67-73.
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.05.004>

- Boora, K. (2007). Tramadol. En S. J. Enna & D. B. Bylund (Eds.), *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* (pp. 1-7). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.62788-6>
- Calzada, F., & Bautista, E. (2020). Plants used for the treatment of diarrhoea from Mexican flora with amoebicidal and giardicidal activity, and their phytochemical constituents. *Journal of Ethnopharmacology*, 253, 112676.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112676>
- Castillejos-Ramírez, E., Pérez-Vásquez, A., Torres-Colín, R., Navarrete, A., Andrade-Cetto, A., & Mata, R. (2021). Antinociceptive Effect of an Aqueous Extract and Essential Oil from *Baccharis heterophylla*. *Plants*, 10(1), 1.
<https://doi.org/10.3390/plants10010116>
- Chincholkar, M. (2018). Analgesic mechanisms of gabapentinoids and effects in experimental pain models: A narrative review. *British Journal of Anaesthesia*, 120(6), 1315-1334. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2018.02.066>
- Chouit, H., Touafek, O., Brada, M., Benssouici, C., Fauconnier, M.-L., Hattab, M. E., Chouit, H., Touafek, O., Brada, M., Benssouici, C., Fauconnier, M.-L., & Hattab, M. E. (2021). GC-MS Analysis and Biological Activities of Algerian *Salvia microphylla* Essential Oils. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 65(4), 582-601.
<https://doi.org/10.29356/jmcs.v65i4.1581>
- Coffeen, U., & Pellicer, F. (2019). *Salvia divinorum*: From recreational hallucinogenic use to analgesic and anti-inflammatory action. *Journal of Pain Research*, 12, 1069-1076.
<https://doi.org/10.2147/JPR.S188619>
- Connelly, A., Tucker, A., Tulk, H., Catapang, M, Chapman, L., Sheikh, N., Yurchenko, D., Fletcher, R., Kott, L., Duncan, A., & Wright, A. (2014). High-rosmarinic acid spearmint tea in the management of knee osteoarthritis symptoms. *Journal of Medicinal Food*, 17(12). <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0189>
- Cornejo-Tenorio, G., & Ibarra-Manríquez, G. (2011). Diversidad y distribución del género *Salvia* (Lamiaceae) en Michoacán, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 82(4), 1279-1296.
- Da Silva, R. Z., Yunes, R. A., de Souza, M. M., Monache, F. D., & Cechinel-Filho, V. (2010). Antinociceptive properties of conocarpan and orientin obtained from *Piper solmsianum* C. DC. var. *Solmsianum* (Piperaceae). *Journal of Natural Medicines*, 64(4), 402-408. <https://doi.org/10.1007/s11418-010-0421-x>
- Dawidowicz, A. L., Szewczyk, J., & Dybowski, M. P. (2016). Modified application of HS-SPME for quality evaluation of essential oil plant materials. *Talanta*, 146, 195-202.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.08.043>
- De Oliveira Júnior, R. G., Ferraz, C. A. A., Silva, J. C., De Oliveira, A. P., Diniz, T. C., E Silva, M. G., Quintans Júnior, L. J., De Souza, A. V. V., Dos Santos, U. S., Turatti, I.

- C. C., Lopes, N. P., Lorenzo, V. P., & Almeida, J. R. G. da S. (2017). Antinociceptive Effect of the Essential Oil from *Croton conduplicatus* Kunth (Euphorbiaceae). *Molecules*, 22(6), 6. <https://doi.org/10.3390/molecules22060900>
- Díaz, J. L. (2014). *Salvia divinorum*: Enigma psicofarmacológico y resquicio mente-cuerpo. *Salud mental*, 37(3), 183-193.
- Dos Santos, M. D., Chen, G., Almeida, M. C., Soares, D. M., Souza, G. E. P. de, Lopes, N. P., & Lantz, R. C. (2010). Effects of Caffeoylquinic Acid Derivatives and C-Flavonoid from *Lychnophora ericoides* on in vitro Inflammatory Mediator Production. *Natural Product Communications*, 5(5), 733.
- Dzoyem, J. P., McGaw, L. J., Kuete, V., & Bakowsky, U. (2017). Chapter 9—Anti-inflammatory and Anti-nociceptive Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. En V. Kuete (Ed.), *Medicinal Spices and Vegetables from Africa* (pp. 239-270). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00009-1>
- Esquivel, B., Cardenas, J., Rodriguez-Hahn, L., & Ramamoorthy, T. P. (1987). The Diterpenoid Constituents of *Salvia fulgens* and *Salvia microphylla*. *Journal of Natural Products*, 50(4), 738-740. <https://doi.org/10.1021/np50052a029>
- Ezema, C. A., Ezeorba, T. P. C., Aguchem, R. N., & Okagu, I. U. (2022). Therapeutic benefits of *Salvia* species: A focus on cancer and viral infection. *Heliyon*, 8(1), e08763. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08763>
- Fernandez, E., & Turk, D. C. (1992). Sensory and affective components of pain: Separation and synthesis. *Psychological Bulletin*, 112(2), 205-217. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.112.2.205>
- Fernando, M.-P., Alberto, H.-L., María Guadalupe, V.-D., Agustina, C.-M., Fernando, N.-G., Eva, A.-H., Hermelinda, S.-C., & María Eva, G.-T. (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>
- Ferreira, A. A., Amaral, F. A., Duarte, I. D. G., Oliveira, P. M., Alves, R. B., Silveira, D., Azevedo, A. O., Raslan, D. S., & Castro, M. S. A. (2006). Antinociceptive effect from *Ipomoea cairica* extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 105(1), 148-153. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.10.012>
- Fitzcharles, M.-A., Cohen, S. P., Clauw, D. J., Littlejohn, G., Usui, C., & Häuser, W. (2021). Nociceptive pain: Towards an understanding of prevalent pain conditions. *Lancet (London, England)*, 397(10289), 2098-2110. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00392-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00392-5)
- Freyenhagen, R., Parada, H. A., Calderon-Ospina, C. A., Chen, J., Rakhmawati Emril, D., Fernández-Villacorta, F. J., Franco, H., Ho, K.-Y., Lara-Solares, A., Li, C. C.-F., Mimenza Alvarado, A., Nimmaanrat, S., Dolma Santos, M., & Ciampi de Andrade, D. (2019). Current understanding of the mixed pain concept: A brief narrative review. *Current Medical Research and Opinion*, 35(6), 1011-1018. <https://doi.org/10.1080/03007995.2018.1552042>

- Ghorbani, A., & Esmailizadeh, M. (2017). Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7(4), 433-440. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.12.014>
- Hafez Ghoran, S., Taktaz, F., Mozafari, A. A., Tunçtürk, M., Sekeroglu, N., & Kijjoa, A. (2022). Uncommon Terpenoids from *Salvia* Species: Chemistry, Biosynthesis and Biological Activities. *Molecules*, 27(3), 3. <https://doi.org/10.3390/molecules27031128>
- Hamann, F. R., Brusco, I., de Campos Severo, G., de Carvalho, L. M., Faccin, H., Gobo, L., Oliveira, S. M., & Rubin, M. A. (2019). *Mansoa alliacea* extract presents antinociceptive effect in a chronic inflammatory pain model in mice through opioid mechanisms. *Neurochemistry International*, 122, 157-169. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.11.017>
- Hamidpour, M., Hamidpour, R., Hamidpour, S., & Shahlari, M. (2014). Chemistry, Pharmacology, and Medicinal Property of Sage (*Salvia*) to Prevent and Cure Illnesses such as Obesity, Diabetes, Depression, Dementia, Lupus, Autism, Heart Disease, and Cancer. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 4(2), 82-88. <https://doi.org/10.4103/2225-4110.130373>
- Hernandez-Leon, A., González-Trujano, M. E., Narváez-González, F., Pérez-Ortega, G., Rivero-Cruz, F., & Aguilar, M. I. (2020). Role of β -Caryophyllene in the Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of *Tagetes lucida* Cav. Essential Oil. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(3), E675. <https://doi.org/10.3390/molecules25030675>
- Hernandez-Leon, A., Moreno-Pérez, G. F., Martínez-Gordillo, M., Aguirre-Hernández, E., Valle-Dorado, M. G., Díaz-Reval, M. I., González-Trujano, M. E., & Pellicer, F. (2021). Lamiaceae in Mexican Species, a Great but Scarcely Explored Source of Secondary Metabolites with Potential Pharmacological Effects in Pain Relief. *Molecules*, 26(24), 24. <https://doi.org/10.3390/molecules26247632>
- Higgs, J., Wasowski, C., Loscalzo, L. M., & Marder, M. (2013). In vitro binding affinities of a series of flavonoids for μ -opioid receptors. Antinociceptive effect of the synthetic flavonoid 3,3-dibromoflavanone in mice. *Neuropharmacology*, 72, 9-19. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.020>
- Hirata, A., Murakami, Y., Shoji, M., Kadoma, Y., & Fujisawa, S. (2005). Kinetics of radical-scavenging activity of hesperetin and hesperidin and their inhibitory activity on COX-2 expression. *Anticancer Research*, 25(5), 3367-3374.
- Hitl, M., Kladar, N., Gavarić, N., & Božin, B. (2021). Rosmarinic Acid-Human Pharmacokinetics and Health Benefits. *Planta Medica*, 87(4), 273-282. <https://doi.org/10.1055/a-1301-8648>
- Hunskar, S., & Hole, K. (1987). The formalin test in mice: Dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *PAIN*, 30(1), 103-114. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(87\)90088-1](https://doi.org/10.1016/0304-3959(87)90088-1)
- IASP. (2021). Terminology | International Association for the Study of Pain. *International Association for the Study of Pain (IASP)*. <https://www.iasp-pain.org/resources/terminology/>

- Iwai, K., Kishimoto, N., Kakino, Y., Mochida, K., & Fujita, T. (2004). In Vitro Antioxidative Effects and Tyrosinase Inhibitory Activities of Seven Hydroxycinnamoyl Derivatives in Green Coffee Beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4893-4898. <https://doi.org/10.1021/jf040048m>
- 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>
- Jung, I., Kim, H., Moon, S., Lee, H., & Kim, B. (2020). Overview of *Salvia miltiorrhiza* as a Potential Therapeutic Agent for Various Diseases: An Update on Efficacy and Mechanisms of Action. *Antioxidants*, 9(9), 9. <https://doi.org/10.3390/antiox9090857>
- Khadhri, A., Aouadhi, C., Masson, E., & Pizzi, A. (2022). Comparison of Essential Oil Composition, Phenolic Compound and Biological Activities of *Salvia microphylla* and *Teucrium polium* (Lamiaceae). *Journal of Renewable Materials*, 10(6), 6. <https://doi.org/10.32604/jrm.2022.018950>
- Kidd, B. L., & Urban, L. A. (2001). Mechanisms of inflammatory pain. *BJA: British Journal of Anaesthesia*, 87(1), 3-11. <https://doi.org/10.1093/bja/87.1.3>
- Kim, S. Y., Moon, T. C., Chang, H. W., Son, K. H., Kang, S. S., & Kim, H. P. (2002). Effects of tanshinone I isolated from *Salvia miltiorrhiza* Bunge on arachidonic acid metabolism and in vivo inflammatory responses. *Phytotherapy Research*, 16(7), 616-620. <https://doi.org/10.1002/ptr.941>
- Kim, Y. C., Higuchi, R., & Komori, T. (1992). Thermal Degradation of Glycosides, VI. Hydrothermolysis of Cardenolide and Flavonoid Glycosides. *Liebigs Annalen Der Chemie*, 1992(6), 575-579. <https://doi.org/10.1002/jlac.1992199201100>
- Kintzios, S. E. (2000). *Sage: The Genus Salvia*. CRC Press.
- Kumar, S., Kumari, D., & Singh, B. (2022). Genus *Rauvolfia*: A review of its ethnopharmacology, phytochemistry, quality control/quality assurance, pharmacological activities and clinical evidence. *Journal of Ethnopharmacology*, 295, 115327. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115327>
- Lam, K. Y., Ling, A. P. K., Koh, R. Y., Wong, Y. P., & Say, Y. H. (2016). A Review on Medicinal Properties of Orientin. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2016, 4104595. <https://doi.org/10.1155/2016/4104595>
- Langford, D. J., & Mogil, J. S. (2008). Chapter 23—Pain Testing in the Laboratory Mouse. En R. E. Fish, M. J. Brown, P. J. Danneman, & A. Z. Karas (Eds.), *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals (Second Edition)* (pp. 549-560). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012373898-1.50027-9>
- Le Bars, D., Gozariu, M., & Cadden, S. (2002). Animal Models of Nociception. *Pharmacological reviews*, 53, 597-652.
- Lima, R. K., Cardoso, M. das G., Andrade, M. A., Guimarães, P. L., Batista, L. R., & Nelson, D. L. (2012). Bactericidal and Antioxidant Activity of Essential Oils from

- Myristica fragrans* Houtt and *Salvia microphylla* H.B.K. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(3), 523-528. <https://doi.org/10.1007/s11746-011-1938-1>
- Loscalzo, L. M., Yow, T. T., Wasowski, C., Chebib, M., & Marder, M. (2011). Hesperidin induces antinociceptive effect in mice and its aglicone, hesperetin, binds to μ -opioid receptor and inhibits GIRK1/2 currents. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 99(3), 333-341. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.05.018>
- Lueptow, L. M., Fakira, A. K., & Bobeck, E. N. (2018). The Contribution of the Descending Pain Modulatory Pathway in Opioid Tolerance. *Frontiers in Neuroscience*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2018.00886>
- Milani, D. A. Q., & Davis, D. D. (2022). Pain Management Medications. En *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560692/>
- Mischkowski, D., Palacios-Barrios, E. E., Banker, L., Dildine, T. C., & Atlas, L. Y. (2018). Pain or nociception? Subjective experience mediates the effects of acute noxious heat on autonomic responses. *Pain*, 159(4), 699-711. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001132>
- Missouri Botanical Garden. (2022, agosto 22). *!Salvia microphylla Kunth*. Tropicos.com. <http://legacy.tropicos.org/Name/17603325?projectid=3>
- Moreno Pérez, G.F., Narváez González, H.F., & González Trujano, M.E. (2020). Plantas medicinales para el alivio del dolor. *Revista Ciencia*, 71, 44-51.
- Motyka, S., Koc, K., Ekiert, H., Blicharska, E., Czarnek, K., & Szopa, A. (2022). The Current State of Knowledge on *Salvia hispanica* and *Salviae hispanicae* semen (Chia Seeds). *Molecules*, 27(4), 4. <https://doi.org/10.3390/molecules27041207>
- Munro, G. (2009). Pharmacological assessment of the rat formalin test utilizing the clinically used analgesic drugs gabapentin, lamotrigine, morphine, duloxetine, tramadol and ibuprofen: Influence of low and high formalin concentrations. *European Journal of Pharmacology*, 605(1), 95-102. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.01.004>
- NIST Standard Reference Data. (2021). *Búsqueda de Datos de Especies por el Número de Registro CAS*. <https://webbook.nist.gov/chemistry/cas-ser/>
- Olivier, D. K., van Wyk, B.-E., & van Heerden, F. R. (2008). The chemotaxonomic and medicinal significance of phenolic acids in Arctopus and Alepidea (Apiaceae subfamily Saniculoideae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 36(9), 724-729. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2008.07.003>
- Ordóñez Díaz, María de Jesús. (2018). *Atlas biocultural de huertos familiares en México: Chiapas, Hidalgo, Oaxaca, Veracruz y península de Yucatán* (p. 263).
- Ortiz-Mendoza, N., Aguirre-Hernández, E., Fragoso-Martínez, I., González-Trujano, M. E., Basurto-Peña, F. A., & Martínez-Gordillo, M. J. (2022). A Review on the Ethnopharmacology and Phytochemistry of the Neotropical Sages (*Salvia* Subgenus Calosphace; Lamiaceae) Emphasizing Mexican Species. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2022.867892>

- Osterweis, M., Kleinman, A., & Mechanic, D. (1987). *The Anatomy and Physiology of Pain. En Pain and Disability: Clinical, Behavioral, and Public Policy Perspectives*. National Academies Press (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK219252/>
- Pérez-Vásquez, A., Padilla-Mayne, S., Martínez, A. L., Calderón, J. S., Macías-Rubalcava, M. L., Torres-Colín, R., Rangel-Grimaldo, M., & Mata, R. (2021). Antinociceptive Activity of Compounds from the Aqueous Extract of *Melampodium divaricatum*. *Chemistry & Biodiversity*, 18(8), e2100369. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100369>
- Pinheiro, B. G., Silva, A. S. B., Souza, G. E. P., Figueiredo, J. G., Cunha, F. Q., Lahlou, S., da Silva, J. K. R., Maia, J. G. S., & Sousa, P. J. C. (2011). Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. *Journal of Ethnopharmacology*, 138(2), 479-486. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.09.037>
- Pizani, R. S., Viganó, J., de Souza Mesquita, L. M., Contieri, L. S., Sanches, V. L., Chaves, J. O., Souza, M. C., da Silva, L. C., & Rostagno, M. A. (2022). Beyond aroma: A review on advanced extraction processes from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and sage (*Salvia officinalis*) to produce phenolic acids and diterpenes. *Trends in Food Science & Technology*, 127, 245-262. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.07.001>
- Poulios, E., Giaginis, C., & Vasios, G. K. (2020). Current State of the Art on the Antioxidant Activity of Sage (*Salvia* spp.) and Its Bioactive Components. *Planta Medica*, 86(04), 224-238. <https://doi.org/10.1055/a-1087-8276>
- Qnais, E. Y., Abu-Dieyeh, M., Abdulla, Fuad. A., & Abdalla, S. S. (2010). The antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Salvia officinalis* leaf aqueous and butanol extracts. *Pharmaceutical Biology*, 48(10), 1149-1156. <https://doi.org/10.3109/13880200903530763>
- Rayyan, S., Fossen, T., Solheim Nateland, H., & Andersen, O. M. (2005). Isolation and identification of flavonoids, including flavone rotamers, from the herbal drug «*Crataegi folium cum flore*» (hawthorn). *Phytochemical Analysis: PCA*, 16(5), 334-341. <https://doi.org/10.1002/pca.853>
- Raza, A., Xu, X., Sun, H., Tang, J., & Ouyang, Z. (2017). Pharmacological activities and pharmacokinetic study of hyperoside: A short review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 16(2), 2. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v16i2>
- Rodrigues, M. R. A., Kanazawa, L. K. S., Neves, T. L. M. das, Silva, C. F. da, Horst, H., Pizzolatti, M. G., Santos, A. R. S., Baggio, C. H., & Werner, M. F. de P. (2012). Antinociceptive and anti-inflammatory potential of extract and isolated compounds from the leaves of *Salvia officinalis* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 139(2), 519-526. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.11.042>
- Romo-Asunción, D., Ávila-Calderón, M. A., Ramos-López, M. A., Barranco-Flrido, J. E., Rodríguez-Navarro, S., Romero-Gomez, S., Aldeco-Pérez, E. J., Pacheco-Aguilar, J. R., & Rico-Rodríguez, M. A. (2016). Juvenomimetic and Insecticidal Activities of *Senecio salignus* (Asteraceae) and *Salvia microphylla* (Lamiaceae) on *Spodoptera*

- frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist*, 99(3), 345-351. <https://doi.org/10.1653/024.099.0301>
- Royal Botanic Gardens. (2022). *Salvia L. | Plants of the World Online | Kew Science*. Plants of the World Online. <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30000096-2>
- Schmidt, B., Jaroszewski, J. W., Bro, R., & Witt, M. (2008). Combining PARAFAC Analysis of HPLC-PDA Profiles and Structural Characterization Using HPLC-PDA-SPE-NMR-MS Experiments: Commercial Preparations of St. John's Wort. *Analytical Chemistry*, 80(6), 1978-1987. <https://doi.org/10.1021/ac702064p>
- Scholey, A., Gibbs, A., Neale, C., Perry, N., Ossoukhova, A., Bilog, V., Kras, M., Scholz, C., Sass, M., & Buchwald-Werner, S. (2014). Anti-Stress Effects of Lemon Balm-Containing Foods. *Nutrients*, 6(11), 4805. <https://doi.org/10.3390/nu6114805>
- Sharifi-Rad, M., Ozcelik, B., Altın, G., Daşkaya-Dikmen, C., Martorell, M., Ramírez-Alarcón, K., Alarcón-Zapata, P., Morais-Braga, M. F. B., Carneiro, J. N. P., Alves Borges Leal, A. L., Coutinho, H. D. M., Gyawali, R., Tahergorabi, R., Ibrahim, S. A., Sahrifi-Rad, R., Sharopov, F., Salehi, B., del Mar Contreras, M., Segura-Carretero, A., ... Sharifi-Rad, J. (2018). *Salvia* spp. Plants-from farm to food applications and phytopharmacotherapy. *Trends in Food Science & Technology*, 80, 242-263. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.008>
- Shen, C.-C., Chang, Y.-S., & Hott, L.-K. (1993). Nuclear magnetic resonance studies of 5,7-dihydroxyflavonoids. *Phytochemistry*, 34(3), 843-845. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(93\)85370-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(93)85370-7)
- Sneddon, L. U. (2018). Comparative Physiology of Nociception and Pain. *Physiology*, 33(1), 63-73. <https://doi.org/10.1152/physiol.00022.2017>
- Thai, V., & Fainsinger, R. L. (2011). Chapter 7—Pain. En L. L. Emanuel & S. L. Librach (Eds.), *Palliative Care (Second Edition)* (pp. 95-114). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-1619-1.00007-X>
- Tjølsen, A., Berge, O.-G., Hunskaar, S., Rosland, J. H., & Hole, K. (1992). The formalin test: An evaluation of the method. *Pain*, 51(1), 5-17. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(92\)90003-T](https://doi.org/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>
- Torres Méndez, R. (2020). *Tratamiento del dolor en México*. 71(2), 62-67.
- Valizadeh, M., Rehman, F. ur, Hassanzadeh, M. A., Beigomi, M., & Fazeli-Nasab, B. (2021). Investigating the Antimicrobial Effects of *Glycyrrhiza glabra* and *Salvia*

- officinalis* Ethanolic Extract Against *Helicobacter pylori*. *International Journal of Infection*, 8(4), 4. <https://doi.org/10.5812/iji.114563>
- Vasko, M. R. (2009). Inflammatory Pain. In M. D. Binder, N. Hirokawa, & U. Windhorst (Eds.), *Encyclopedia of Neuroscience* (pp. 1952-1955). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-29678-2_2436
- Veitch, N. C., Grayer, R. J., Irwin, J. L., & Takeda, K. (1998). Flavonoid cellobiosides from *Salvia uliginosa*. *Phytochemistry*, 48(2), 389-393. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)01111-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)01111-4)
- Wang, M., & Thyagarajan, B. (2022). Pain pathways and potential new targets for pain relief. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(1), 110-123. <https://doi.org/10.1002/bab.2086>
- Wang, W., Ren, X., Bao, Y., Zhu, Y., Zhang, Y., Li, J., & Peng, Z. (2022). Inhibitory effects of hyperoside and quercitrin from *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. Leaf on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine formation by trapping phenylacetaldehyde. *European Food Research and Technology*, 248(1), 25-34. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03676-9>
- Wang, X., Morris-Natschke, S. L., & Lee, K.-H. (2007). New developments in the chemistry and biology of the bioactive constituents of tanshen. *Medicinal Research Reviews*, 27(1), 133-148. <https://doi.org/10.1002/med.20077>
- Wasielewska, M., Banel, A., & Zygmunt, B. (2013). Solid Phase Micro-Extraction, a Versatile and Handy Tool in Environmental Trace Organic Analysis, Gets a New Class of Coatings, Polymeric Ionic Liquids. *International Journal of Environmental Science and Development*, 221-224. <https://doi.org/10.7763/IJESD.2013.V4.339>
- Wheeler-Aceto, H., & Cowan, A. (1991a). Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. *Psychopharmacology*, 104(1), 35-44. <https://doi.org/10.1007/BF02244551>
- Wheeler-Aceto, H., & Cowan, A. (1991b). Neurogenic and tissue-mediated components of formalin-induced edema: Evidence for supraspinal regulation. *Agents and Actions*, 34(1-2), 264-269. <https://doi.org/10.1007/BF01993299>
- Woolf, C. J. (2004). Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific Pharmacologic Management. *Annals of Internal Medicine*, 140(6), 441-451. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-140-8-200404200-00010>
- 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>
- Yam, M. F., Loh, Y. C., Oo, C. W., & Basir, R. (2020). Overview of Neurological Mechanism of Pain Profile Used for Animal "Pain-Like" Behavioral Study with Proposed Analgesic Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 12. <https://doi.org/10.3390/ijms21124355>

- Yang, C., Wang, J., & Li, D. (2013). Microextraction techniques for the determination of volatile and semivolatile organic compounds from plants: A review. *Analytica Chimica Acta*, 799, 8-22. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.07.069>
- Yonathan, M., Asres, K., Assefa, A., & Bucar, F. (2006). In vivo anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Cheilanthes farinosa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 108(3), 462-470. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.06.006>

ANEXOS

Tabla S1. Datos de RMN de 28, 29 y 30 en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ (¹ H 600 MHz; ¹³ C 151 MHz).....	73
Tabla S2. Datos de RMN de 31 en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ (¹ H 600 MHz; ¹³ C 151 MHz).	73
Tabla S3. Datos de RMN de 32 en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ (¹ H 600 MHz; ¹³ C 151 MHz).	74
Tabla S4. Datos de RMN de 33 en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ (¹ H 600 MHz; ¹³ C 151 MHz).	74
Tabla S5. Datos de RMN de 34 y 35 en mezcla (¹ H 600 MHz; ¹³ C 151 MHz, CH ₃ OH- <i>d</i> ₄).....	75
Figura S1. Espectro de IR de ácido 3-cafeoilquínico (28).	76
Figura S2. Espectro de RMN ¹ H de ácido 3-cafeoilquínico (28) en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ (¹ H 600 MHz).....	77
Figura S3. Espectro de RMN ¹³ C de ácido 3-cafeoilquínico (28) en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ (¹³ C 151 MHz).....	78
Figura S4. Espectro de IR de ácido 4-cafeoilquínico (29).	79
Figura S5. Espectro de UV de ácido 4-cafeoilquínico (29).....	80
Figura S6. Espectro de RMN ¹ H de ácido 4-cafeoilquínico (29) en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ (¹ H 600 MHz).....	81
Figura S7. Espectro de RMN ¹³ C de ácido 4-cafeoilquínico (29) en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ (¹³ C 151 MHz).....	82
Figura S8. Espectro de IR de ácido 5-cafeoilquínico (30).	83
Figura S9. Espectro de UV de ácido 5-cafeoilquínico (30).....	84
Figura S10. Espectro de RMN ¹ H de ácido 5-cafeoilquínico (30) en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ (¹ H 600 MHz).....	85
Figura S11. Espectro de RMN ¹³ C de ácido 5-cafeoilquínico (30) en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ (¹³ C 151 MHz).....	86
Figura S12. Espectro de IR de ácido rosmarínico (31).....	87

Figura S13. Espectro de UV de ácido rosmarínico (31).	88
Figura S14. Espectro de RMN ¹ H de ácido rosmarínico (31) en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ (¹ H 600 MHz).....	89
Figura S15. Espectro IR de hesperetina (32).	90
Figura S16. Espectro UV de hesperetina (32).....	91
Figura S17. Espectro de RMN ¹ H de hesperetina (32) en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ (¹ H 600 MHz).	92
Figura S18. Espectro de RMN ¹³ C de hesperetina (32) en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ (¹³ C 151 MHz).....	93
Figura S19. Espectro de RMN ¹ H de orientina (33) en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ (¹ H 600 MHz)..	94
Figura S20. Cuadros de conectividad de azúcar unida a compuesto 33 en experimento COSY.	95
Figura S21. Espectroscopía IR de 34 y 35.....	96
Figura S22. Espectro UV de 34 y 35.....	97
Figura S23. Espectro de RMN ¹ H de mezcla de compuestos 34 y 35 en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ (¹ H 600 MHz).....	98
Figura S24. Espectro de RMN ¹³ C de mezcla de compuestos 34 y 35 en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ (¹³ C 151 MHz).	99
Figura S25. Espectros bidimensionales de la mezcla de compuestos 34 y 35. (A) HMBC (B) HSQC (C) TOCSY.	100
Figura S26. Cuadros de conectividad de azúcares en experimento COSY de la mezcla de compuestos. (A) β-glucosa de 35 y (B) β-galactosa de 34.....	101

Tabla S1. Datos de RMN de **28**, **29** y **30** en CH₃OH-*d*₄ (¹H 600 MHz; ¹³C 151 MHz).

Posición	28		29		30	
	δ _c	δ _H (J en Hz)	δ _c	δ _H (J en Hz)	δ _c	δ _H (J en Hz)
1	76.0	-	76.1	-	71.8	-
2	41.4	1.95-2.00, m	42.1	1.99 - 2.24, m	39.2	2.07-2.11, m
3	73.3	5.38, d** (3.9)	69.0	4.25 - 4.33, m	73.9	4.18, s*
4	74.9	3.69, dd (8.2, 3.9)	78.6	4.82, dd (9.3, 3.0)	71.7	3.73, dd (8.6, 3.1)
5	69.1	4.13, dt (8.2, 4.4)	65.0	4.25 - 4.33, m	72.2	5.36, dt (8.6,4.6)
6	37.2	2.13-2.19, m	37.8	1.99 - 2.24, m	38.4	2.18-2.25, m
7	178.2	-	176.9	-	177.4	-
1'	128.4	-	127.2	-	128.0	-
2'	115.6	7.06, d (2.1)	114.5	7.08, d (2.1)	115.3	7.06, d (2.1)
3'	147.3	-	146.5	-	147.2	-
4'	149.9	-	148.9	-	149.7	-
5'	116.9	6.78, d (8.0)	115.8	6.79, d (8.2)	116.6	6.79, d (8.2)
6'	123.3	6.95, dd (8.0, 2.1)	122.3	6.98, dd (8.2, 2.1)	123.1	6.97, dd (8.2, 2.1)
7'	147.2	7.59, d (15.9)	146.2	7.65, d (15.9)	147.0	7.57, d (15.9)
8'	116.2	6.32, d (15.9)	114.7	6.38, d (15.9)	115.5	6.28, d (15.9)
9'	169.40	-	168.4	-	168.9	-

*singlete ancho

**doblete ancho

Tabla S2. Datos de RMN de **31** en CH₃OH-*d*₄ (¹H 600 MHz; ¹³C 151 MHz).

Posición	δ _H (J en Hz)
1	-
2	7.05, d (2.1)
3	-
4	-
5	6.79, d (8.2)
6	6.96, dd (8.2, 2.1)
7	7.56, d (15.9)
8	6.28, d (15.9)
9	-
1'	-
2'	6.77, d (2.1)
3'	-
4'	-
5'	6.71, d (8.1)
6'	6.63, dd (8.1, 2.1)
7'	3.01, dd (14.3, 8.4)
	3.11, dd (14.3, 4.2)
8'	5.19, dd (8.4, 4.2)

Tabla S3. Datos de RMN de **32** en CH₃OH-*d*₄ (¹H 600 MHz; ¹³C 151 MHz).

Posición	δ _C	δ _H (J en Hz)
2	79.9	5.27, dd (12.6, 3.1)
3	43.8	2.67, dd (17.1, 3.1) 3.02, dd (17.1, 12.6)
4	197.2	-
5	165.1	-
6	97.0	5.83, d (2.1)
7	168.6	-
8	96.1	5.86, d (2.1)
9	164.4	-
10	102.9	-
OCH ₃	56.1	3.82, s
1'	132.9	-
2'	114.2	6.91, d (2.1)
3'	147.5	-
4'	149.0	-
5'	112.2	6.9, d (8.2)
6'	118.7	6.87, dd (8.2, 2.1)

Tabla S4. Datos de RMN de **33** en CH₃OH-*d*₄ (¹H 600 MHz; ¹³C 151 MHz).

Posición	δ _C	δ _H (J en Hz)	Posición	δ _C	δ _H (J en Hz)
2	167.1	-	1''	75.7	4.98, d (9.4)
3	104.0	6.52 (s)	2''	73.3	4.12 t (9.4)
4	184.6	-	3''	80.7	3.53, d (9.4)
5	163.0	-	4''	72.7	3.69, t (9.4)
6	99.8	6.26 (s)	5''	83.3	3.46 – 5.49, m
7	165.1	-	6''	63.6	3.98, d* (12.0)
8	105.5	-			3.85, dd (12.0, 5.8)
9	158.5	-			
10	104.4	-			
1'	124.4	-			
2'	115.3	7.54 (s.a.)			
3'	147.5	-			
4'	150.1	-			
5'	114.6	6.90, d (8.4)			
6'	121.3	7.50, d (8.4)			

* doblete ancho

Tabla S5. Datos de RMN de **34** y **35** en mezcla (^1H 600 MHz; ^{13}C 151 MHz, $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$).

35				34			
Posición	δ_c	δ_H (J en Hz)	HBMC H→C	Posición	δ_c	δ_H (J en Hz)	HBMC H→C
2	158.8	-		2''	159.0	-	
3	135.6	-		3''	135.8	-	
4	179.5	-		4''	179.5	-	
5	163.0	-		5''	163.0	-	
6	99.9	6.17, s*		6''	99.9	6.17, s*	
7	166.1	-		7''	166.1	-	
8	94.7	6.36, s*		8''	94.7	6.36, s*	
9	158.4	-		9''	158.4	-	
10	105.6	-		10''	105.7	-	
1'	122.9	-		1'''	122.9		
2'	117.6	7.69, d (2.2)	C-1', C-4', C-2	2'''	117.8	7.82, d (2.2)	C-1''', C-4''', C-2'''
3'	145.8	-		3'''	145.9	-	
4'	149.8	-		4'''	149.9	-	
5'	116.0	6.84, d (8.4)	C-1', C-3', C-4'	5'''	116.1	6.85, d (8.4)	C-1''', C-3''', C-4'''
6'	123.1	7.56, dd** (8.4, 2.2)	C-2, C-2', C-4'	6'''	123.2	7.56, dd** (8.4, 2.2)	C-2'', C-2''', C-4'''
1''''	104.3	5.23, d (7.2)	C-3	1''''	105.4	5.14, d (7.8)	C-3''
2''''	75.7	3.45 – 3.48, m		2''''	73.2	3.80, dd (9.7, 7.8)	
3''''	78.1	3.41, t (9.0)		3''''	70.0	3.52 – 3.57, m	
4''''	71.2	3.33, t (9.0)		4''''	75.1	3.83, d** (3.0)	
5''''	78.4	3.21, ddd (9.0, 6.0, 2.4)		5''''	77.2	3.45 – 3.48, m	
6a''''	62.5	3.70, dd (11.8, 2.4)		6a''''	61.9	3.62, dd (11.2, 6.0)	
6b''''		3.52 – 3.57, m		6b''''		3.52 – 3.57, m	

* singlete ancho

** doblete ancho

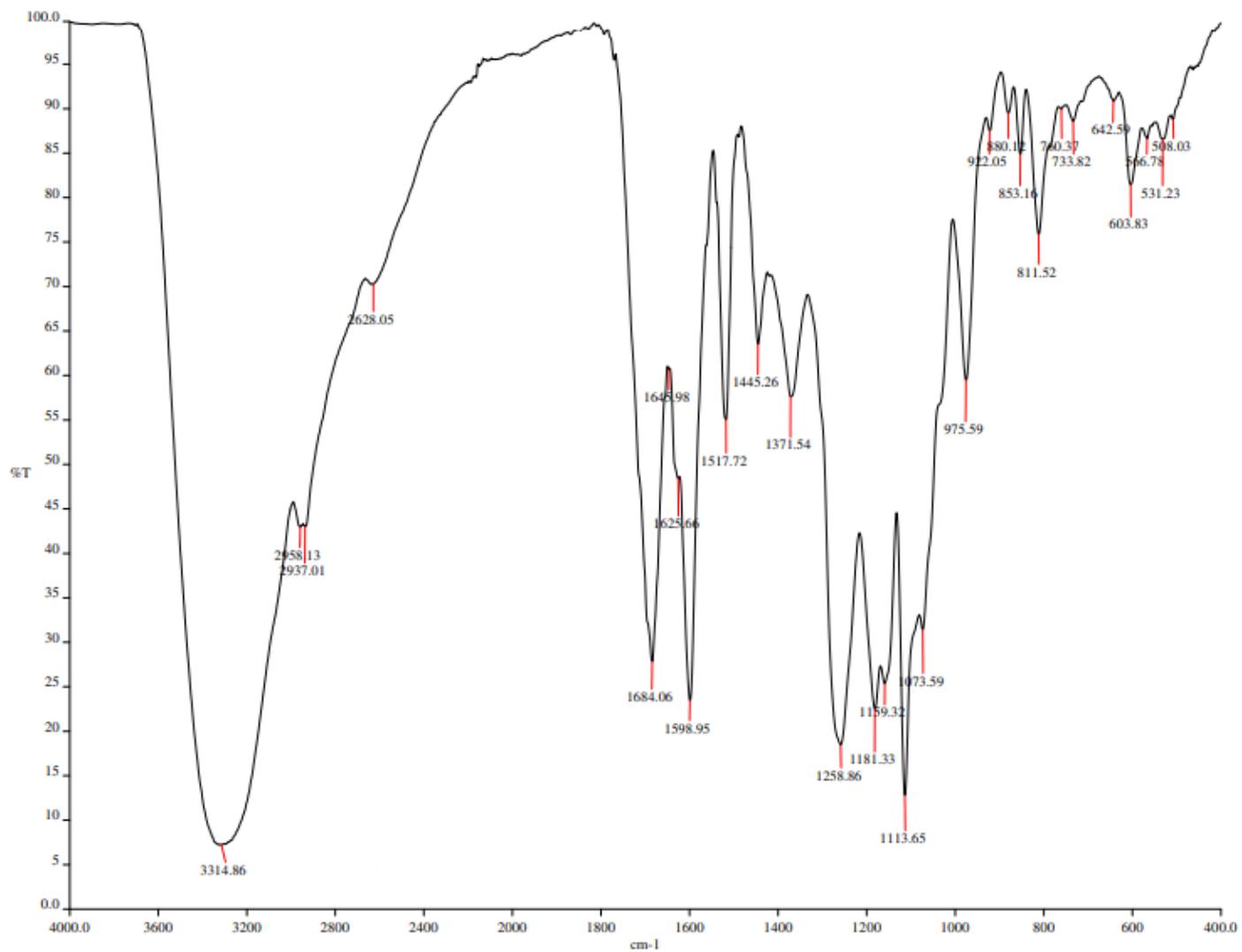


Figura S1. Espectro de IR de ácido 3-cafeoilquínico (28).

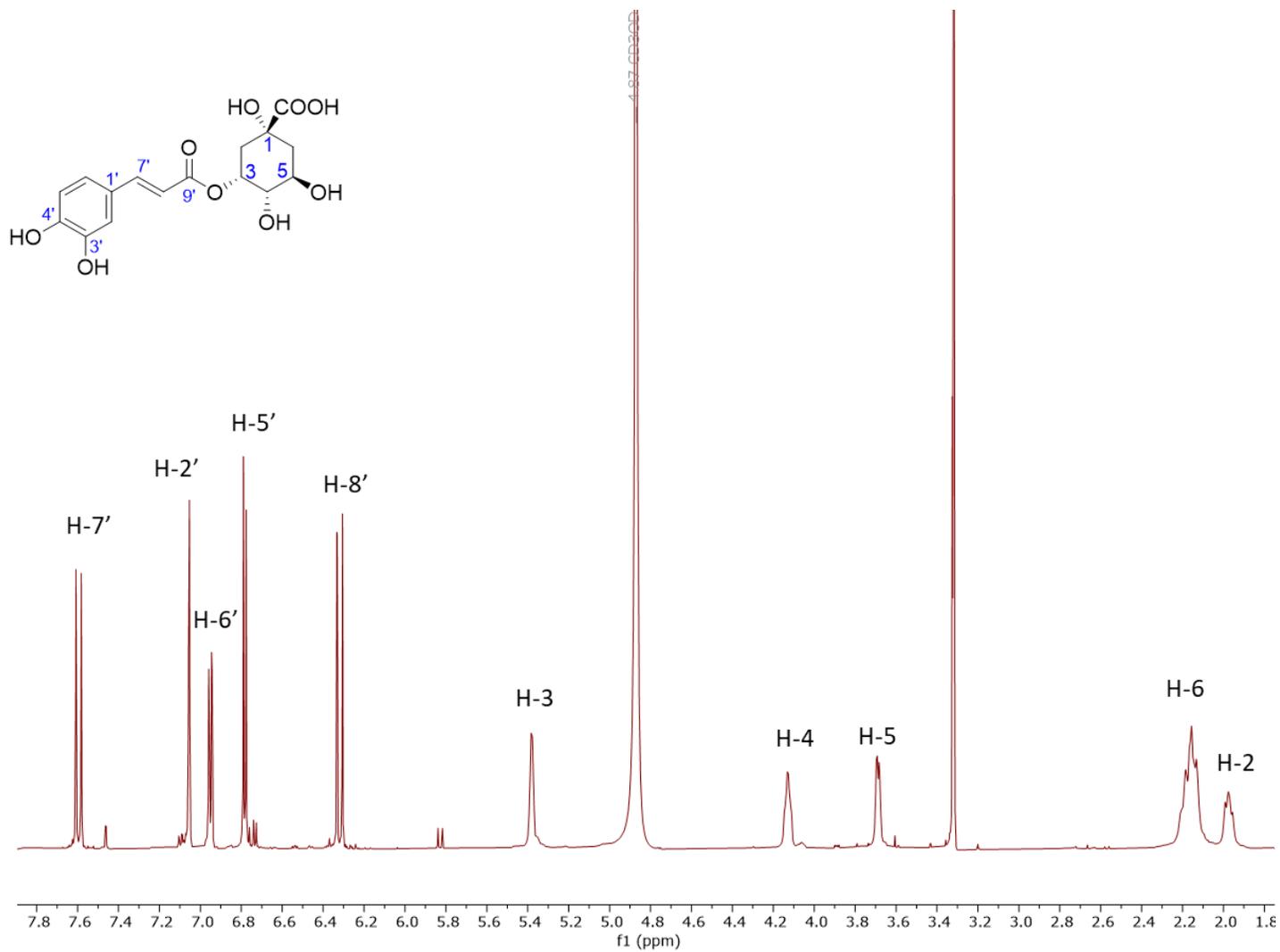


Figura S2. Espectro de RMN ^1H de ácido 3-cafeoilquínico (**28**) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ (^1H 600 MHz).

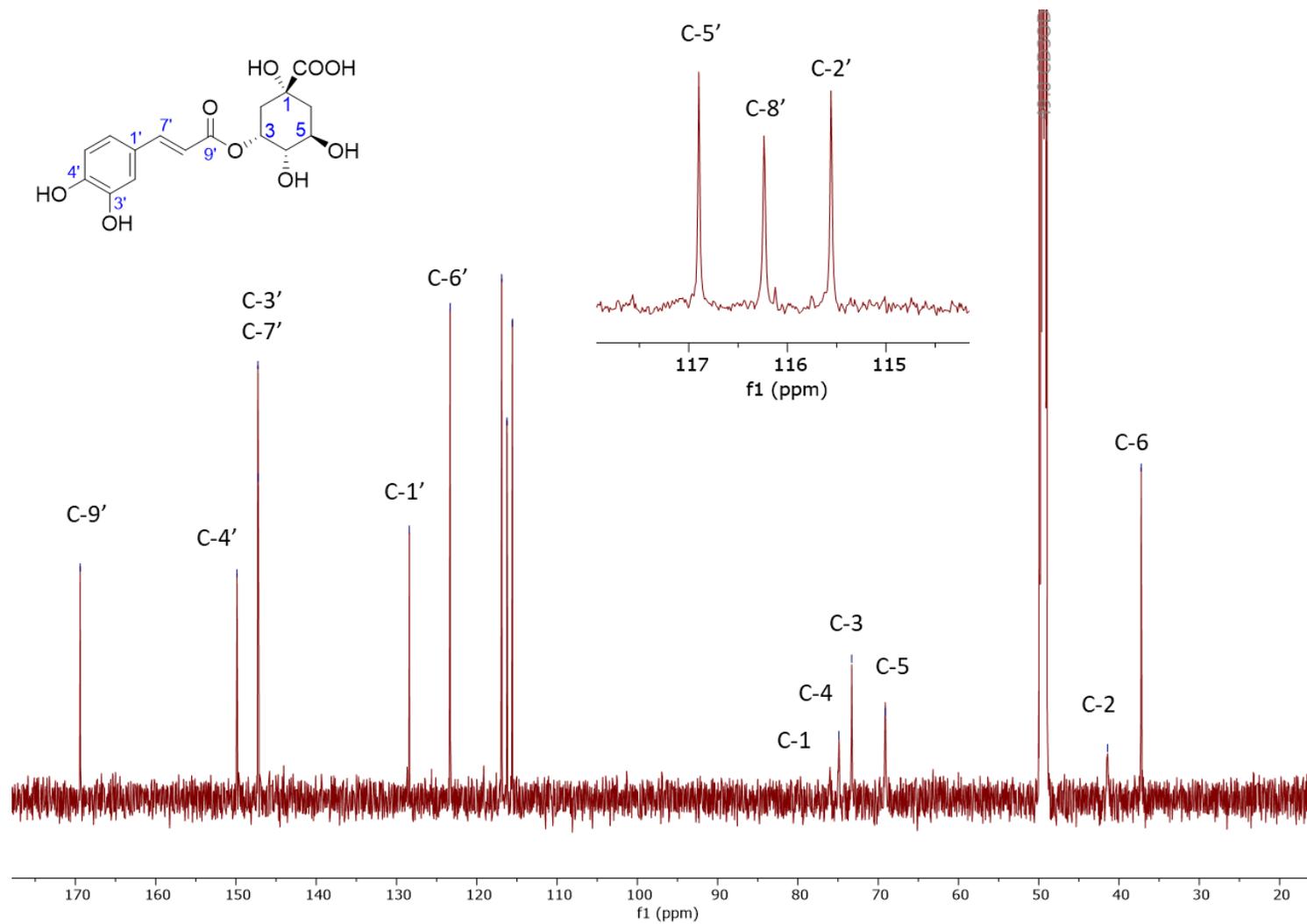


Figura S3. Espectro de RMN ^{13}C de ácido 3-cafeoilquínico (**28**) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ (^{13}C 151 MHz).

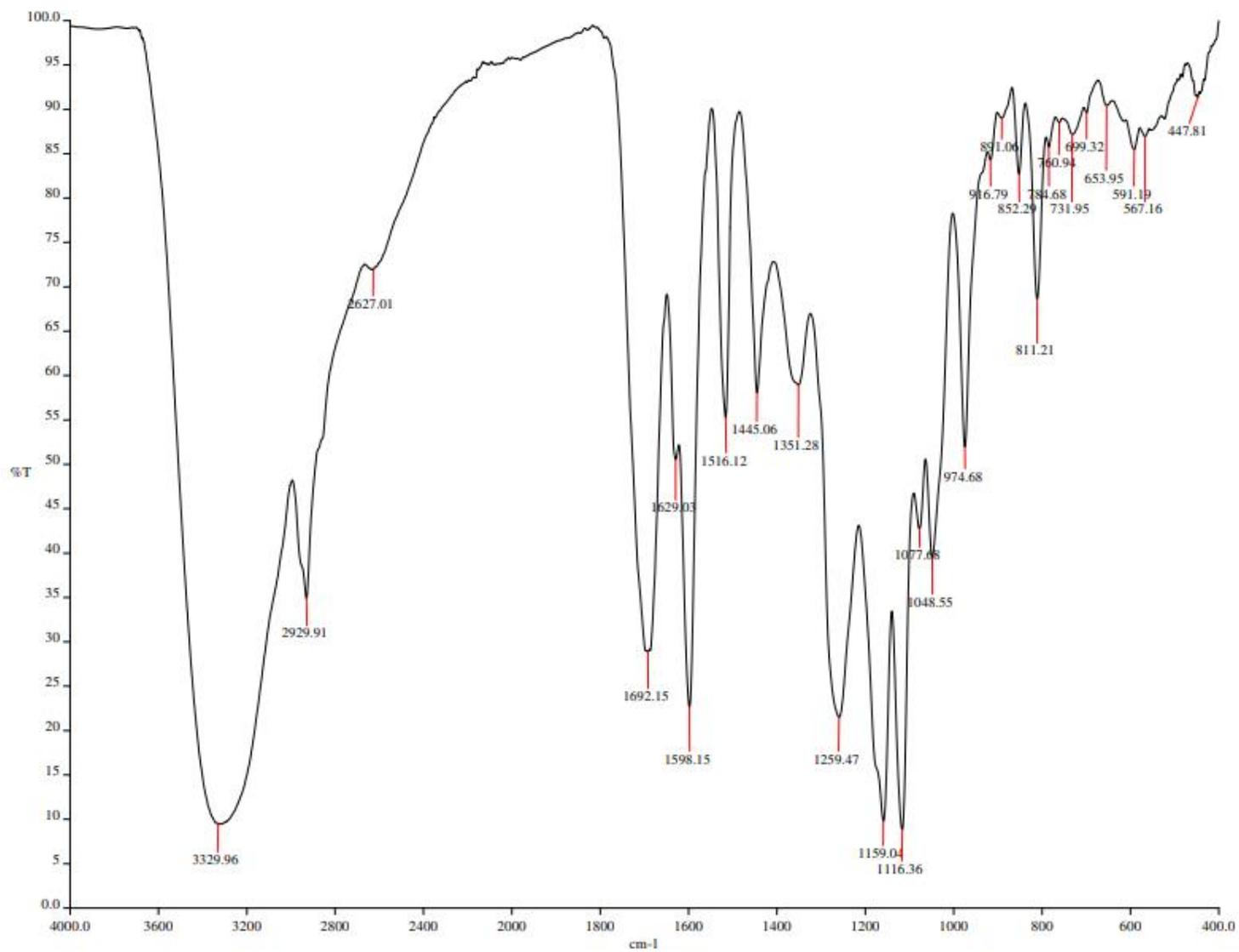


Figura S4. Espectro de IR de ácido 4-cafeoilquínico (29).

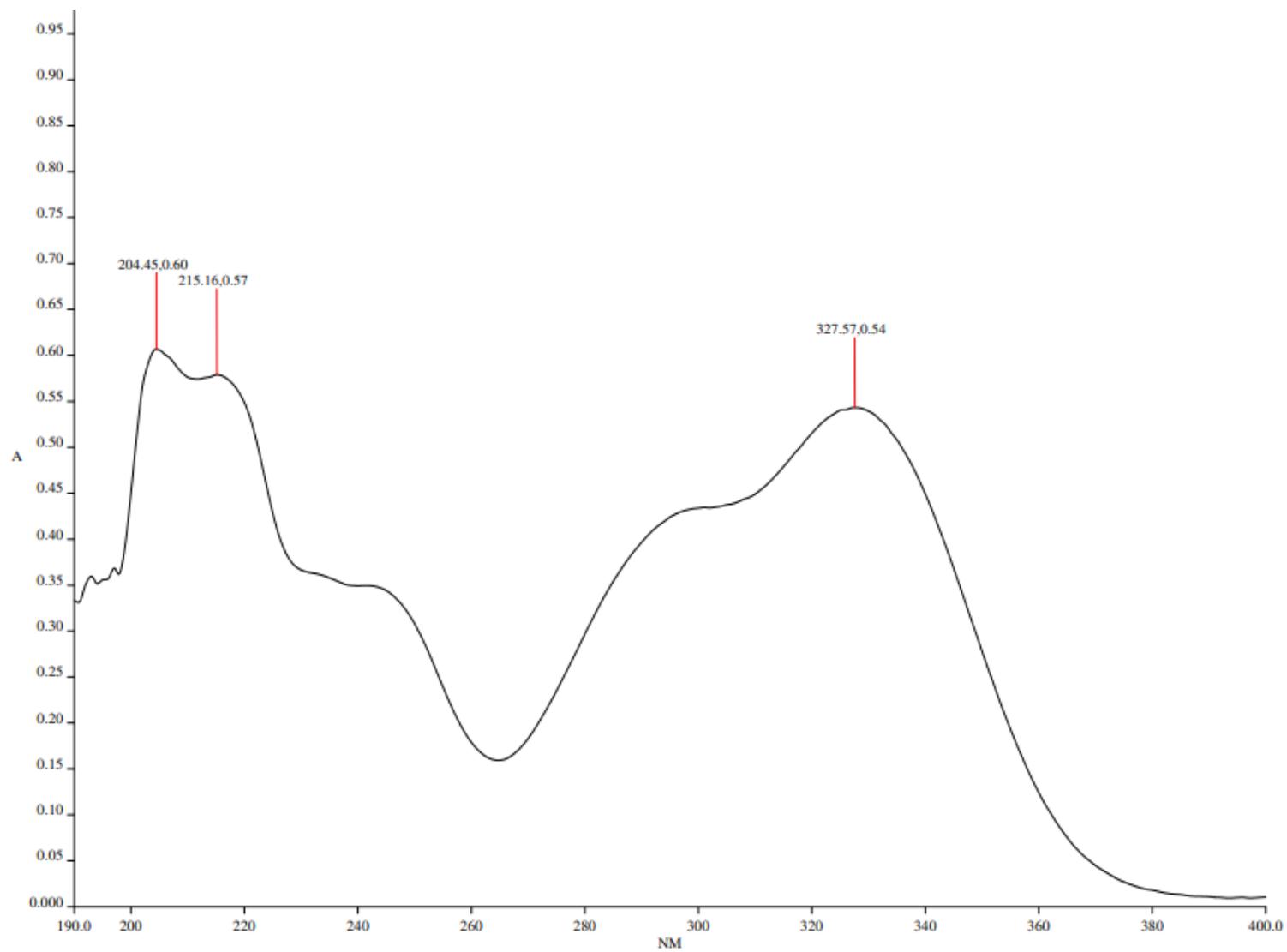


Figura S5. Espectro de UV de ácido 4-cafeoilquínico (29).

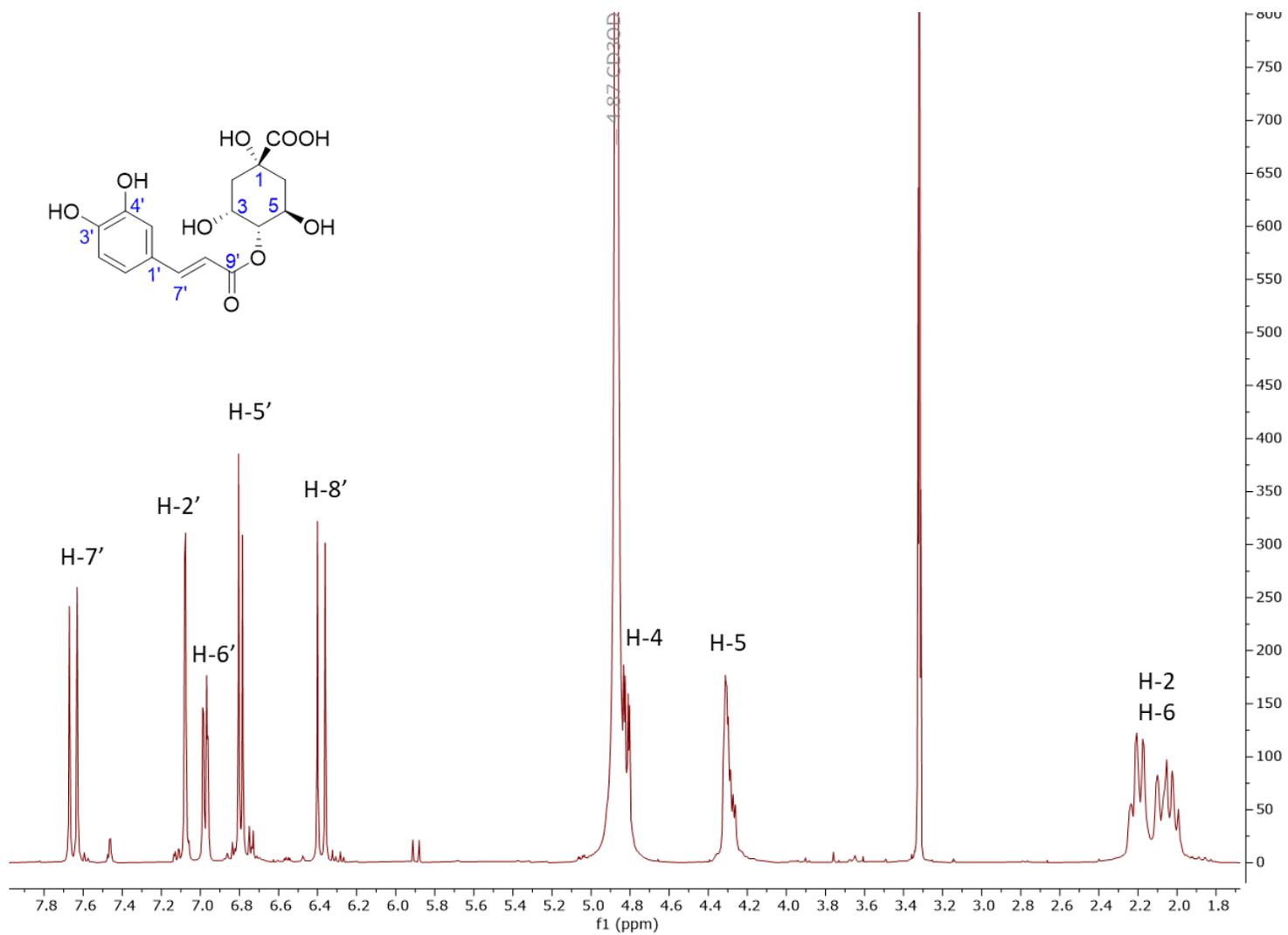


Figura S6. Espectro de RMN ¹H de ácido 4-cafeoilquínico (29) en CH₃OH-*d*₄ (¹H 600 MHz).

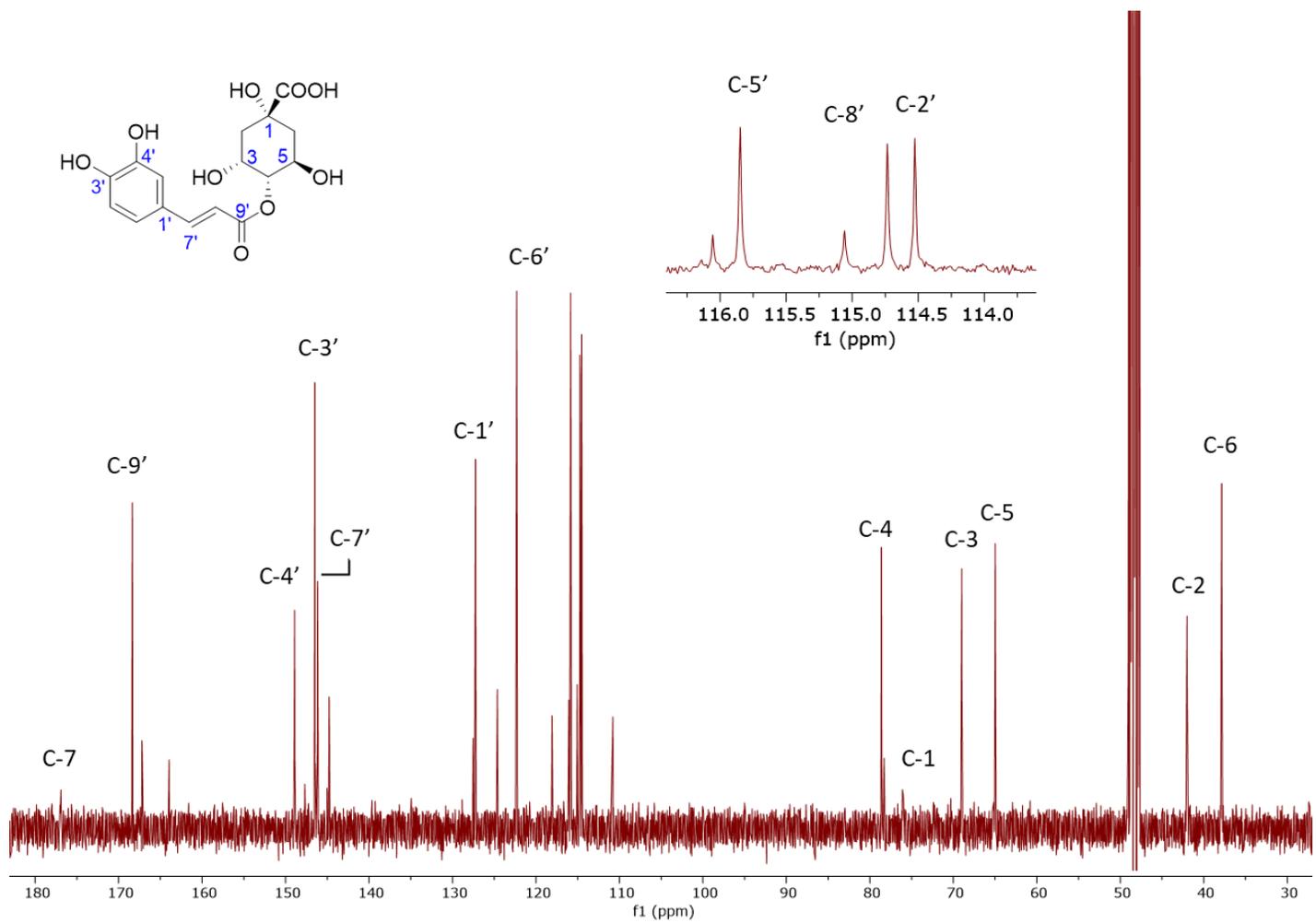


Figura S7. Espectro de RMN ^{13}C de ácido 4-cafeoilquínico (29) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ (^{13}C 151 MHz).

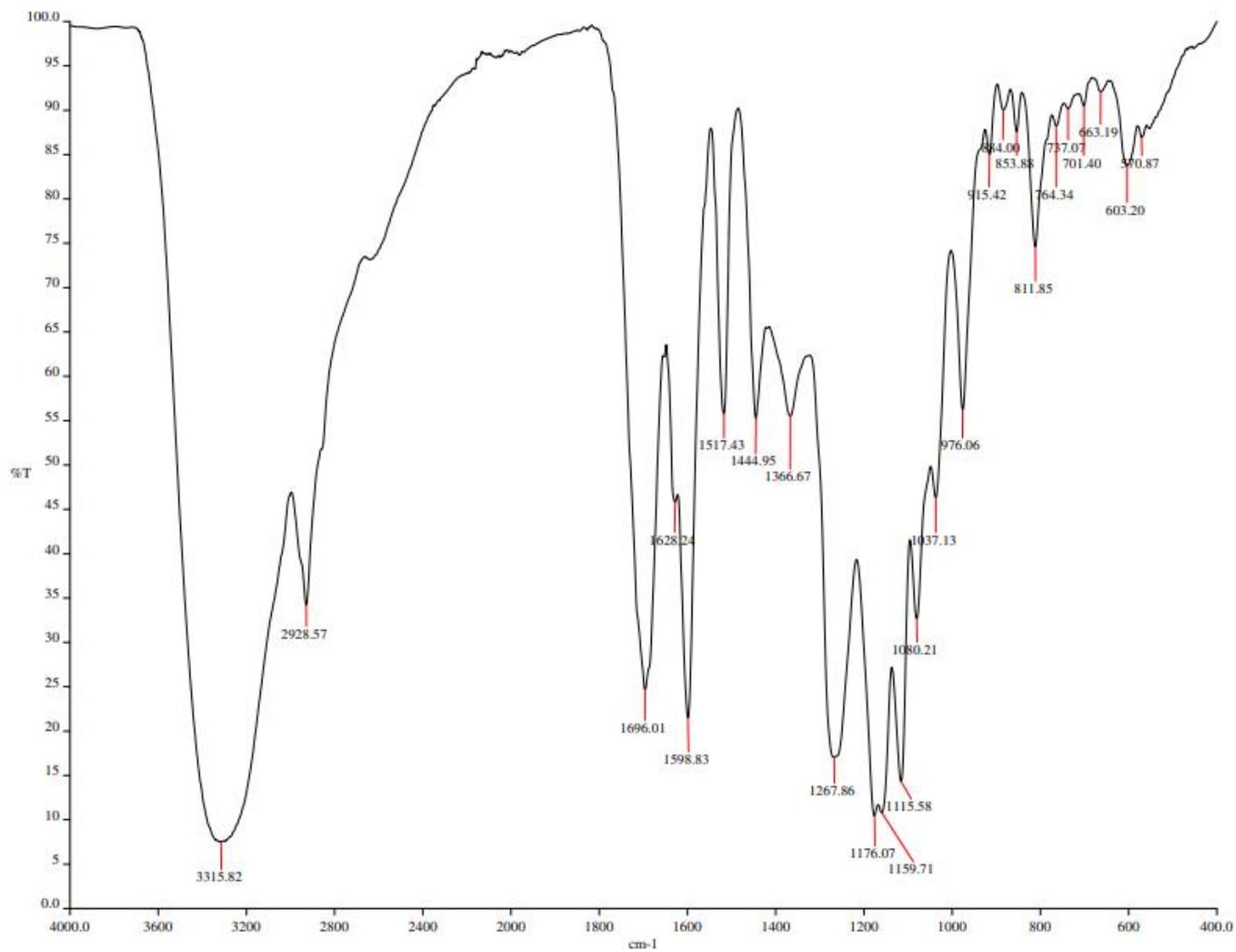


Figura S8. Espectro de IR de ácido 5-cafeoilquínico (30).

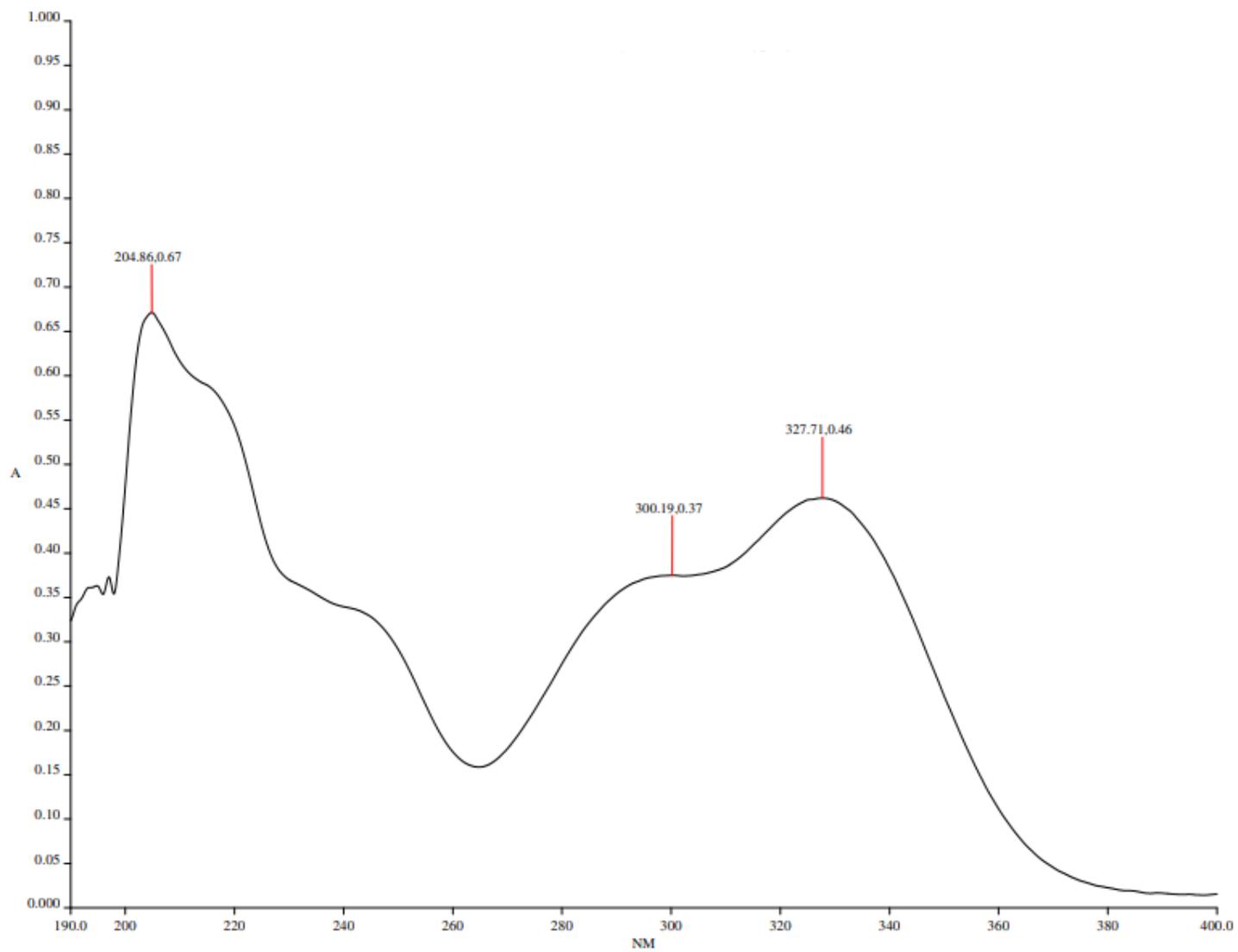


Figura S9. Espectro de UV de ácido 5-cafeoilquínico (30).

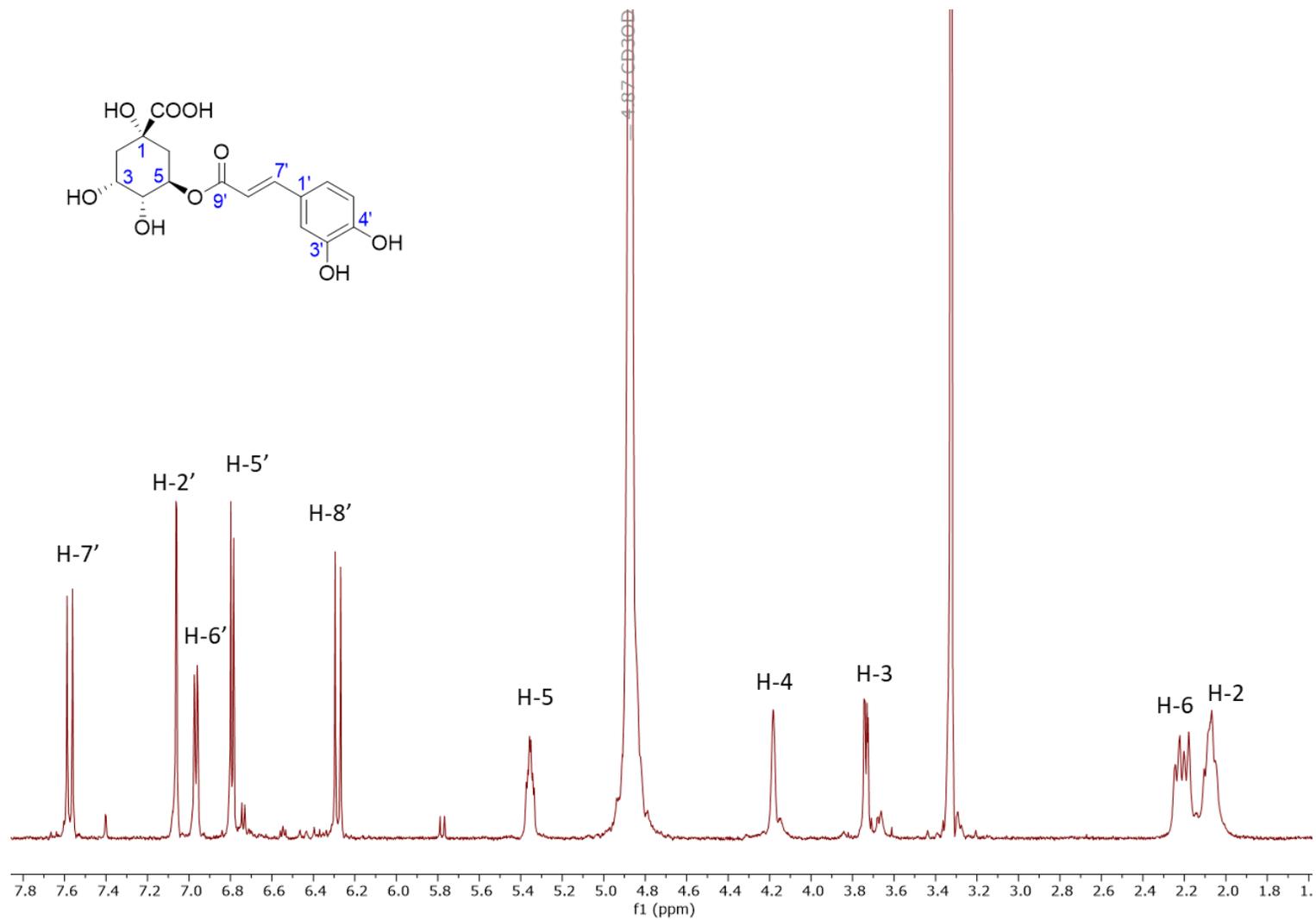


Figura S10. Espectro de RMN ¹H de ácido 5-cafeoilquínico (**30**) en CH₃OH-*d*₄ (¹H 600 MHz).

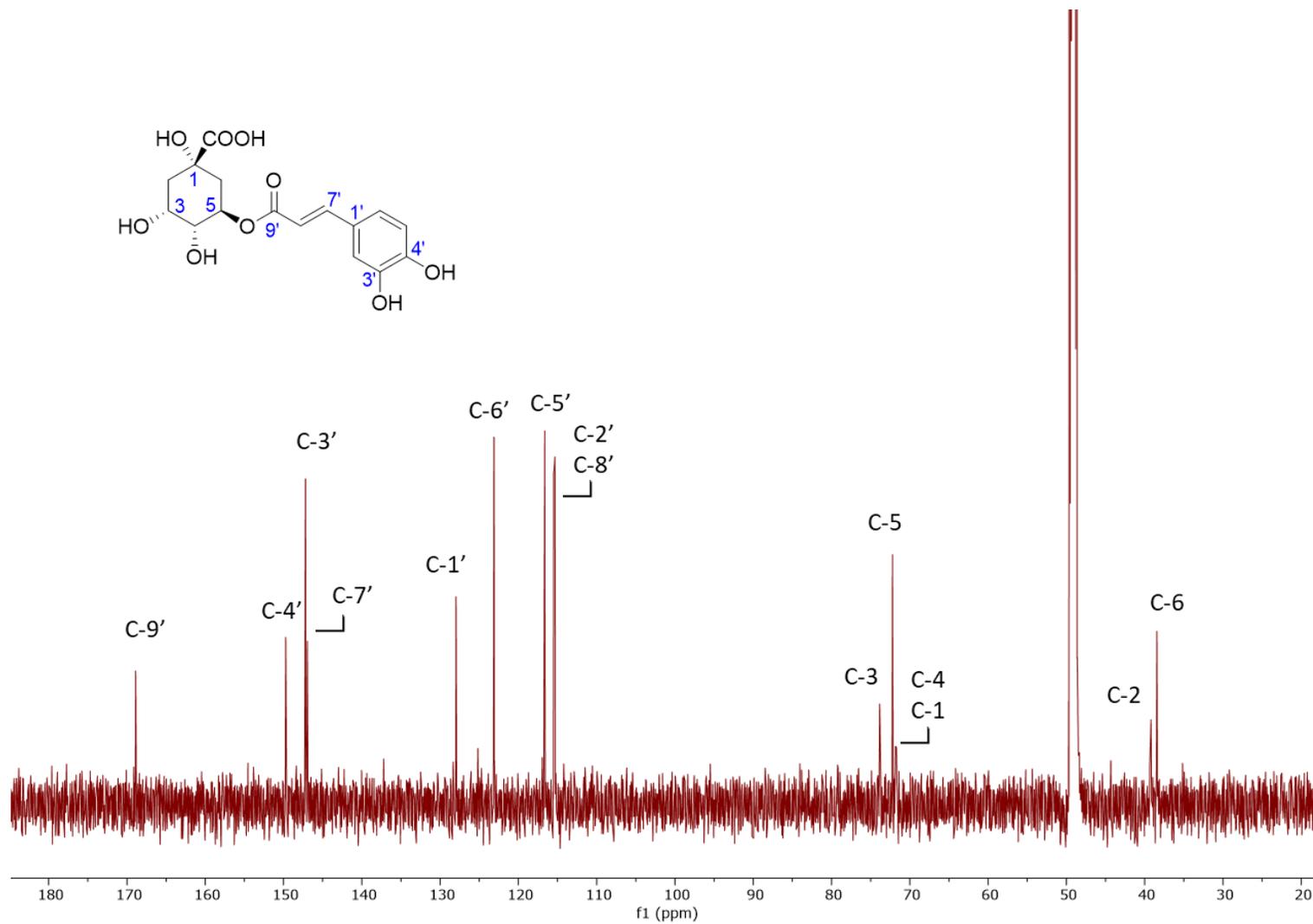


Figura S11. Espectro de RMN ^{13}C de ácido 5-cafeoilquínico (30) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ (^{13}C 151 MHz).

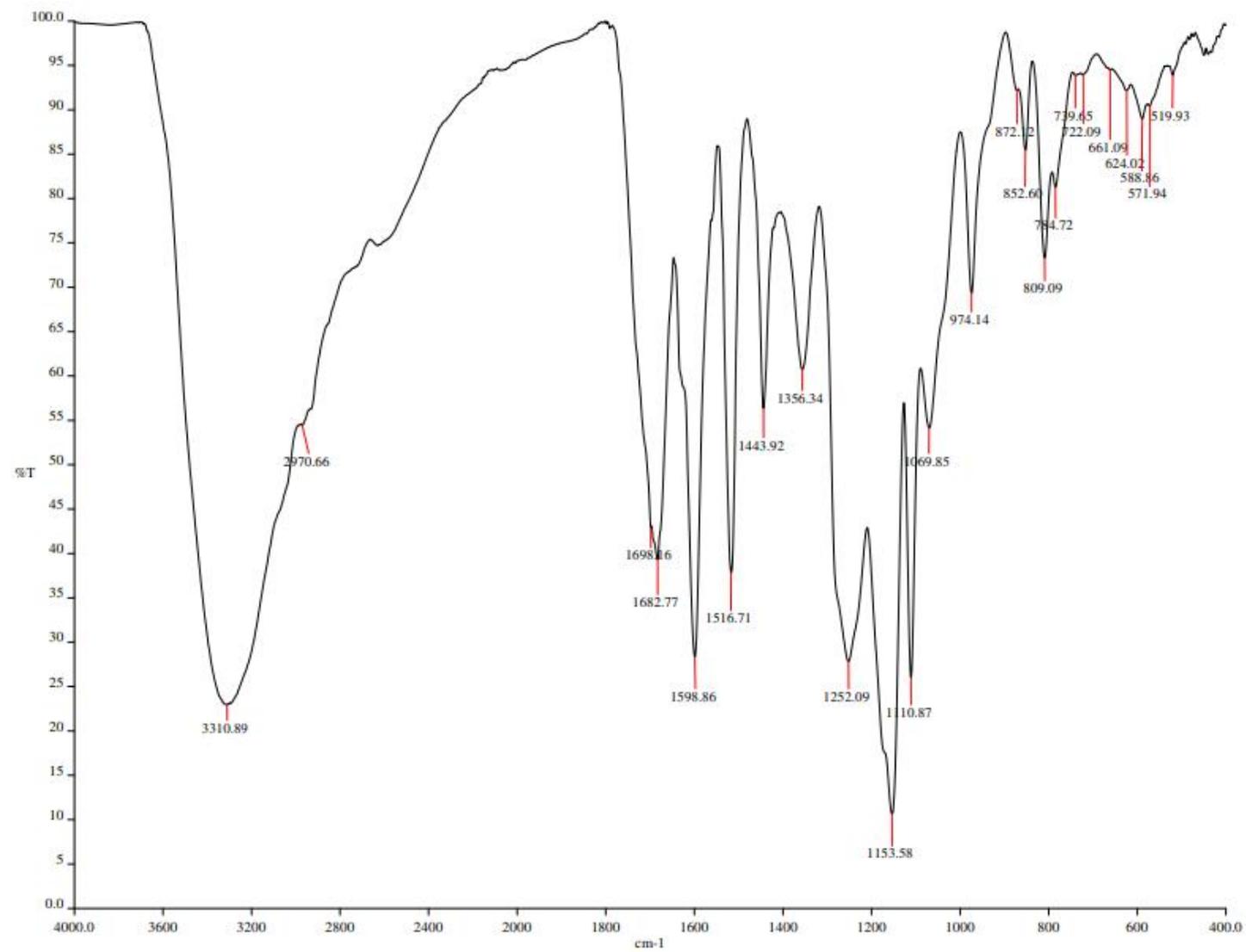


Figura S12. Espectro de IR de ácido rosmarínico (31).

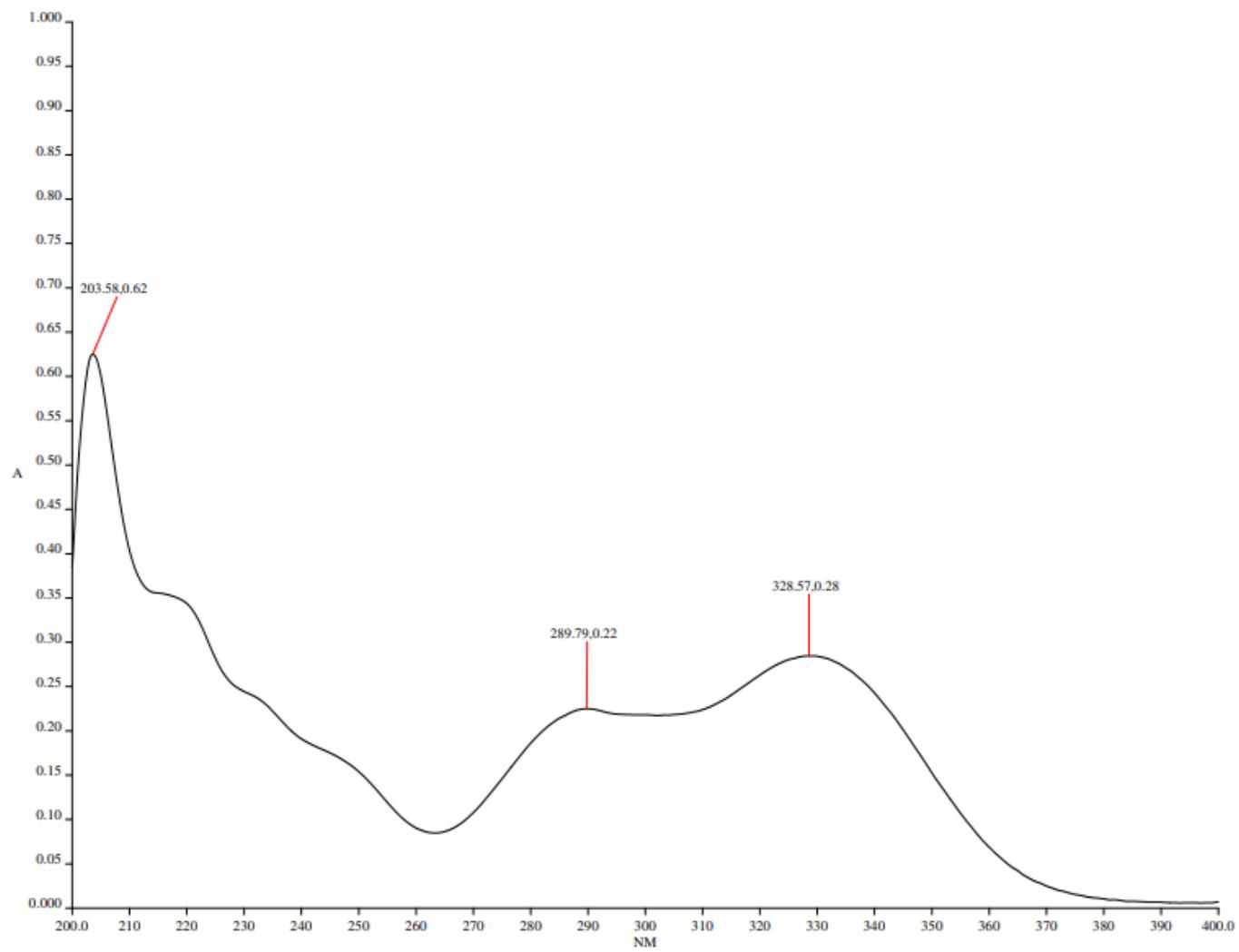


Figura S13. Espectro de UV de ácido rosmarínico (31).

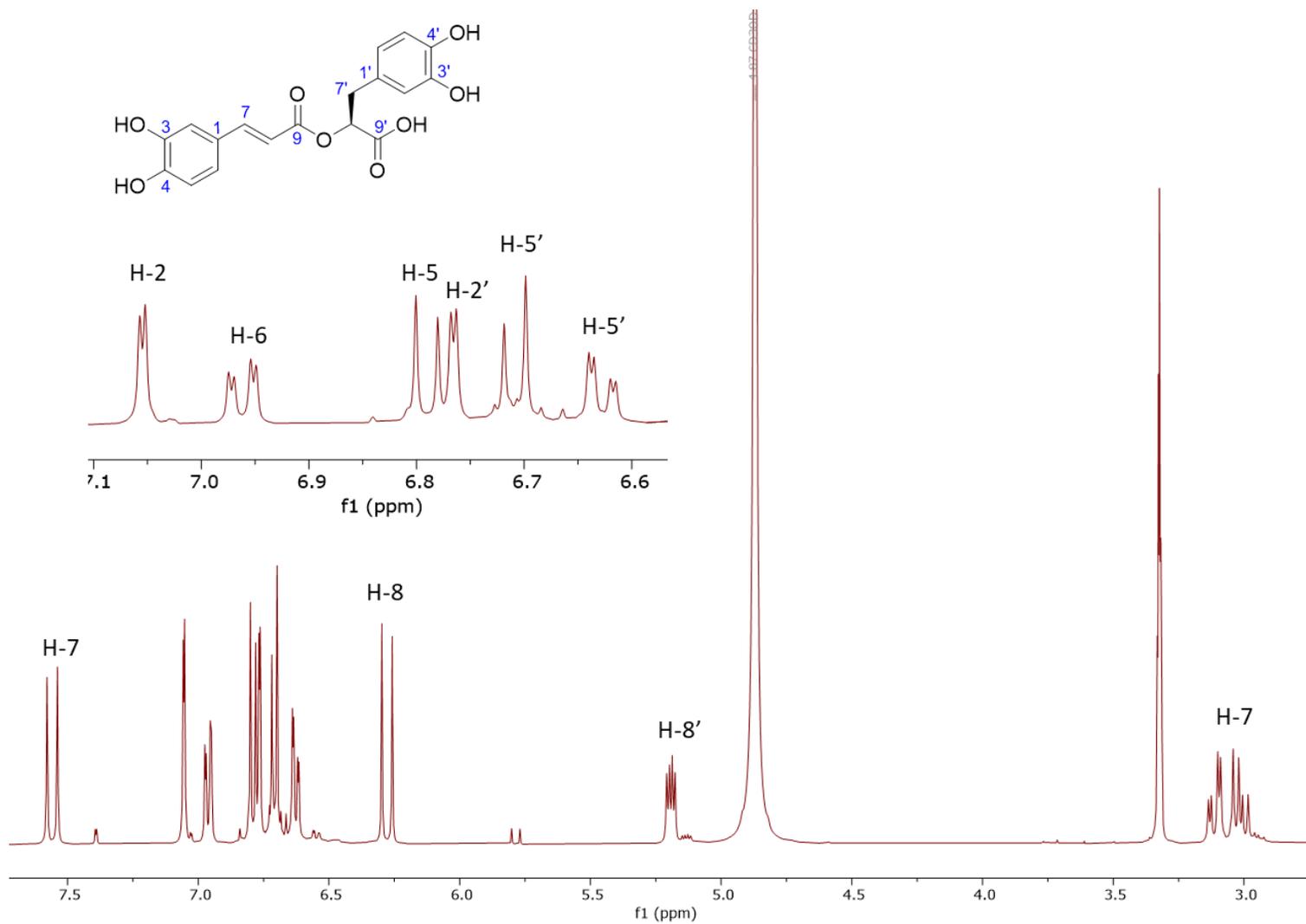


Figura S14. Espectro de RMN ¹H de ácido rosmarínico (**31**) en CH₃OH-*d*₄ (¹H 600 MHz).

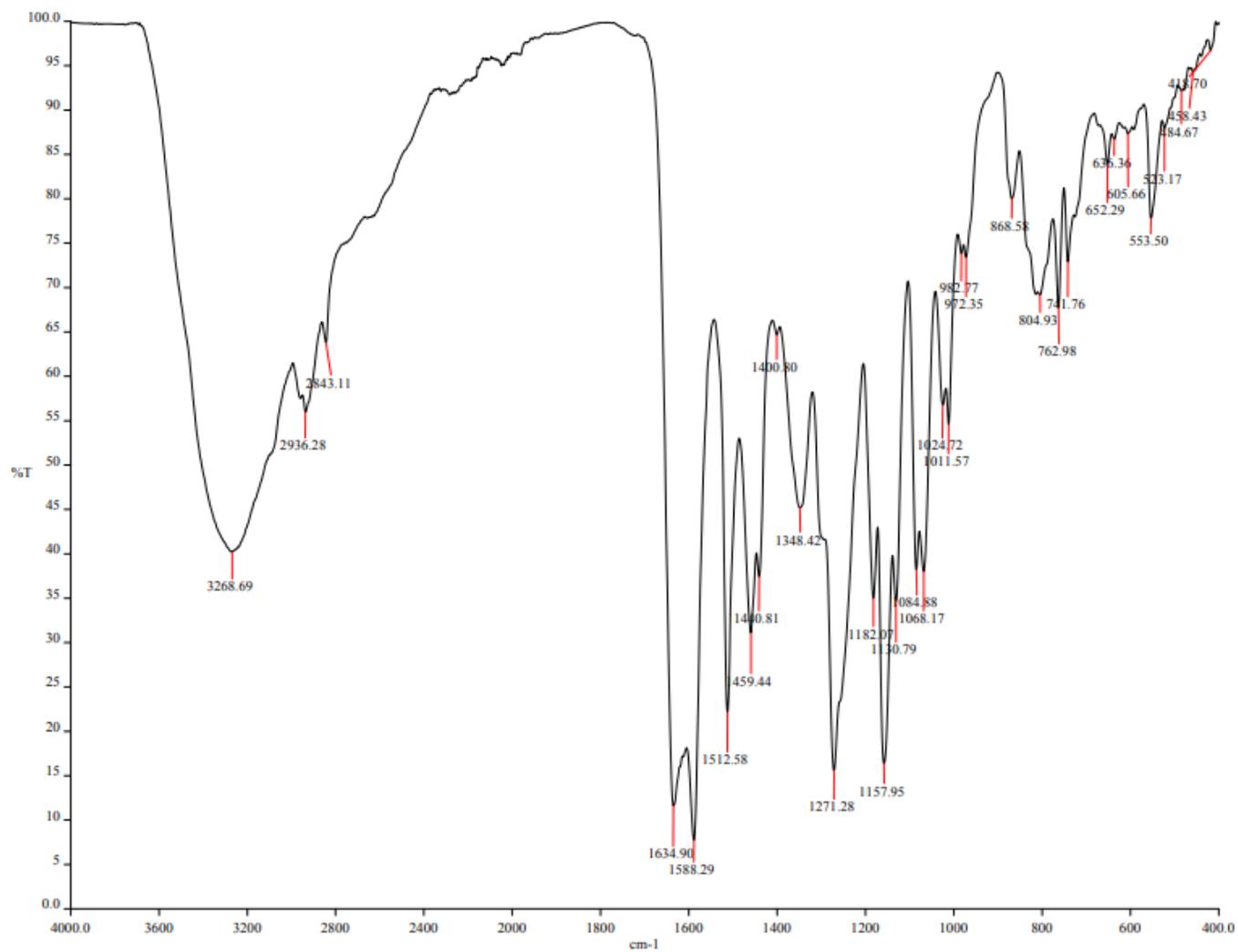


Figura S15. Espectro IR de hesperetina (32).

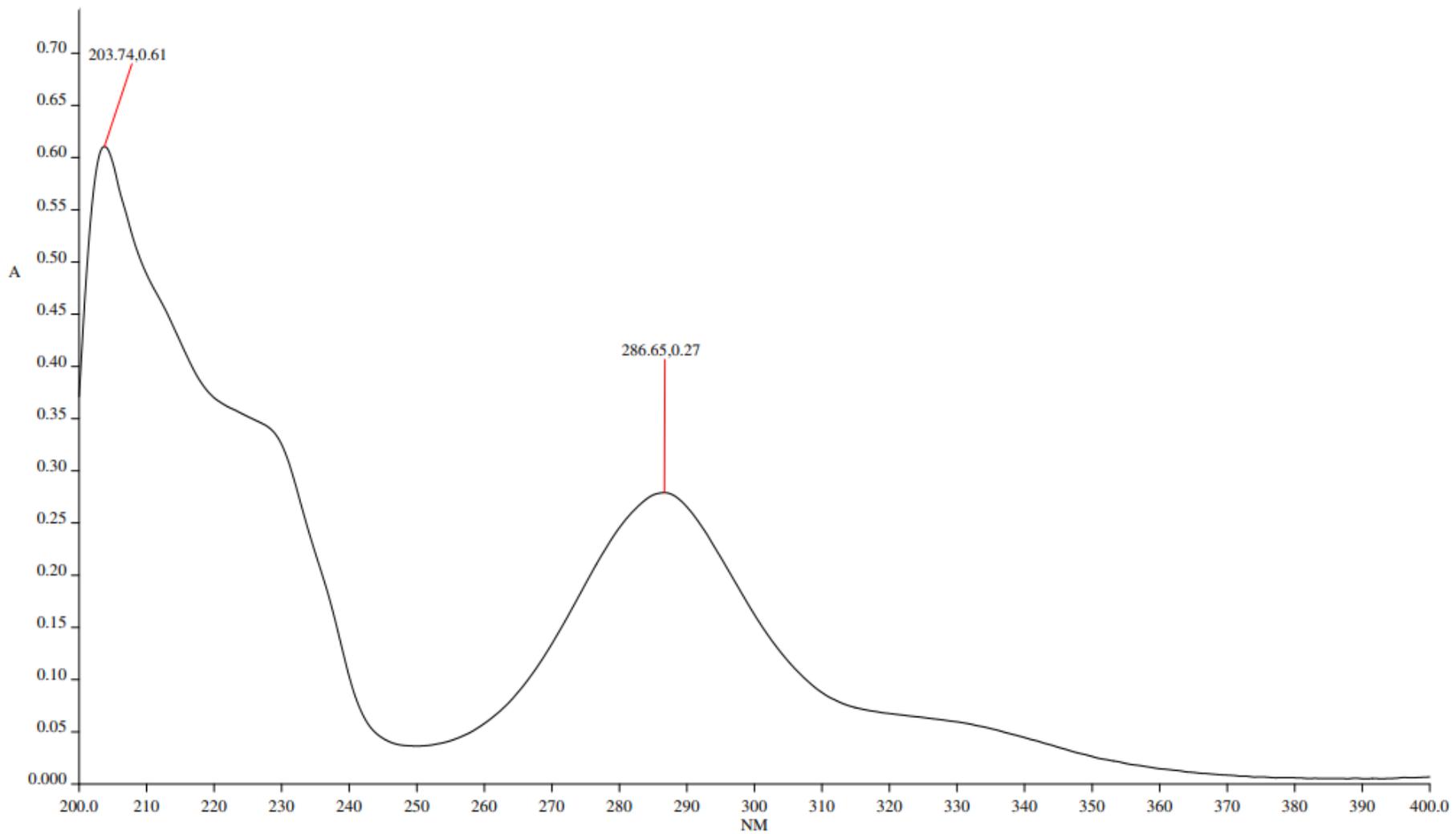


Figura S16. Espectro UV de hesperetina (32).

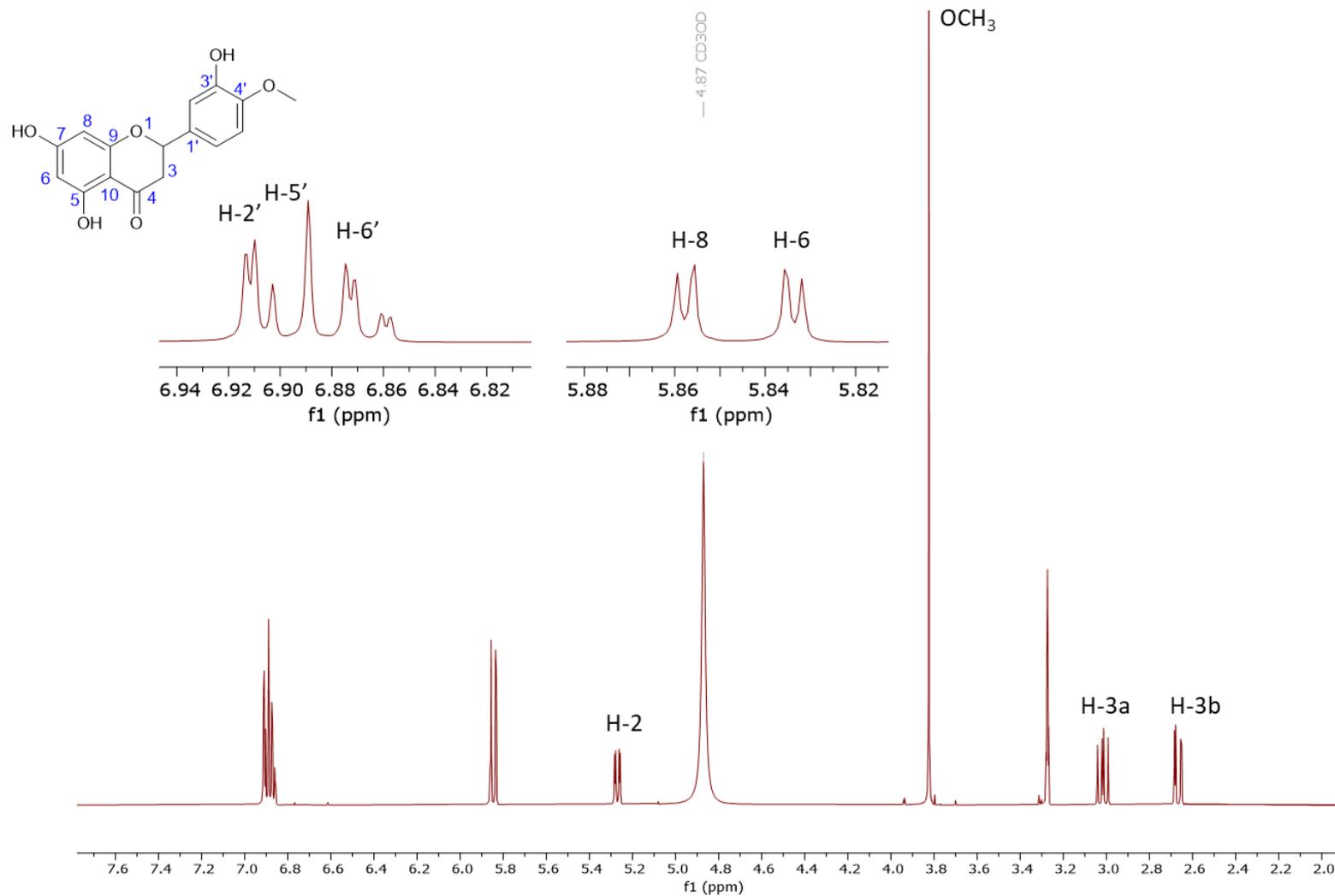


Figura S17. Espectro de RMN ¹H de hesperetina (32) en CH₃OH-*d*₄ (¹H 600 MHz).

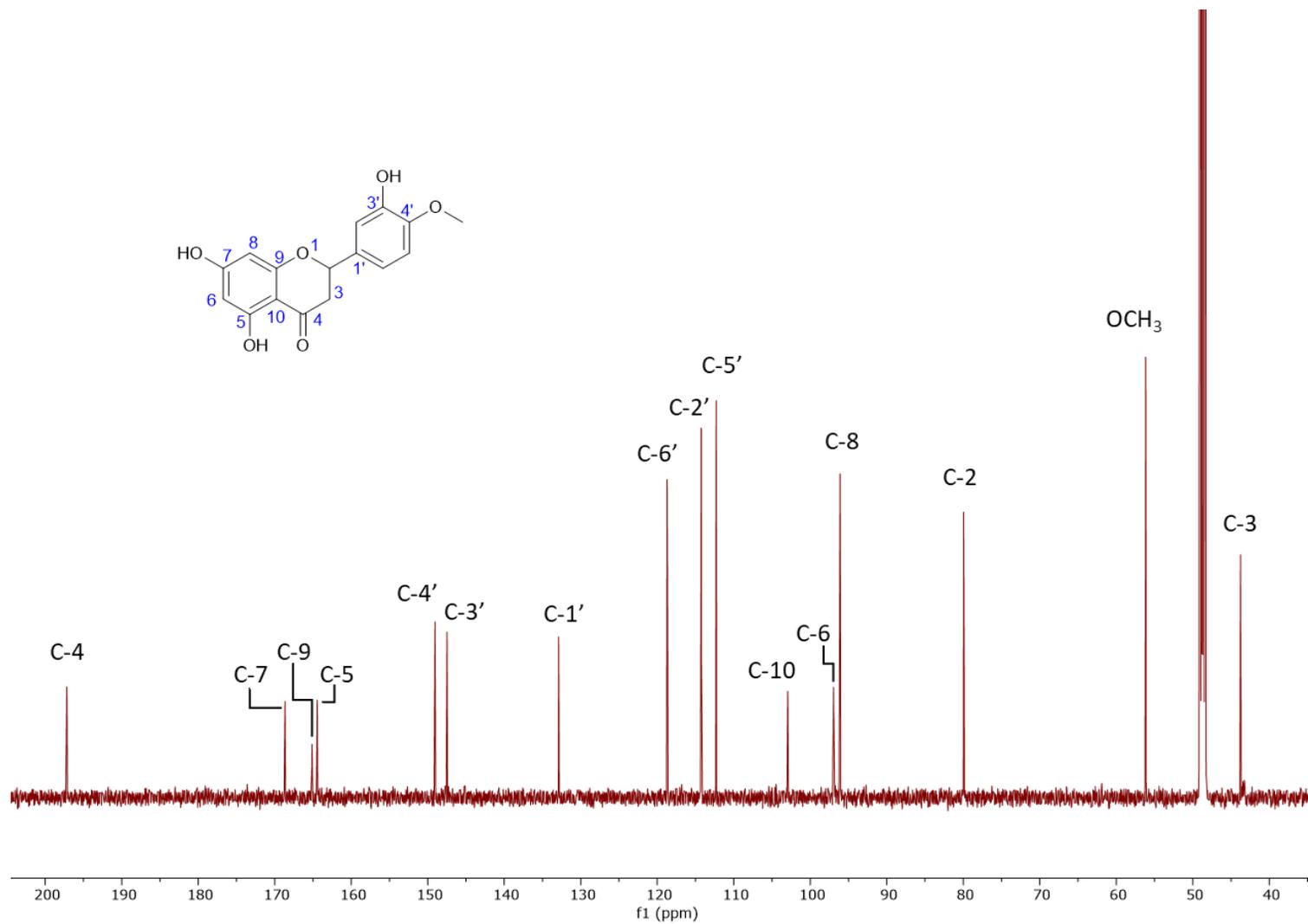


Figura S18. Espectro de RMN ^{13}C de hesperetina (32) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ (^{13}C 151 MHz).

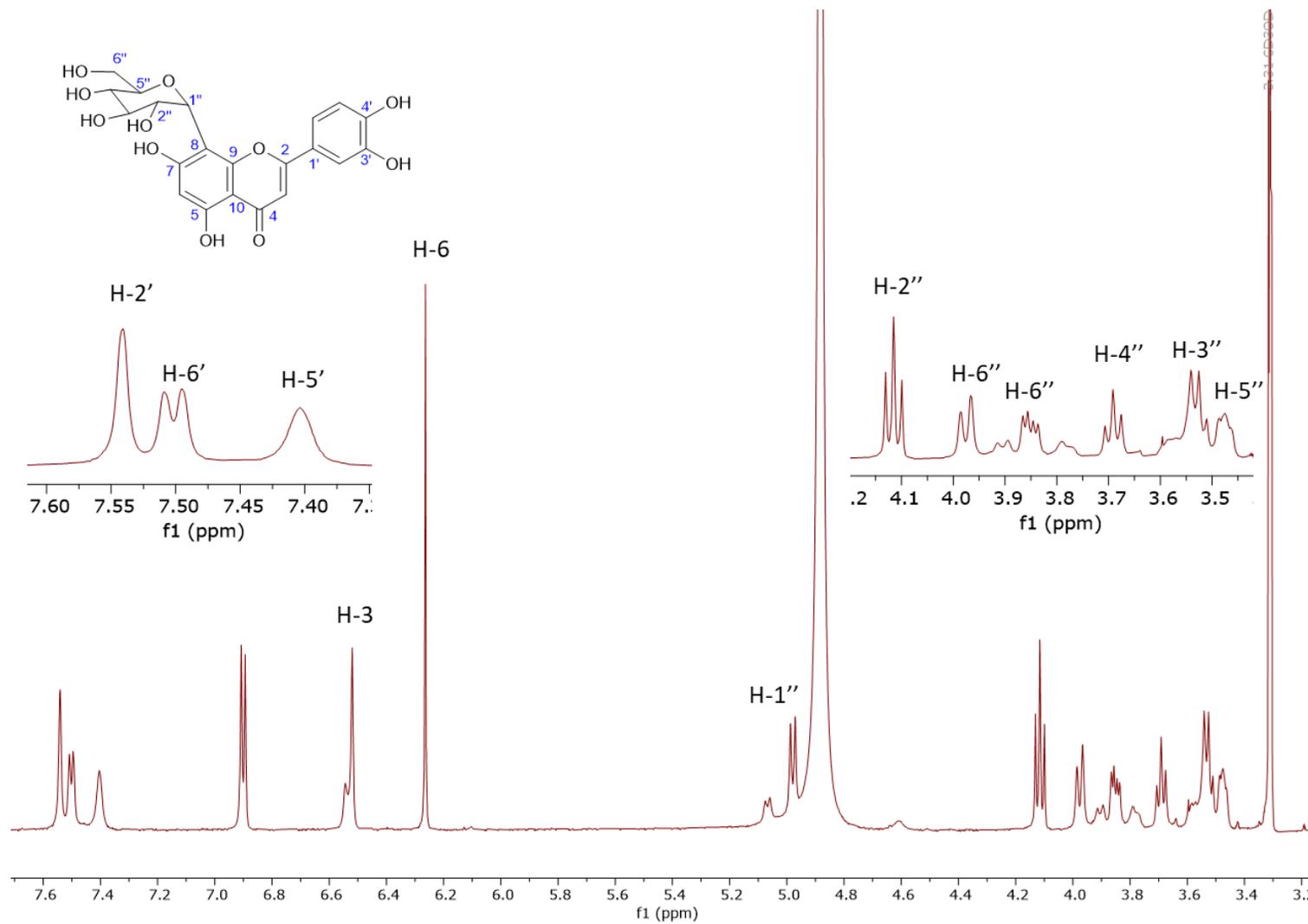


Figura S19. Espectro de RMN ^1H de orientina (**33**) en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ (^1H 600 MHz).

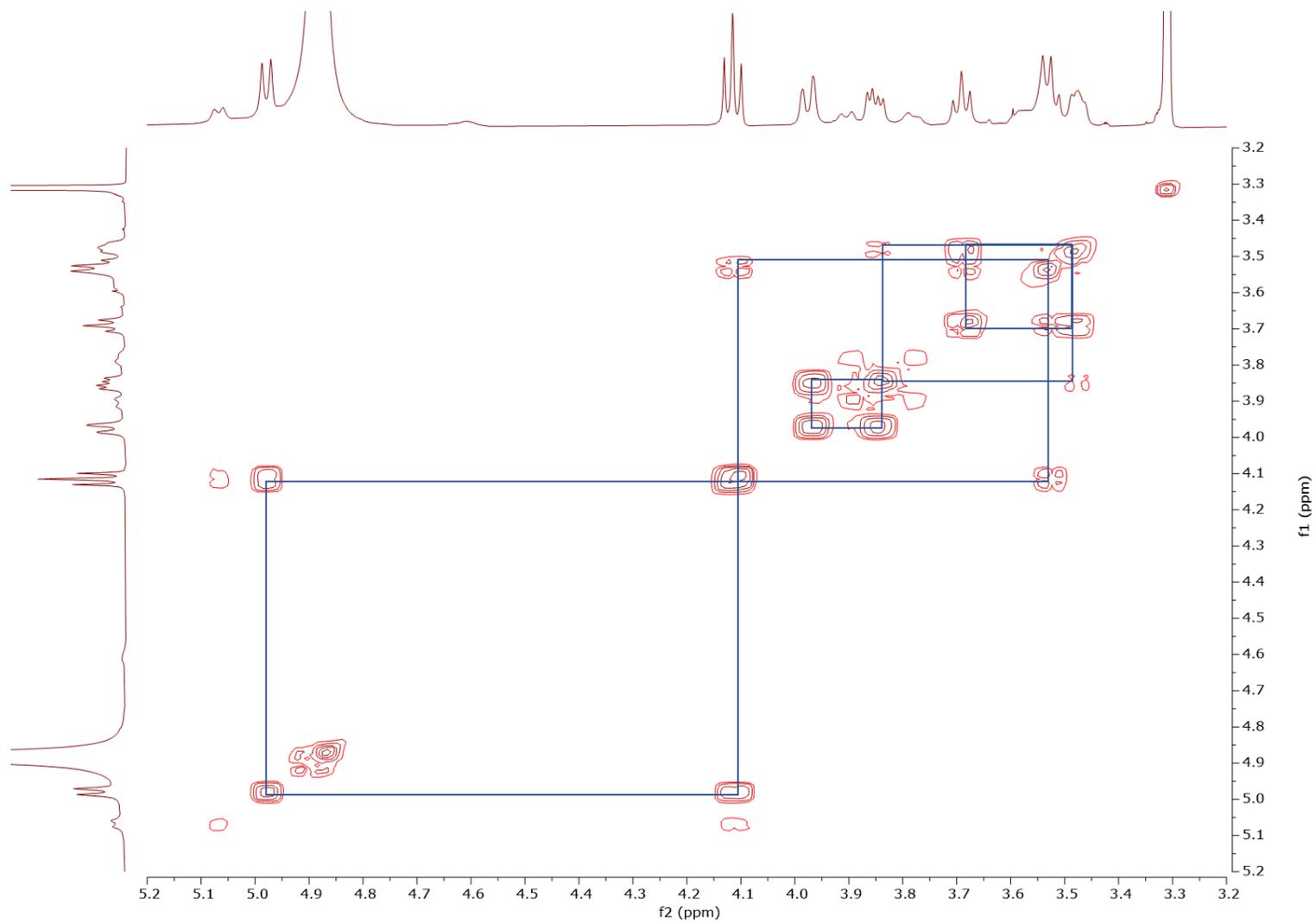


Figura S20. Cuadros de conectividad de azúcar unida a compuesto **33** en experimento COSY.

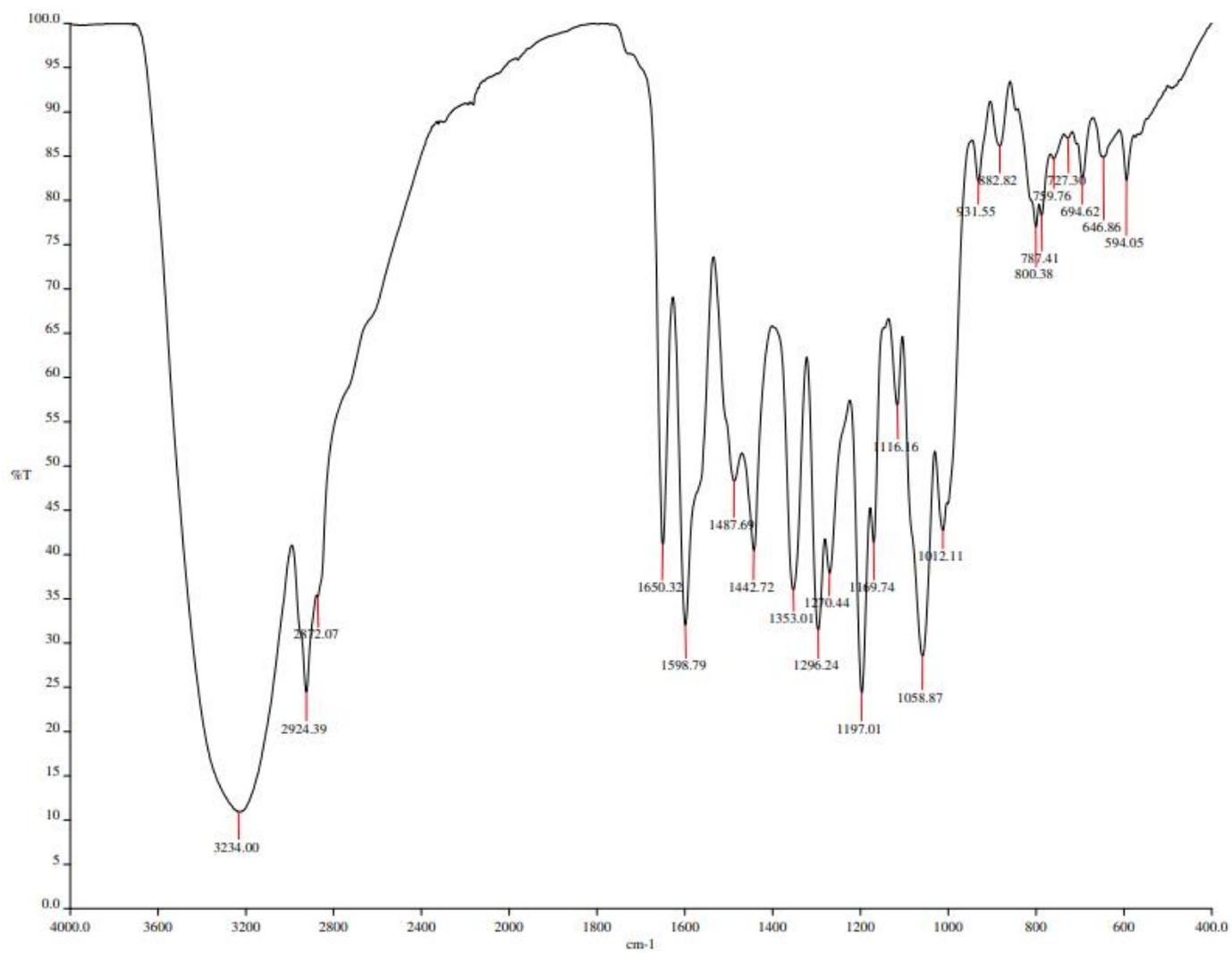


Figura S21. Espectroscopía IR de 34 y 35.

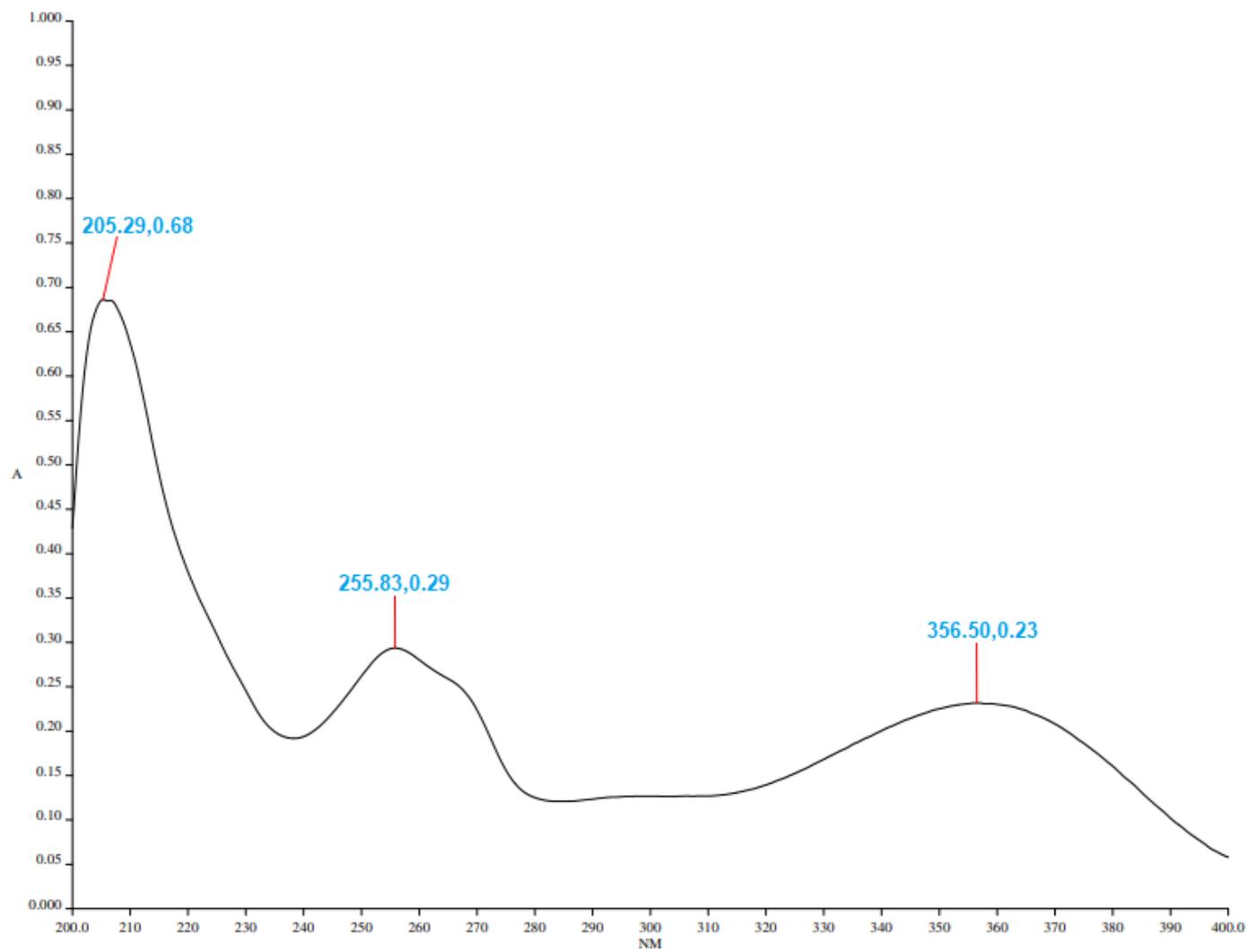


Figura S22. Espectro UV de 34 y 35.

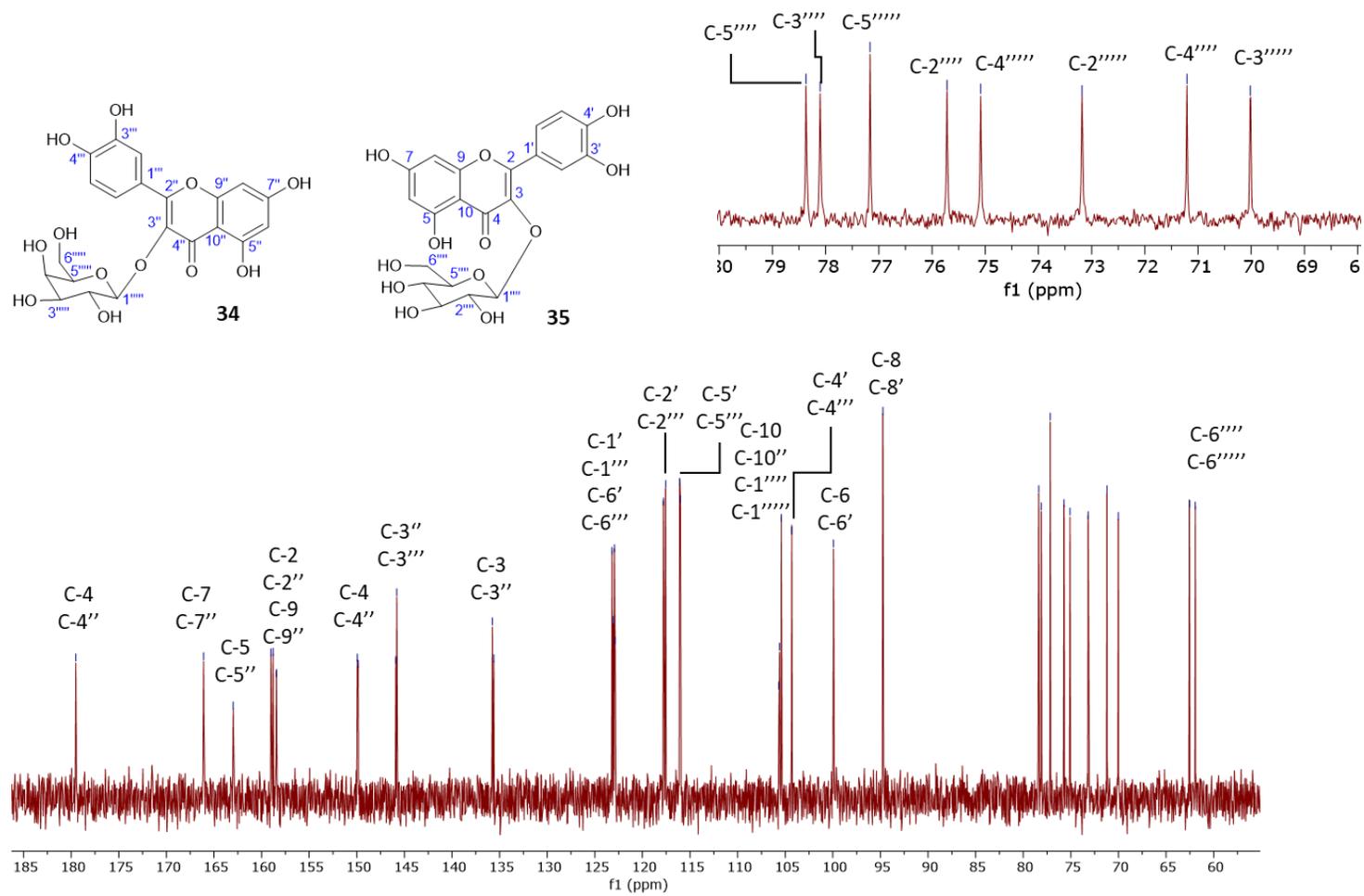


Figura S24. Espectro de RMN ^{13}C de mezcla de compuestos **34** y **35** en $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ (^{13}C 151 MHz).

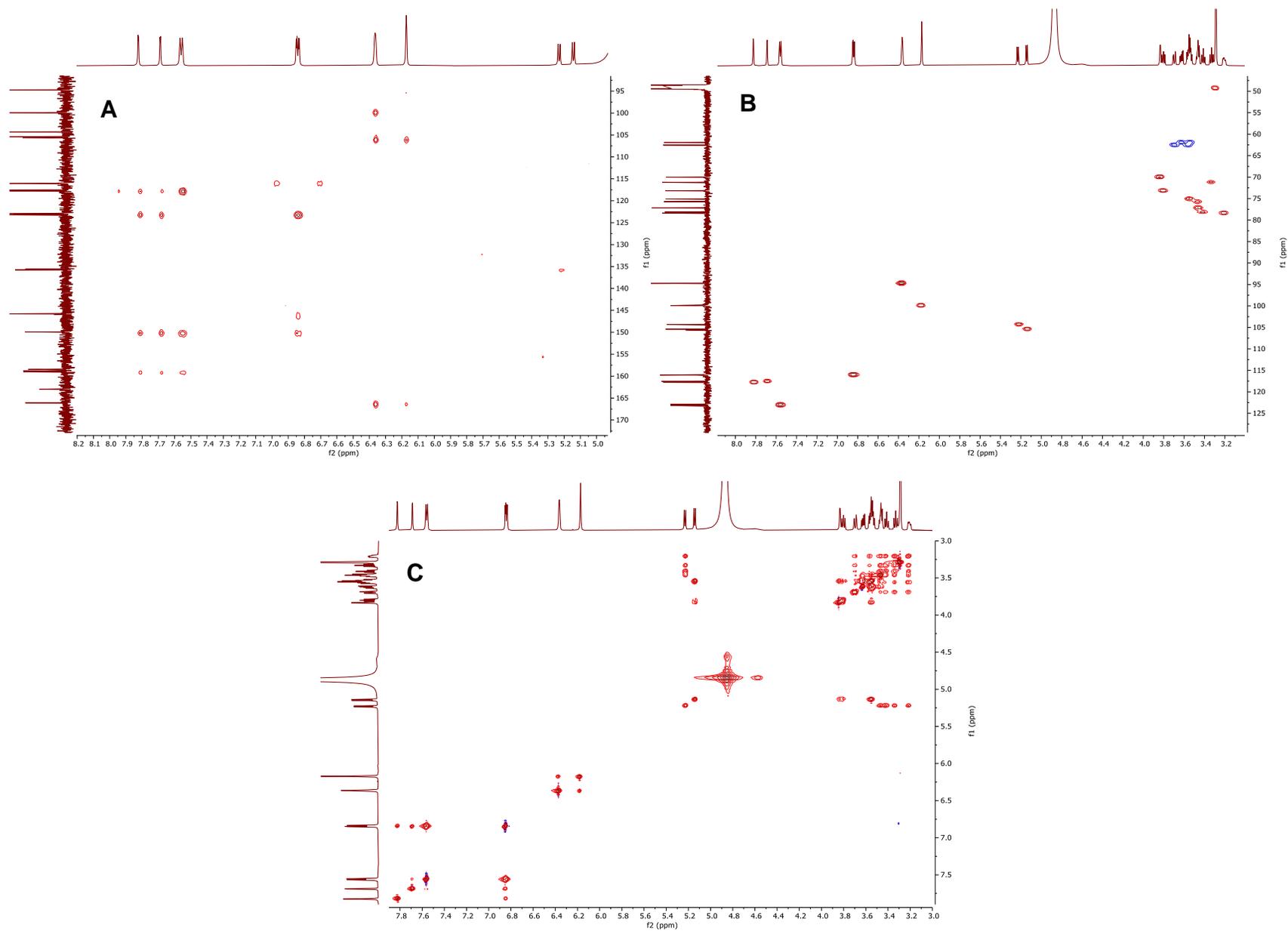


Figura S25. Espectros bidimensionales de la mezcla de compuestos **34** y **35**. (A) HMBC (B) HSQC (C) TOCSY.

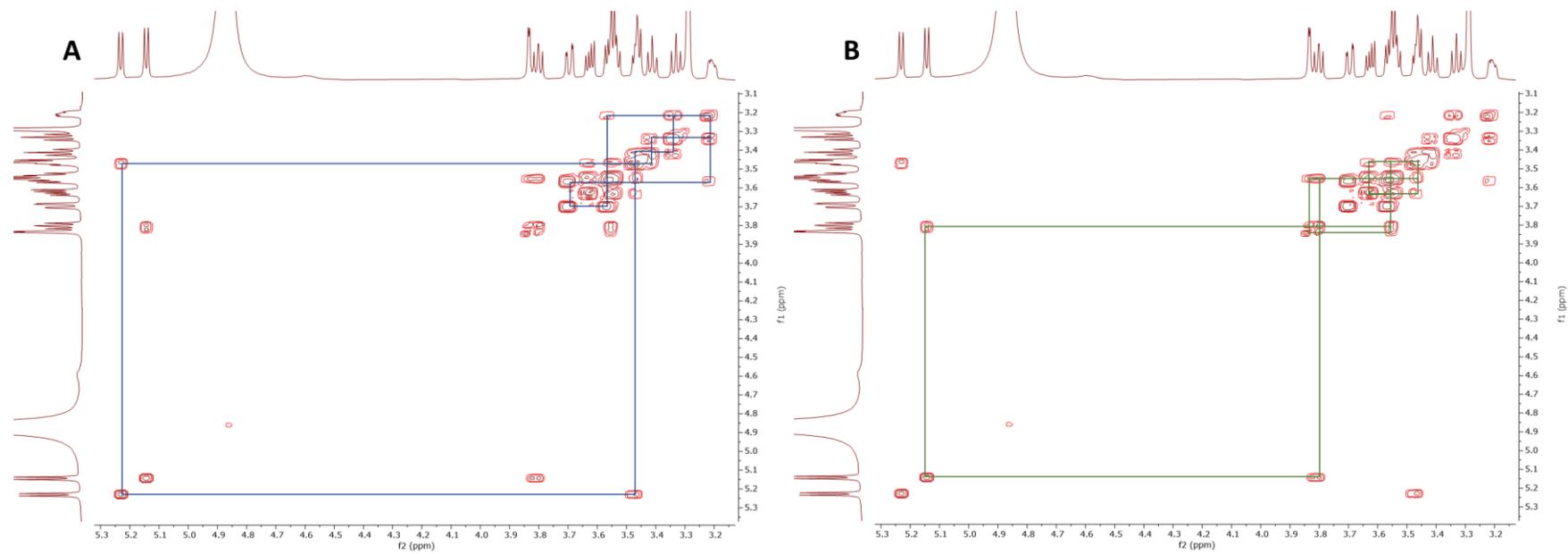


Figura S26. Cuadros de conectividad de azúcares en experimento COSY de la mezcla de compuestos. (A) β -glucosa de **35** y (B) β -galactosa de **34**.