



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**COMPUESTOS AROMÁTICOS DE *Cunila lythrifolia* Y *Clinopodium macrostemum* (LAMIACEAE):
UNA CONTRIBUCIÓN AL DESARROLLO DE LAS PRUEBAS DE IDENTIDAD PARA EL CONTROL DE
CALIDAD DE LAS DROGAS CRUDAS DE AMBAS ESPECIES**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B OSCAR DAVID JIMÉNEZ MARTÍNEZ

TUTORA

DRA. RACHEL MATA ESSAYAG

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., Junio 2019



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	Dr. Francisco Hernández Luis
VOCAL	Dr. Samuel Enoch Estrada Soto
VOCAL	Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava
SECRETARIO	Dr. Harry Alvarez Ospina

Lugar donde se realizó el trabajo de tesis:

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

CONGRESOS

57th Annual Meeting of the Phytochemical Society of North America (PSNA). Cartel:
Identity test of *Cunila lythrifolia* and *Clinopodium macrostemum* (Lamiaceae).
Agosto 2018. San Luis Potosí, México.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de México, al posgrado en Ciencias Químicas y a la Facultad de Química, por brindarme la oportunidad de continuar con mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de Maestría (número de becario 636478).

Al CONACyT por el financiamiento otorgado a través del proyecto CONACyT (A1_S_11226).

A la Dra. Rachel Mata Essayag, por confiar en mí y permitirme formar parte de su equipo de trabajo, así como por su incomparable asesoría, su valioso tiempo y su apoyo incondicional durante todo el proceso de este trabajo de investigación.

A la Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz por su asesoría técnica, su supervisión, sus invaluable consejos y su inmensurable apoyo.

A la Dra. Berenice Ovalle Magallanes por la asesoría en las pruebas farmacológicas y químicas que se realizaron durante este trabajo.

A la Dra. Araceli Pérez Vázquez por su importante asesoría técnica, y por el tiempo que dedicó en ayudarme a la realización de todas las partes que conformaron este proyecto.

Agradezco especialmente a la USAII en particular a la Q. Georgina Duarte Lisci por el apoyo en la realización de los experimentos de cromatografía de gases.

Al Maestro en Ciencias Rafael Torres Colín por la identificación taxonómica de las especies vegetales.

A todos mis compañeros del Laboratorio 124, por su apoyo y su amistad gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABLAS.....	V
LISTA DE ESPECTROS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
RESUMEN	IX
ABSTRACT.....	XI
1. ANTECEDENTES.....	1
1.1. Generalidades sobre el Género <i>Cunila</i>	1
1.2. <i>Cunila lythrifolia</i> Benth (Lamiaceae).	4
1.3. Generalidades del género <i>Clinopodium</i>	6
1.4. <i>Clinopodium macrostemum</i> (Moc & Sessé ex Benth) Kuntze (Lamiaceae).....	9
1.5. Control de calidad, eficacia y seguridad de los productos herbolarios.	11
1.6. Generalidades de nocicepción.	16
1.7. Neurofisiología de la nocicepción.	17
1.8. Modelos animales para estudios de nocicepción.	18
1.9. Las Plantas Medicinales y el Dolor en México.	20
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. Objetivo general.....	22
2.2. Objetivos particulares.	22
3. METODOLOGÍA.....	23
3.1. Material vegetal.	23
3.2. Preparación del extracto acuoso.....	23
3.3. Obtención de las fracciones orgánicas del extracto acuoso.	24
3.4. Preparación del aceite esencial.....	24
3.5. Análisis de los compuestos volátiles presentes en los extractos acuosos de los poleos.....	24
3.6. Instrumentación y condiciones cromatográficas.	25
3.7. Análisis de microextracción en fase sólida (MEFS).	26
3.8. Estudios farmacológicos <i>in vivo</i>	26

3.8.1.	Preparación y administración de las muestras.	27
3.8.2.	Determinación de la toxicidad aguda en ratones.	27
3.8.3.	Evaluación del potencial antinociceptivo mediante el modelo de la formalina.	28
3.8.4.	Análisis estadístico.	29
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
4.1.	Evaluación farmacológica de la inocuidad y eficacia.	30
4.1.1.	Inocuidad.....	30
4.1.2.	Evaluación del potencial antinociceptivo.....	31
4.2.	Establecimiento de las pruebas químicas de identidad.	37
4.2.1.	Composición química del aceite esencial.....	37
4.2.2.	Microextracción en fase sólida de los compuestos volátiles	44
4.2.3.	Compuestos volátiles detectados en las decocciones.	49
5.	CONCLUSIONES.	52
6.	PERSPECTIVAS	54
7.	REFERENCIAS.....	55
	ANEXOS	68

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Distribución del género <i>Cunila</i> .	1
2	Principales tipos de metabolitos presentes en el género <i>Cunila</i> .	3
3	Ejemplos selectos de monoterpenoides del género <i>Cunila</i> .	4
4	<i>Cunila lythrifolia</i> Benth.	5
5	Metabolitos aislados de las partes aéreas de <i>C. lythrifolia</i> .	5
6	Distribución del género <i>Clinopodium</i> .	6
7	Principales tipos de metabolitos presentes en el género <i>Clinopodium</i> .	8
8	Compuestos de tipo monoterpenoide presentes en el género <i>Clinopodium</i> .	9
9	<i>Clinopodium macrostemum</i> (Moc. & Sessé ex Benth) Kuntze.	10
10	Compuestos mayoritarios del aceite esencial de <i>C. macrostemum</i>	11
11	Curso temporal del efecto antinociceptivo del extracto acuoso de <i>C. lythrifolia</i> (DCL) en el modelo de la formalina en ratones.	32
12	Efecto antinociceptivo del extracto acuoso de <i>C. lythrifolia</i> (DCL) en el modelo de la formalina en ratones.	33
13	Curso temporal del efecto antinociceptivo del extracto acuoso de <i>C. macrostemum</i> (DCM) en el modelo de la formalina en ratones.	34
14	Efecto antinociceptivo del extracto acuoso de <i>C. macrostemum</i> (DCM) en el modelo de la formalina en ratones.	34
15	Cromatogramas de la fracción de hexano del extracto acuoso de <i>C. macrostemum</i> y <i>C. lythrifolia</i> .	35
16	Cromatogramas de la fracción de diclorometano del extracto acuoso de <i>C. macrostemum</i> y <i>C. lythrifolia</i> .	36
17	Cromatogramas de la fracción de acetato de etilo del extracto acuoso de <i>C. macrostemum</i> y <i>C. lythrifolia</i> .	36
18	Cromatograma iónico total del aceite esencial de <i>C. lythrifolia</i> analizado en una columna capilar DB-5.	39
19	Cromatograma iónico total del aceite esencial de <i>C. macrostemum</i> analizado en una columna capilar DB-5.	42
20	Esquema del proceso de extracción y desorción por HS-MEFS-CG.	45
21	Cromatograma iónico total de los componentes volátiles presentes en las partes aéreas de <i>C. lythrifolia</i> y <i>C. macrostemum</i> analizados en una columna capilar DB-5 por la técnica de MEFS.	46

22	Cromatograma iónico total de los componentes volátiles presentes en las decocciones de <i>C. lythrifolia</i> y <i>C. macrostemum</i> analizados en una columna capilar DB-5.	50
----	--	----

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Gradiente de elución utilizado para el desarrollo de los perfiles cromatográficos.	26
2	Toxicidad aguda de los extractos acuosos de <i>C. lythrifolia</i> y <i>C. macrostemum</i> .	31
3	Compuestos volátiles identificados por CG-EM a partir del aceite esencial de <i>C. lythrifolia</i> .	40
4	Compuestos volátiles identificados por CG-EM a partir del aceite esencial de <i>C. macrostemum</i> .	43
5	Componentes volátiles de las partes aéreas de los lotes II de <i>C. lythrifolia</i> y <i>C. macrostemum</i> obtenidos por MEFS.	47
6	Componentes volátiles de la decocción de los lotes II de <i>C. lythrifolia</i> y <i>C. macrostemum</i> .	51

LISTA DE ESPECTROS

Espectro		Página
1	Espectro de masas de linalool (9).	69
2	Espectro de masas de β -cariofileno (11).	69
3	Espectro de masas de mentona (12).	70
4	Espectro de masas de α -terpineol (14).	70
5	Espectro de masas de pulegona (15).	71
6	Espectro de masas de α -pineno (16).	71
7	Espectro de masas de D-limoneno (17).	72
8	Espectro de masas de acetato de 1-octen-3-ilo (18).	72
9	Espectro de masas de acetato de 3-octanol (19).	73
10	Espectro de masas de neo-mentol (20).	73
11	Espectro de masas de biciclogermacreno (21).	74
12	Espectro de masas de óxido de cariofileno (22).	74
13	Espectro de masas de o-cimeno (23).	75
14	Espectro de masas de eucaliptol (24).	75
15	Espectro de masas de mentofurano (25).	76
16	Espectro de masas de 4,7-dimetil benzofurano (26).	76
17	Espectro de masas de acetato de bornilo (27).	77
18	Espectro de masas de acetato de isopulegol (28).	77
19	Espectro de masas de δ -elemeno (29).	78
20	Espectro de masas de α -cariofileno (30).	78
21	Espectro de masas de acetato de nopilo (31).	79
22	Espectro de masas de acetato de nopilo (32).	79
23	Espectro de masas de α -tujeno (33).	80
24	Espectro de masas de canfeno (34).	80
25	Espectro de masas de 2,4-tujadieno (35).	81
26	Espectro de masas de <i>trans-p</i> -mentona (36).	81
27	Espectro de masas de <i>cis-p</i> -mentona (37).	82
28	Espectro de masas de <i>neo</i> -isomentol (38).	82
29	Espectro de masas de isopulegol (39).	83
30	Espectro de masas de piperitona (40).	83

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
°C	Grados Centígrados
5-HT	Serotonina
ABC	Área Bajo la Curva
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de Etilo
AMPc	Monofosfato Cíclico de la Adenosina
ANADEVA	Análisis de Varianza
ATP	Trifosfato de la Adenosina
BK	Bradicinina
CAR	Carboxen
CCD	Cromatografía en Capa Delgada
CG	Cromatografía de Gases
CGRP	Péptido Relacionado con el Gen de la Calcitonina
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
CLAE	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
CLUE	Cromatografía de Líquidos de Ultra Eficiencia
Cm	Centímetros
COX	Ciclooxigenasa
DCL	Decocción <i>Cunila lythrifolia</i>
DCM	Decocción <i>Clinopodium macrostemum</i>
DL ₅₀	Dosis Letal Media
DIC	Diclofenaco
DVB	Divinil Benceno
EEM	Error Estándar de la Media
EM	Espectrometría de Masas
eV	Electronvolt
FHEUM	Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos
G	Gramos
GMPc	Monofosfato Cíclico de la Guanosina
H	Horas
H ⁺	Hidrógeno
H ₂ O	Agua
He	Helio
HS	Head Space
HT	Histamina
IASP	Asociación Internacional para el Estudio del Dolor
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IR	Índice de Retención

K ⁺	Ion Potasio
Kg	Kilogramo
µL	Microlitros
µm	Micrómetros
M	Metros
m/z	Relación Masa Carga
MEFS	Micro Extracción en Fase Sólida
Mg	Miligramos
Min	Minutos
mL	Mililitros
Mm	Milímetros
Na ₂ SO ₄	Sulfato de Sodio
NaCl	Cloruro de Sodio
NIST	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología
Nm	Nanómetros
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud
<i>p.o.</i>	Administración Oral
PDMS	Poli Dimetil Siloxano
PG	Prostaglandinas
PLC	Fosfolipasa C
PPAR _γ	Receptores Gamma Activados por el Factor Proliferador de Peroxisomas
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
S	Segundos
<i>s.c.</i>	Administración Subcutánea
SNC	Sistema Nervioso Central
SP	Sustancia P
SSI	Solución Salina Isotónica
TOF	Tiempo de Vuelo
UA	Unidades de Absorbancia
UV/VIS	Ultravioleta / Visible
VEH	Vehículo

RESUMEN

El presente trabajo describe parte de la investigación científica realizada para la elaboración de las monografías farmacopeicas y tipo OMS de las especies *Cunila lythrifolia* Benth y *Clinopodium macrostemum* (Moc & Sessé ex Benth) Kuntze, plantas de la familia de las lamiáceas de amplio uso en la medicina tradicional de nuestro país.

Los resultados de las pruebas preclínicas de inocuidad realizadas de acuerdo al método de Lorke indicaron que los preparados (extractos acuosos) de las dos especies no provocaron efectos tóxicos agudos en roedores. La DL₅₀ de las tisanas se estimó mayor a 5 g/kg de peso del animal. Tampoco ocasionaron daños macroscópicos visibles en los principales órganos internos de los animales.

Por otra parte, las tisanas (decocción) de *C. lythrifolia* y *C. macrostemum* demostraron un efecto antinociceptivo durante la prueba de la formalina en ratones. Los resultados de esta evaluación indicaron también que el preparado de *C. lythrifolia* fue más activo contra el dolor de tipo neurogénico, mientras que el de *C. macrostemum* fue mejor contra el dolor inflamatorio.

La identificación de los componentes volátiles presentes en el aceite esencial, la planta y la decocción de los poleos se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). Todos los componentes volátiles fueron identificados mediante la comparación de sus índices de retención en relación con una serie homóloga de *n*-alcanos C₈-C₂₀ calculados de acuerdo a Van Del Dool y Kratz (1963), y con los reportados en la base de datos del NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología), y los descritos por Adams (2007). Así, el análisis de los aceites esenciales estableció un elevado porcentaje de mentona (**12**) y pulegona (**15**) en *C. macrostemum* y un alto porcentaje de dos isómeros del acetato de nopilo (**31** y **32**), y cariofileno (**11**) en *C. lythrifolia*, característica que permitió diferenciar químicamente ambas especies. Estos resultados se encontraron en armonía con los obtenidos mediante la técnica de micro extracción en fase sólida (MEFS), la cual permitió la identificación de mentona (**12**) como el componente volátil más abundante en *C. macrostemum*, en tanto que en *C. lythrifolia* se identificaron al acetato de

isopulegol (**28**), acetato de isobornilo (**27**) y al cariofileno (**11**) como sus principales componentes. Finalmente, los componentes volátiles de la decocción a partir de las de las plantas permitieron la identificación de pulegona (**15**) como compuesto volátil mayoritario en *C. macrostemum*, la cual con base en reportes previos es posible que contribuya al efecto antinociceptivo de la tisana. En el caso de *C. lythrifolia* el acetato de nopilo (**31**) fue el componente volátil mayoritario.

ABSTRACT

The present work describes part of the scientific research carried out for elaborating both the pharmacopoeia and WHO type monographs of the species *Cunila lythrifolia* Benth and *Clinopodium macrostemum* (Moc & Sessé ex Benth) Kuntze (Lamiaceae), which are widely used in Mexico for treating stomachaches and other complaints.

The results of the preclinical safety tests of both species according to the Lorke protocol revealed that the traditional preparations (aqueous extracts) were not toxic to mice. The LD₅₀ of the tisanes was estimated greater than 5 g/kg of animal weight. No internal damage was observed when the more important internal organs were macroscopically analyzed.

Regarding the efficacy test of the traditional preparations (decoctions) of both plants, the antinociceptive potential of *C. lythrifolia* and *C. macrostemum* were demonstrated by means of the formalin test in mice. *C. lythrifolia* was more active against neurogenic pain, while *C. macrostemum* was better against inflammatory pain.

The identification of volatile components in the essential oil, the plant and the decoction of the both plants was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). All volatile components were identified by comparing their retention indexes in relation to a homologous series of C₈-C₂₀ n-alkanes calculated according to Van Del Dool and Kratz (1963), with those reported in the database of the NIST (National Institute of Standards and Technology), and those described by Adams (2007). Thus, the analysis of essential oils established a high percentage of menthone (**12**) and pulegone (**15**) in *C. macrostemum* and a high percentage of two isomers of nopyl acetate (**31** and **32**), as well as caryophyllene (**11**) for *C. lythrifolia*. These features will chemically differentiated both species. The solid phase micro extraction (SPME) analysis allowed the identification of menthone (**12**) as yhe major component in *C. macrostemum* while in *C. lythrifolia* isopulegol acetate (**28**), isobornyl acetate (**27**) and caryophyllene (**11**) were the main components. Finally, the volatiles from the decoction of both plants allowed the identification of pulegone (**15**) as the major compound in *C. macrostemum*, which based on previous reports (De Soussa et al., 2007) is likely

contribute to the antinociceptive effect of this oleo. On the other hand, nopyl acetate (**31**) was identified as the major volatile component of the aqueous extract of *C. lythrifolia*

1. ANTECEDENTES.

1.1. Generalidades sobre el Género *Cunila*.

Cunila es un género americano perteneciente a la familia Lamiaceae que cuenta con 18 especies de distribución disyunta. Así, un grupo de especies se encuentra desde el este de Estados Unidos de América del Norte hasta Panamá, mientras que otro habita en el sureste de Brasil, noreste de Argentina, Uruguay y Paraguay (Figura 1). México cuenta con cinco especies endémicas y otra cuya distribución se extiende a la América Central (García-Peña y González-Gallegos, 2013).

Las especies del género son plantas medicinales y aromáticas caracterizadas por presentar altos contenidos de aceites esenciales (Cantino y Sanders, 1986). Algunas de éstas se emplean comúnmente en la medicina tradicional como agentes saborizantes, laxantes, expectorantes, sedantes, anticonvulsivos, analgésicos, y repelentes de insectos. También se les considera útil para tratar la dispepsia, la flatulencia y otros trastornos estomacales (Simmonds y Blaney., 1992; Simões *et al.*, 1994; Poser *et al.*, 1996; Bordignon, 1997; Agostini *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2010).

De acuerdo con Simões *et al.* (1994) las hojas y las flores de ciertas especies de *Cunila*, tales como *C. incisa* Benth, *C. galioides* Benth, *C. microcephala* Benth, bajo la forma de infusión, son útiles contra trastornos estomacales e infecciones respiratorias.



Figura 1. Distribución del género *Cunila*. Imagen modificada de Global biodiversity information facility (Gbif 2019).

Los diferentes estudios fitoquímicos realizados sobre este género se han enfocado primordialmente al análisis de sus aceites esenciales, los cuales se caracterizan por la presencia de monoterpenoides y sesquiterpenoides. Otros estudios han permitido establecer la presencia en el género de flavonoides y triterpenoides (Bordignon *et al.*, 2003; Delgado *et al.*, 1989). Los principales constituyentes obtenidos de especies de *Cunila* se resumen en la Figura 2. Los monoterpenoides constituyen el grupo de productos naturales más abundantes y representativos del género (Figura 3). Así, el aceite esencial de *C. incisa* contiene 1,8-cineol como producto mayoritario (Bordignon *et al.*, 1996); en tanto que los de *C. microcephala* y *C. fasciculata* el mentofurano es el principal (Bordignon *et al.*, 1997). El aceite de *C. menthoides* contiene primordialmente isomentona, mentona, pulegona y linalool (Bordignon *et al.*, 1998), sin embargo, Agostini y colaboradores (2010) identificaron 15 compuestos de los aceites esenciales de cuatro poblaciones brasileñas de *C. menthoides* y propusieron dos quimiotipos más de la especie, el primero se caracterizó por las altas concentraciones de pulegona en la esencia; y el segundo por altas concentraciones de linalool (Agostini *et al.*, 2010). El aceite de *C. Platyphylla* se caracteriza por su alto contenido de pulegona (Bordignon *et al.*, 1998b) y el de *C. angustifolia* por la presencia en grandes cantidades de sabineno, γ -terpineno y limoneno (Bordignon *et al.*, 1999). *C. spicata* ha sido analizada por varios autores, de tal forma que Van Baren y colaboradores en 2001 demostraron que limoneno, acetato de geranilo y linalool, son los principales constituyentes de su esencia; en tanto que Echeverrigaray *et al.* (2009) reportaron cuatro nuevos quimiotipos de esta especie con altas concentraciones de linalool/1,8-cineol; 1,8-cineol; carvona/carveol o 1,8-cineol/limoneno. El aceite de *C. galioides* presenta concentraciones importantes de citral (neral y geranial), ocimeno y menteno (Echeverrigaray *et al.*, 2003). Por último, en 2010, Agostini y colaboradores identificaron 4 monoterpenos y 9 sesquiterpenos en el aceite esencial de *C. incana*, siendo los componentes mayoritarios β -cariofileno, palustrol, germacreno D y (*E*)- β -ocimeno.

Desde el punto de vista farmacológico son pocos los estudios realizados. De tal forma que en 2007 Sandri y colaboradores evaluaron la actividad antimicrobiana de los

aceites esenciales de algunas especies de *Cunila* contra bacterias patógenas y microorganismos que usualmente contaminan los alimentos. De acuerdo con los resultados de este estudio, el aceite esencial extraído de *C. galioides* quimiotipo citral demostró una notable actividad antimicrobiana contra *Bacillus* sp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila* y *Enterococcus faecalis*; el efecto se asoció al alto contenido de geranial y neral, dos isómeros del citral presentes en el aceite, conocidos por su actividad antimicrobiana (Kim *et al.*, 1995; Chalchat *et al.*, 1997). Los aceites de *C. incisa* y *C. spicata*, caracterizados por la presencia de 1,8-cineol y α -terpineol, inhibieron el crecimiento de *Bacillus* sp., *Aeromonas* sp., *L. monocytogenes* y *S. aureus*.

Por otra parte, los aceites esenciales de *C. angustifolia*, *C. incana* y *C. spicata*, presentaron efecto acaricida contra la garrapata azul asiática (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*), de igual manera el aceite esencial de *C. angustifolia* presentó efecto insecticida contra el gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais*) (Apel *et al.*, 2009; Savaris *et al.*, 2014).

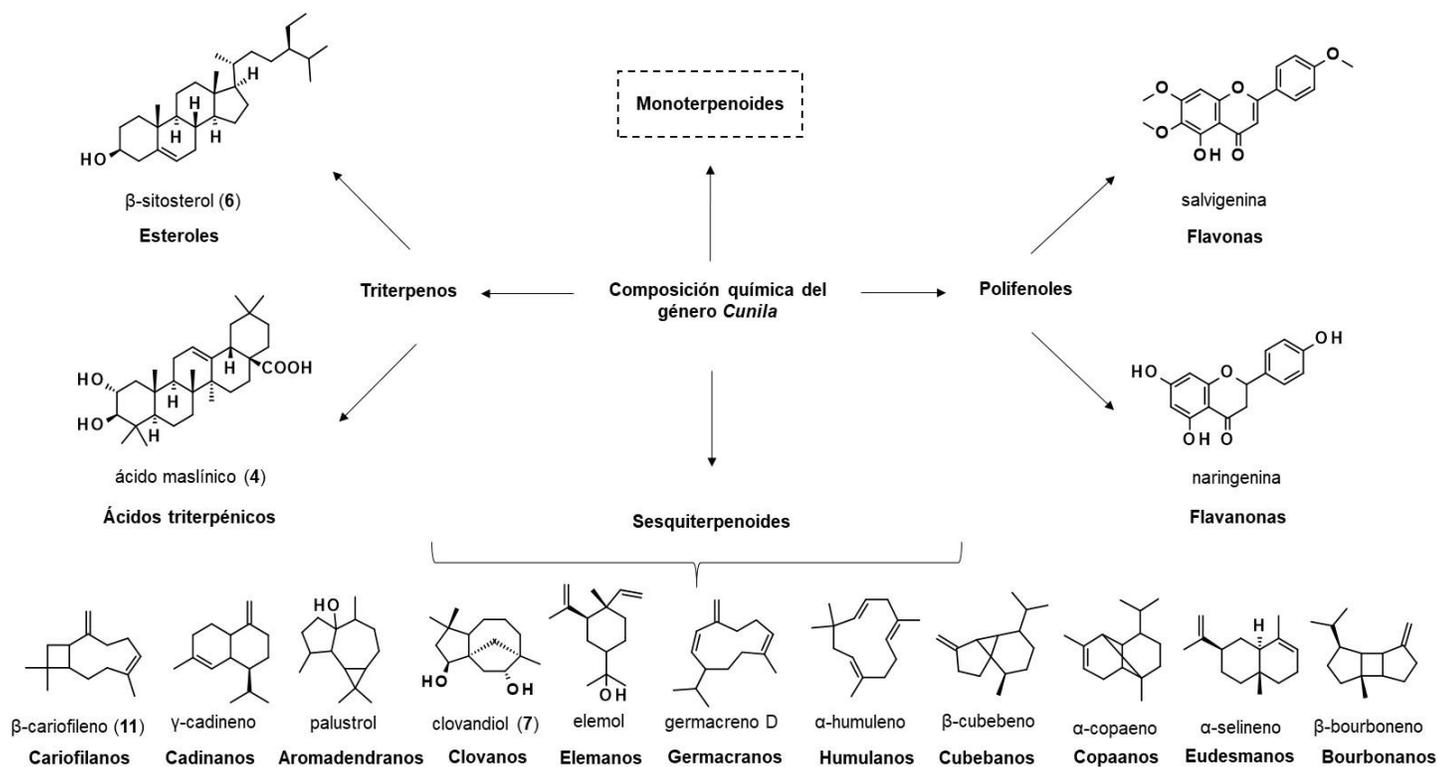


Figura 2. Principales tipos de metabolitos presentes en el género *Cunila*.

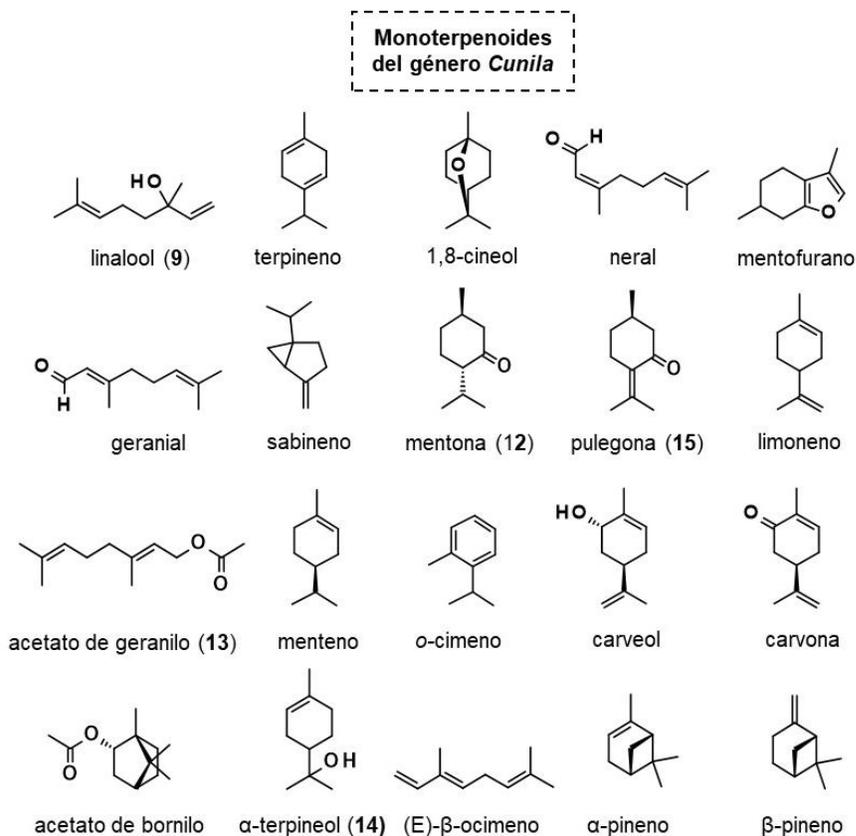


Figura 3. Ejemplos selectos de monoterpenoides del género *Cunila*.

1.2. *Cunila lythrifolia* Benth (Lamiaceae).

Cunila lythrifolia Benth es una especie endémica de México asociada a bosques de encino y pino, cuyos individuos se encuentran en las zonas centro y oeste de México, donde se le conoce como “poleo de monte”.

C. lythrifolia es una hierba semiarbusciva que mide hasta 1.5 m de altura y tiene los tallos cuadrados. Las hojas son más largas que anchas, con olor a menta. Las flores son púrpura-azulosas y se encuentran en forma de racimo, mientras que sus frutos son amarillos con forma ovalada (Figura 4) (Argueta *et al.*, 1994).

Las partes aéreas son utilizadas tradicionalmente en forma de decocción para el tratamiento de afecciones respiratorias como gripe, tos, bronquitis y ronquera.

Asimismo, se le emplea en padecimientos del aparato digestivo como diarrea, vómito, dolor de estómago y mala digestión (Argueta *et al.*, 1994).



Figura 4. *Cunila lythrifolia* Benth (Foto Oscar Jiménez Martínez, 2017).

Delgado y colaboradores mostraron que el extracto clorofórmico de las partes aéreas de *C. lythrifolia* contienen varios ácidos de naturaleza triterpenoide (ver Figura 5) incluyendo los ácidos oleanólico (1), ursólico (2), 2 α -hidroxi-ursólico (3), maslínico (4)

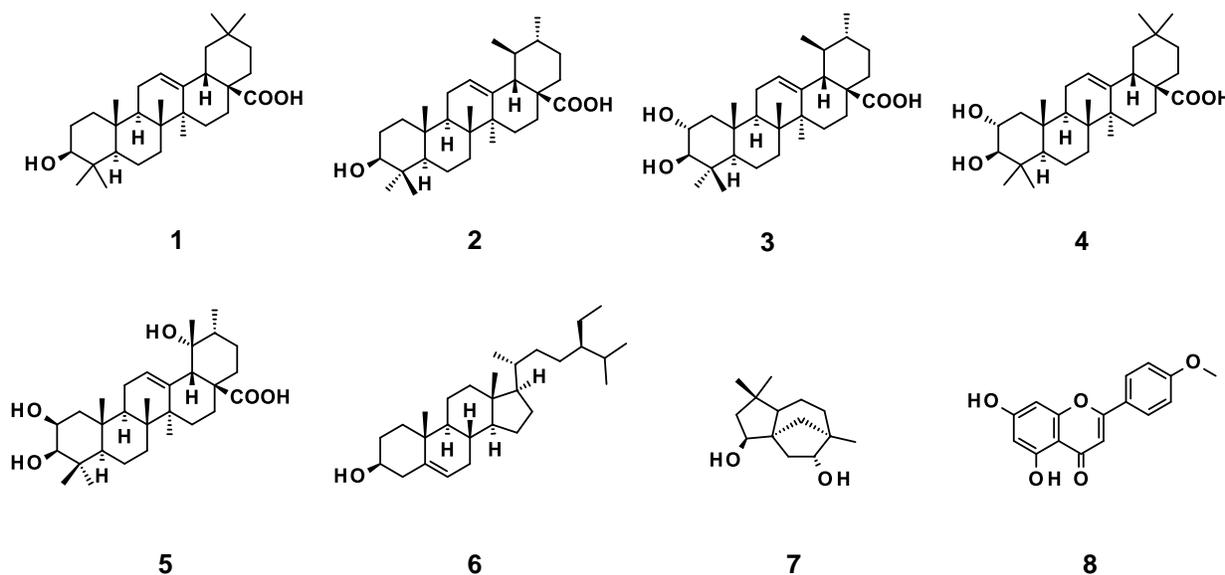


Figura 5. Metabolitos aislados de las partes aéreas de *C. lythrifolia*

y 2-*epi*-torméntico (5), β -sitosterol (6), el sesquiterpenoide clovandiol (7) y la flavona acacetina (8) (Delgado *et al.*, 1989).

1.3. Generalidades del género *Clinopodium*.

El género *Clinopodium* consta de 100 especies circunscritas en su mayoría a América (desde Canadá hasta Chile y Argentina) y Eurasia templada (Figura 6). Recientemente las especies de *Satureja* del Nuevo Mundo se incluyeron en este género (Harley y Granda Paucar 2000; Harley *et al.* 2004). En México existen 14 especies de *Clinopodium* de las cuales 10 son endémicas (Martínez-Gordillo *et al.*, 2013).

Las especies presentes en el género *Clinopodium* contienen principalmente compuestos aromáticos por lo que comúnmente se utilizan en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética. Tradicionalmente se han utilizado como analgésicos, tónicos y agentes carminativos para tratar trastornos estomacales e intestinales como calambres, náuseas, indigestión y diarrea (Zargari, 1990; Momtz y Abdollahi, 2010). De acuerdo con los libros tradicionales persas, la decocción de algunas de las especies de *Clinopodium* han sido efectivas para la sarna y la picazón, mientras que las preparaciones a base de las flores son emenagogas y diuréticas desde tiempos inmemoriales; finalmente, la semilla es útil para tratar el dolor de muelas y articulaciones, así como las hemorroides (Saeidnia *et al.*, 2016).



Figura 6. Distribución del género *Clinopodium*. Imagen modificada de Global Biodiversity Information Facility (GBIF 2019).

Los productos característicos (Figura 7) del género *Clinopodium* incluyen metabolitos secundarios de tipo terpenoide (monoterpenoides, sesquiterpenoides y triterpenoides), al igual que una gran variedad de ácidos fenólicos, como los ácidos rosmarínico, caféico, *p*-cumárico, ferúlico, gálico, clorogénico, protocatéquico, vanílico y carnósico. También contiene numerosos flavonoides, principalmente del tipo de las flavonas como la luteolina y la apigenina que son las más comunes (Tepe y Cilkiz, 2015).

Los estudios fitoquímicos realizados sobre varias especies del género *Clinopodium* se han enfocado también al análisis de sus esencias, y los resultados de los mismos han permitido la identificación de monoterpenoides oxigenados como el timol y carvacrol, los cuales están presentes en *C. cuneifolium*, *C. hortense*, *C. montanum*, *C. spicigerum*, *C. thymbra* y *S. bachtiarica*. Otros monoterpenoides importantes en las esencias del género son γ -terpineno y *p*-cimeno, localizados de acuerdo a muchos reportes en *C. cuneifolium*, *C. hortense*, *C. montanum* y *C. thymbra*. Por otra parte, piperitona, piperitenona y óxido de piperitona son los principales compuestos de *C. gilliesii* y *C. fruticosum* (Viturro *et al.*, 2000; Coehlo *et al.*, 2007, 2012; Luna *et al.*, 2008; Dambolena *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2011; Cabana *et al.*, 2013;). La isomentona es el componente principal de la esencia de *C. bolivianum* (Senatore *et al.*, 1998; Dambolena *et al.*, 2009; Hatami *et al.*, 2011). La timoquinona (Mastelic y Jerkovic, 2003; Grosso *et al.*, 2009; Palavra *et al.*, 2011; Taborsky *et al.*, 2012), el geraniol (Mastelic y Jerkovic, 2003; Radonic y Milos, 2003; Mirjana y Nada, 2004; Čavar *et al.*, 2008) y el metil ester de carvacrol (Skocibusic y Bezic, 2004; Serrano *et al.*, 2011;) son mayoritarios en *C. montanum*. En la Figura 8 se presentan los compuestos mayoritarios anteriormente descritos.

Algunas especies del género *Clinopodium* han sido sujeto de numerosos estudios biológicos. La actividad más explorada ha sido la antimicrobiana con un total de 191 estudios de 37 especies. Los principios activos generalmente son timol y carvacrol, que como se señaló anteriormente, son terpenoides abundantes en las esencias de estas especies. Así, la mayoría de las actividades biológicas descritas se pueden atribuir al contenido de sus aceites esenciales, tal es el caso del aceite esencial de *C. hortense*, al que se le comprobaron propiedades antioxidante, insecticida, antiviral,

antileishmania, genotóxica, antiinflamatoria, antinociceptiva, analgésica y citotóxica considerable (Nottingham *et al.*, 1991; Zani *et al.*, 1991; Nottingham y Hardie, 1993; Hajhashemi *et al.*, 2002, 2012; Moradi *et al.*, 2008; Manjili *et al.*, 2012; Alinkina *et al.*, 2013).

Otras especies de *Clinopodium* como *C. montanum*, *C. thymbra* y *C. cuneifolium* poseen actividades herbicidas e inhibitorias de las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, además de las descritas para *C. hortense*. Una revisión reciente publicada por Tepe y Cilkiz (2015) resume los trabajos sobre actividades biológicas más importantes de especies selectas de *Satureja* que se incluyeron en el género *Clinopodium*.

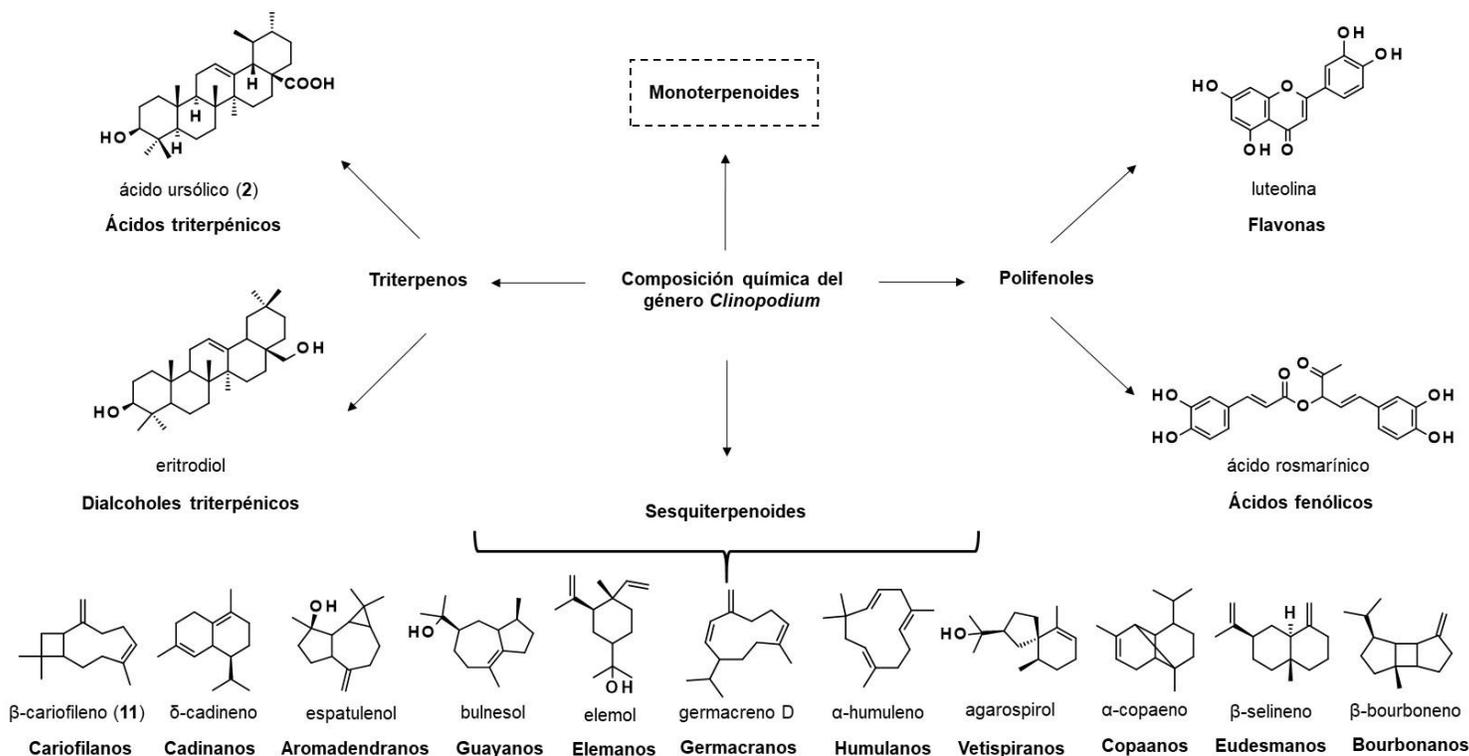


Figura 7. Principales tipos de metabolitos presentes en el género *Clinopodium*.

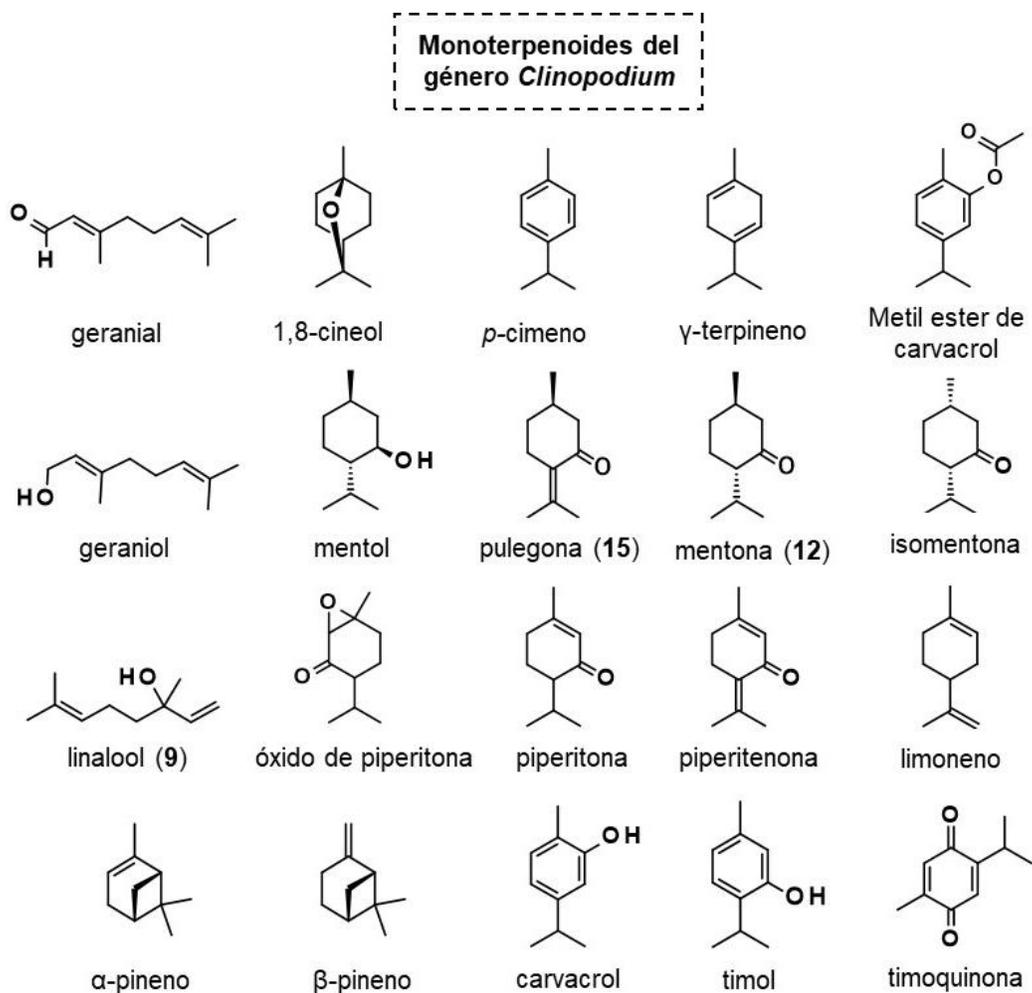


Figura 8. Compuestos de tipo monoterpenoide presentes en el género *Clinopodium*.

1.4. *Clinopodium macrostemum* (Moc & Sessé ex Benth) Kuntze (Lamiaceae).

Clinopodium macrostemum (Moc & Sessé ex Benth) Kuntze [sinónimos *Melissa macrostema* Moc. & Sessé ex Benth., *Calamintha macrostema* (Moc. & Sessé ex Benth.) Benth., y *Satureja macrostema* (Moc. & Sessé ex Benth.) Briq] es una hierba arbustiva con olor a menta, que llega a medir hasta 2 m de altura (Figura 9). En México, se distribuye en zonas montañosas y boscosas con climas templados o semifríos de los estados de Guerrero, Colima, Jalisco, Michoacán, Estado de México, Puebla, Morelos y Oaxaca (Turner, 2008; Redowski y Calderón, 2010; Rojas-Olivos *et al.*, 2018). La planta se designa comúnmente con los nombres de poleo, hierba del borracho, poleo, tabaquillo grande, toche, té de monte, té del monte y hierba de

borracho, *yuujkxaky*, *cuencuenzpatli*, *quauhnhuacense*, *guiezza*, *quieutzu*, *nurhitini*, *nurite*.

Las hojas frescas se utilizan en forma de infusión o decocción como remedio para diversos trastornos gastrointestinales, tos, y para aliviar la resaca causada por el consumo excesivo de bebidas alcohólicas; las hojas se utilizan para condimentar alimentos mientras que las ramas frondosas, se utilizan como adornos en festividades religiosas y civiles (Argueta *et al.*, 1994; Ortega-Ortega y Vázquez-García, 2014).



Figura 9. *Clinopodium macrostemum* (Moc. & Sessé ex Benth) Kuntze. Imagen tomada Biodiversity Information Facility (GBIF 2019).

Los productos mayoritarios identificados en el aceite esencial de *C. macrostemum* por Rojas-Olivos y colaboradores fueron linalool (9), nerol (10), β -cariofileno (11), mentona (12), acetato de geranilo (13), terpineol (14) y pulegona (15) (Figura 10). El aceite mostró propiedades larvicidas contra *Culex quinquefasciatus*; el efecto se atribuyó a los constituyentes oxigenados del aceite (Rojas-Olivos *et al.*, 2018). Otro estudio analizó extractos etanólicos por CLAR lo que permitió identificar la presencia del ácido rosmarínico y otros polifenoles. En el mismo estudio se comprobaron las propiedades antioxidantes de la especie (Alonso-Carrillo *et al.*, 2017).

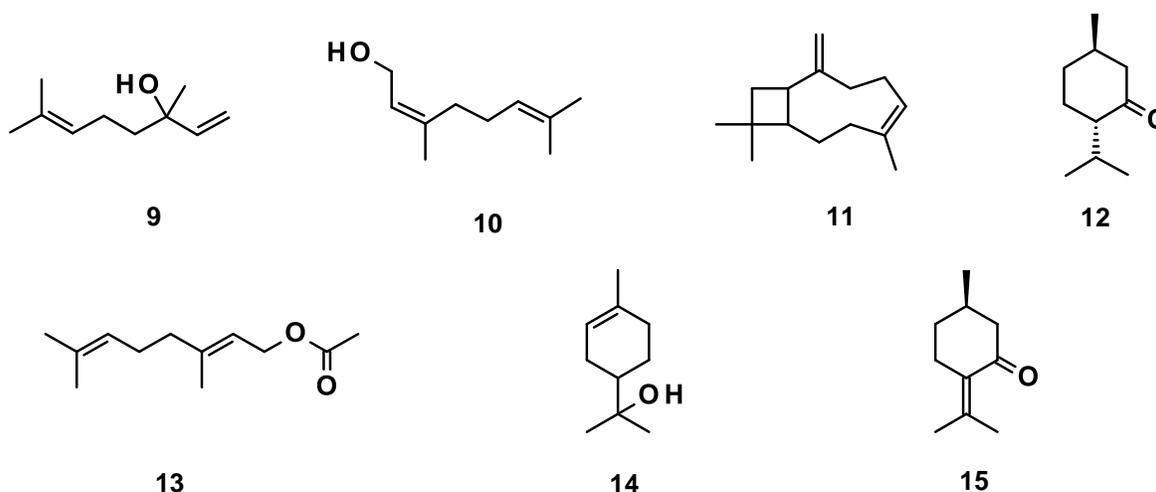


Figura 10. Compuestos mayoritarios del aceite esencial de *C. macrostemum*.

1.5. Control de calidad, eficacia y seguridad de los productos herbolarios.

Actualmente, el uso de plantas medicinales y productos herbolarios, sobre todo en países en vía de desarrollo, sigue siendo la primera elección para aliviar enfermedades más comunes. La mayoría de estos productos son de venta libre y su seguridad, eficacia y calidad son desconocidos. En consecuencia, tanto en países desarrollados como en aquellos en vía de desarrollo, existe un marcado interés para garantizar la calidad de las drogas crudas y preparados herbolarios derivados de las mismas a fin de garantizar su uso racional (Cañigüeral y Vila, 2005).

Como solución a esta problemática, la OMS a través de la Asamblea Mundial de la Salud (WHA) emitió una serie de resoluciones (WHA 31.33, 1978; WHA 40.33, 1987; y WHA 42.43, 1989) en las cuales enfatizó la necesidad de asegurar la calidad y eficacia de las drogas crudas y/o preparados herbolarios (OMS, 1999). Posteriormente, en 2009, la OMS en su resolución WHA 62.13, pidió actualizar la estrategia referente a la medicina tradicional 2002-2005, sobre la base de los progresos realizados por los países y los nuevos problemas que se plantean actualmente en el campo de la medicina tradicional. Con miras a satisfacer esa nueva demanda, la OMS actualizó recientemente los objetivos del programa de medicina

tradicional en su documento “Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023” publicado en 2013. En este documento se contemplan dos objetivos principales: el primero consiste en brindar apoyo a los países miembros para que aprovechen la medicina tradicional para lograr su bienestar y atención primaria a sus problemas de salud; mientras que el segundo trata de promover la utilización segura y eficaz de la medicina tradicional mediante la reglamentación de productos, prácticas y profesionales. Las metas más importantes de este documento son: (i) el fortalecimiento de la seguridad, la calidad y la eficacia de esos productos herbolarios mediante su reglamentación; y (ii) fomentar la cobertura sanitaria universal por medio de la integración de servicios de medicina tradicional a los sistemas nacionales de salud (OMS, 2013).

De acuerdo a las recomendaciones de la sexta Conferencia Internacional de Autoridades Regulatoras de Drogas (ICDRA), la OMS ha elaborado monografías de las plantas medicinales de mayor uso a nivel global, mismas que han servido de modelo para la elaboración de monografías farmacopeicas y de tipo OMS en todo el mundo. Estas monografías apoyarán sin lugar a duda al alcance de las metas establecidas en el documento “Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023”.

Las monografías tipo OMS constan de dos partes: la primera incluye un resumen acerca de las características botánicas, los principales componentes químicos activos y el control de calidad de cada planta; mientras que la segunda es una revisión acerca de las aplicaciones clínicas, la farmacología, la posología, las contraindicaciones y las reacciones adversas potenciales de las plantas (OMS, 2000).

Como respuesta a las iniciativas de la OMS, la comunidad europea creó en 1989 la Cooperativa Científica Europea de Fitoterapia (ESCOP por sus siglas en inglés) con el objetivo general de promover el avance del conocimiento científico de los medicamentos a base de plantas y apoyar la armonización de las regulaciones aplicadas a nivel europeo. La ESCOP publicó en 2003 ochenta monografías de drogas vegetales; cada una incluye una revisión exhaustiva y objetiva de la información

bibliográfica existente de la droga considerada desde su definición, constituyentes principales, datos clínicos, propiedades farmacológicas hasta las referencias pertinentes (ESCOP, 2003).

En México a pesar del enorme número de especies medicinales (más de 4000) y su amplio uso, son pocas las plantas que han sido estudiadas para establecer los criterios que garanticen su eficacia, seguridad y su calidad. Ante este paradigma y como réplica a las demandas de la OMS, la Secretaría de Salud publicó en 2001 la primera edición de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM), documento que contiene 41 monografías de plantas y 23 monografías de aceites esenciales de mayor consumo con las especificaciones que deben cumplir las plantas y sus derivados fitoterapéuticos. Además, se incluyen los procedimientos generales de análisis. Posteriormente, en 2013 se publicó una segunda edición que contiene un mayor número de especies autóctonas, sin embargo, estas monografías son todavía pocas en relación al número de plantas medicinales del país (FEUM, 2013).

Las monografías antes mencionadas constituyen elementos fundamentales para el desarrollo de una fitoterapia racional, permitiendo al sector salud regular el uso terapéutico de las plantas con base en criterios de calidad, eficacia y seguridad bien establecidos.

Una gran cantidad de drogas surgen de la Medicina Tradicional y cuentan con un uso documentado de por más de un siglo; de acuerdo a la OMS, este uso legendario sin reportes de efectos adversos puede considerarse como un criterio de seguridad. Probablemente, el uso ancestral de muchas yerbas contribuyó a arraigar en la población la percepción errónea de que lo natural es sinónimo de inocuo. De manera adicional, a pesar de que las drogas vegetales y sus derivados suelen presentar un margen terapéutico amplio, no están exentos de posibles efectos adversos, interacciones y contraindicaciones (Cañigüeral y Vila, 2005). De esta forma, todas las medicinas, ya sean sintéticas o de origen vegetal, deberían llenar los requerimientos básicos para ser seguros y efectivos (EMA, 2005; WHO, 2002, 1998, 1996, a, b, 1990, 1988). Generalmente, la evaluación de la seguridad debe sustentarse, siempre

que sea posible, en la existencia de documentación científica relevante sobre su posible toxicidad, efectos secundarios, interacciones, contraindicaciones, y potencial mutagénico, por mencionar las más importantes.

Para sustentar la eficacia de los productos herbolarios, es necesario generar la información farmacológica mediante la aplicación de ensayos experimentales preclínicos y clínicos. También es importante conocer los principios activos (Ciguañeral y Vila, 2005; Keller, 1996).

Finalmente, la calidad se convierte en un requisito básico de los medicamentos, no solo por su importancia intrínseca, sino porque constituye la base sobre la que reposa la reproducibilidad de los parámetros de seguridad y eficacia. Cabe mencionar que muchos problemas, no aplicables a fármacos de síntesis, influyen en la calidad de los fitofármacos o dificultan su control. Los más importantes se resumen a continuación (Bauer, 1998; Bauer y Tittel, 1996; Busse, 2000; Franz y Vlietinck, 2001; De Diego, 1992):

- 1) Se trata de sistemas multicomponentes con una composición compleja, mucho más difíciles de caracterizar que un compuesto puro, sea sintético o natural.
- 2) A veces no se conocen los constituyentes químicos responsables del efecto terapéutico o, con frecuencia, éste se debe a un conjunto de ellos.
- 3) Se trata de material biológico, química y naturalmente variable.
- 4) Los métodos analíticos selectivos o compuestos de referencia a veces no están comercialmente disponibles.
- 5) Existen quimiovariedades y quimiocultivares.
- 6) Los procesos de recolección y tratamiento postcosecha (dsecación, almacenamiento, etc.) así como los procesos de extracción pueden también tener una influencia importante en la calidad.

El control de calidad de las drogas vegetales y derivados, pretende garantizar su identidad, pureza (ausencia de contaminantes, sustituciones o adulteraciones) y contenido en principios activos y/o marcadores (Cañigüeral y Vila, 2005).

Para asegurar la calidad de medicamentos herbolarios licenciados, es esencial, no solamente establecer la identidad botánica del producto herbolario, sino también asegurar la reproducibilidad lote por lote. Así, además de la evaluación botánica macroscópica y microscópica, los ensayos de identidad química son necesarios. En estos se incluyen reacciones características y técnicas cromatográficas. Estas últimas son las más utilizadas, desde la cromatografía en capa delgada (CCD), la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) y hasta la cromatografía de gases (CG), que se utiliza en plantas que contienen compuestos volátiles. Aunque uno de los objetivos de estas pruebas es confirmar la presencia de principios activos, es frecuente que no se haya establecido la naturaleza del principio activo. En tales casos, las pruebas químicas y cromatográficas, solamente ayudan a identificar algunos constituyentes designados como marcadores y que sirven como “huella dactilar” para la planta (Kunle *et al.*, 2012).

Para comprobar la identidad y la pureza se deben considerar criterios como el tipo de preparación, las propiedades sensoriales, las constantes físicas, la adulteración, los contaminantes, la humedad, el contenido de cenizas y los residuos de disolventes. Como se mencionó anteriormente, la identidad se puede lograr mediante exámenes macro y microscópicos, sin embargo, es necesario prestar atención a los brotes de enfermedades entre las plantas, ya que pueden provocar cambios en la apariencia física de la planta y llevar a una identificación incorrecta (De Smet, 1999).

La pureza está estrechamente vinculada con el uso seguro de los fármacos y se ocupa de factores como contaminantes (materia extraña en forma de otras hierbas), metales pesados, radiactividad, presencia de micotoxinas, contaminación microbiológica, pesticidas y hasta exceso de humedad (Kunle *et al.*, 2012).

Las pruebas de composición o valoración consisten en la cuantificación de los principios activos, si estos son conocidos, o de los marcadores en las drogas crudas y/o preparados herbolarios con la finalidad de garantizar la obtención de extractos estandarizados y cuantificados.

Para los análisis de valoración, se utiliza una amplia gama de métodos modernos de análisis químicos como la espectroscopia ultravioleta / visible (UV/VIS), CCD, cromatografía de líquidos de ultra eficiencia (CLUE), espectrometría de masas (EM), resonancia magnética nuclear (RMN) y una combinación de CG y EM (CG-EM), entre otros (Watson, 1999).

1.6. Generalidades de nocicepción.

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés) define al dolor como “una experiencia sensitiva y emocional desagradable, asociada a una lesión tisular real o potencial”, mientras que la nocicepción es definida como “los procesos neuronales de codificación y procesamiento de estímulos nocivos”. De tal manera que la nocicepción incluye los mecanismos por los cuales los estímulos nocivos son detectados por el sistema nervioso periférico, codificados, transferidos y tratados inconscientemente por el sistema nervioso. La nocicepción también incluye parte de la información analizada por el cerebro, así como algunas respuestas reflejas para proteger el organismo. En contraste, el dolor es una experiencia consciente que requiere el tratamiento cortical y la interpretación aversiva de la información nociceptiva (Barrot, 2012).

De acuerdo con Puebla (2005), el dolor puede clasificarse según su duración, curso, intensidad, farmacología, patogenia y localización, estos dos últimos parámetros son descritos por Thai y Faisinger (2011), los cuales dividen al dolor conforme a su patogenia en tres categorías: nociceptivo, neuropático o mixto. El dolor nociceptivo es aquel causado por la activación de las fibras nociceptivas debido a la destrucción del tejido físico o por procesos químicos, térmicos o mecánicos. Mientras que el dolor neuropático es frecuentemente descrito como ardor y a menudo se irradia a lo largo de los nervios o raíces nerviosas. También puede asociarse con disestesia (entumecimiento y hormigueo), hiperalgesia (respuesta exagerada a un estímulo doloroso), dolor lancinante y alodinia (dolor experimentado por un estímulo que normalmente no produce dolor). Con respecto a la localización, el dolor se clasifica en

somático y visceral, el dolor somático puede resultar de una lesión en la piel, músculo, tejido blando o hueso. Por lo general, está bien localizado, puede ser constante o intermitente y a menudo se describe como un dolor persistente que puede agudizarse con el movimiento. El dolor visceral suele estar mal localizado, es constante y puede remitirse.

1.7. Neurofisiología de la nocicepción.

Desde el punto de vista neurofisiológico, la nocicepción inicia periféricamente en tejidos donde una población celular lesionada de cualquier forma, genera una modificación en el microambiente de los receptores periféricos del dolor (nociceptores, localizados en piel, músculo, esqueleto y vísceras). Esta modificación desencadena una compleja secuencia de eventos que engloban al aferente primario, ganglio de la raíz posterior, asta dorsal medular y al resto de la vía nociceptiva (Eblen-Zajjur, 2005).

Los nociceptores son receptores complejos activados por diversas sustancias endógenas que originan potenciales receptores que son traducidos en potenciales de acción, conducidos por fibras nerviosas (fibras A- δ y fibras C) en dirección central hasta contactar con las neuronas de segundo orden. Histológicamente son terminaciones periféricas de las neuronas bipolares que tienen su soma en los ganglios raquídeos y cuyo axón centrípeto penetra en el asta dorsal de la médula espinal. La activación de los nociceptores puede realizarse directamente, pero normalmente se realiza a través de diversos mediadores que ejercen una acción excitatoria o inhibitoria de las terminaciones nerviosas aferentes, actuando sobre receptores específicos o en los canales iónicos de la membrana. El resultado final es la modificación de la permeabilidad iónica y la génesis de impulsos que viajan al SNC (Romera *et al.*, 2000).

Un estímulo nervioso o lesión tisular es capaz de inducir la producción de una gran cantidad de mediadores proinflamatorios, cuyo efecto se traduce en la despolarización de la membrana neuronal a través de diversos mecanismos. Estos mediadores implican a sustancias como la bradicinina (BK), citocinas, eicosanoides, neurotransmisores [serotonina (5-HT), noradrenalina], los iones potasio (K^+) e

hidrógeno (H⁺), el ácido láctico, la histamina (HT), diversos péptidos [la sustancia P (SP), opioides], y ciertas sustancias como las prostaglandinas (PG) y los leucotrienos que disminuyen la activación de los nociceptores. La SP, la BK, las PG, la histamina (HT) los hidrogeniones y el ATP son capaces de activar los nociceptores a través de la fosfolipasa C (PLC) (enzima que cataliza la hidrólisis de polifosfatidilinositol en inositol trifosfato y diacilglicerol), con lo que se incrementa la concentración de calcio intracelular, reduciendo la permeabilidad de la membrana al ion potasio con su consecuente despolarización. Algunos de estos mediadores como la HT, PG, junto a la 5-HT y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) también son capaces de despolarizar la membrana, al incrementar la actividad de la adenilato ciclasa y, con ello, los niveles de AMPc intracelular (Eblen-Zajjur, 2005).

1.8. Modelos animales para estudios de nocicepción.

Al igual que en los animales, los humanos infieren el dolor con base en su comportamiento, sin embargo, debido a que el ser humano tiene el comportamiento único del habla, puede hacer uso de interrogatorios psicológicos y sociológicos, lo cual provee acceso directo y relativamente rápido a la experiencia subjetiva a través de clasificaciones y descriptores. Entonces, la definición comúnmente utilizada de dolor humano no se puede aplicar directamente a los animales, porque se basa en saber cómo se sienten los animales o exigirles que nos comuniquen sus experiencias subjetivas. La capacidad de los sujetos humanos para reflexionar sobre su experiencia subjetiva tiene una ventaja considerable cuando se investigan condiciones de dolor crónico que no tienen una causa obvia, o cuando el dolor supera lo que se espera típicamente de una causa dada (Sneddon *et al.*, 2014; Mogil *et al.*, 2010).

Técnicamente, los modelos animales ofrecen una caracterización extremadamente fina de la neuroquímica y la anatomía, de igual forma cuentan con una mejor seguridad, economía y estandarización de antecedentes genéticos y ambientales en comparación con los sujetos humanos (Mogil *et al.*, 2010).

Las pruebas nociceptivas usan estímulos térmicos, eléctricos, mecánicos o químicos (Le Bars *et al.*, 2001). Algunos de ellos se basan en la latencia de la aparición de un comportamiento de evitación, generalmente un reflejo de retirada de la pata o la cola. En este caso el estímulo puede considerarse como fijo. Las pruebas correspondientes que utilizan la estimulación térmica incluyen la prueba de retirada de la cola, las pruebas de placa caliente o fría y la prueba de retirada de la pata de calor radiante. Las pruebas de nocicepción también pueden depender del umbral de estímulo necesario para provocar un comportamiento de evitación. En este caso, el estímulo es variable, con un aumento de valor, o la prueba puede usar estímulos incrementales sucesivos a un valor fijo. Estas pruebas se refieren a la estimulación mecánica e incluyen los filamentos de Von Frey, la prueba de Randal-Seitto y las pruebas recientes basadas en medidores de tensión sostenidos por fórceps o dedos. Los umbrales eléctricos también se estudian, particularmente como control para otros experimentos de comportamiento. Por último, algunas pruebas nociceptivas pueden basarse en la observación y puntuación de comportamiento específicos. Este es el caso de las pruebas que usan estímulos químicos inflamatorios o irritantes. En ellas se pueden utilizar diferentes agentes químicos irritantes como estímulos nociceptivos para evaluar el dolor y evaluar preclínicamente los fármacos analgésicos. El procedimiento más utilizado es el ensayo de la formalina en roedores; en este un producto de prueba actúa principalmente a través del receptor transitorio potencial ankyrin 1, un miembro de la familia del receptor transitorio de canales iónicos. El compuesto se puede inyectar por vía intradérmica en la superficie dorsal o plantar de una pata delantera o pata trasera, lo que da como resultado la retirada, lamida, mordida o el temblor de la pata; estos resultados son cuantificables. En roedores, la inyección de formalina produce una reacción de comportamiento bifásico, con una fase inicial dentro de los primeros minutos posteriores a la inyección, seguida de un periodo de reposo alrededor de 10 min y una segunda fase de comportamientos nociceptivos que duran de 20 a 40 min. La primera fase está relacionada a la estimulación directa de los nociceptores y es sensible a los anestésicos locales, mientras que la segunda fase involucra mecanismos inflamatorios y sensibilización central dentro del asta dorsal. Esta segunda fase responde a varios fármacos de acción analgésica clínica establecida,

como los opiáceos, los analgésicos antiinflamatorios esteroides o no esteroideos, los antagonistas de N-metil-D-aspartato o la gabapentina (Barrot, 2012).

1.9. Las Plantas Medicinales y el Dolor en México.

El dolor ha sido globalmente una causa común de consulta médica. Una de las formas para contrarrestarlo es con el uso de plantas medicinales, las cuales se han empleado a lo largo de la historia. En México, se tiene conocimiento de que los mayas utilizaban el estramonio (*Datura stramonium*), durante el parto para disminuir o encubrir el dolor (Pérez-Cajaraville *et al.* 2005). Otra especie medicinal del mismo género es *Datura inoxia*, conocida comúnmente como toloache, el uso de sus hojas en forma de cataplasma está indicado en el Códice de la Cruz-Badiano para reducir el dolor y la hinchazón. En el norte de México y en los estados de Sonora, Oaxaca y Quintana Roo, se utiliza para el tratamiento del dolor reumático. *Oenothera rosea* conocida como hierba del golpe también es utilizada en la herbolaria mexicana para el tratamiento del dolor. Sus hojas, tallo y ramas se utilizan en forma de cataplasma o infusión en administraciones tópica y oral, respectivamente (Martínez, 2015). Otra especie ampliamente utilizada en México es *Heterotheca inuloides*, también llamada árnica, esta planta es útil para curar la inflamación y el dolor. En estudios preclínicos con modelos experimentales de dolor e inflamación en ratas se ha demostrado que los efectos analgésicos y antiinflamatorios de esta especie se deben a la presencia de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina, un sesquiterpeno aislado del extracto hexánico de las inflorescencias de la planta. Dicho estudio refuerza el uso como analgésico de las inflorescencias de esta especie en la medicina tradicional mexicana (Rocha-González *et al.*, 2010). Así como estos ejemplos, en México existen diversas especies vegetales utilizadas para el tratamiento del dolor, esencialmente para el alivio del dolor de tipo muscular y reumático, ya que otros tipos son secundarios a patologías como gastroenteritis, cistitis, etc. Recientemente se analizó el uso de plantas analgésicas en el estado de Morelos, la mayoría de estas especies son nativas de México, sin embargo, un importante número son introducidas (Castillo-España *et al.*, 2015). Por lo tanto, a pesar del amplio número de especies medicinales conocidas, pocas se han

estudiado farmacológica y toxicológicamente para validar con evidencias científicas su uso y seguridad en la medicina tradicional mexicana.

2. OBJETIVOS.

2.1. Objetivo general.

Establecer las pruebas de identidad química, eficacia contra el dolor y seguridad a nivel preclínico de las drogas crudas de *Cunila lythrifolia* y *Clinopodium macrostemum*, con la finalidad de generar parte de la información científica necesaria para integrar su monografía farmacopeica y tipo OMS. El establecimiento de estas pruebas, permitirá obtener los criterios que diferencien las dos especies.

2.2. Objetivos particulares.

- a) Establecer la toxicidad aguda de los preparados tradicionales de ambas especies mediante el protocolo establecido por Lorke, con la finalidad de obtener información acerca de su seguridad preclínica

- b) Obtener los perfiles cromatográficos de la decocción y el aceite esencial de las plantas mediante la aplicación de técnicas cromatográficas incluyendo la CCD, CLAR y la CG-EM, respectivamente. Esta información permitirá establecer parte importante de las pruebas de identidad de ambas plantas.

- c) Establecer el potencial antinociceptivo de los preparados tradicionales utilizando el modelo de la formalina en ratones para así contribuir al establecimiento de la eficacia preclínica de las especies.

3. METODOLOGÍA.

3.1. Material vegetal.

El material vegetal (partes aéreas) de *C. lythrifolia* (Lamiaceae) fue adquirido el 2 de noviembre de 2017, el 22 de enero de 2018 y el 22 de mayo del 2018 (lotes I, II y III, respectivamente) en el Mercado de la Bola, Delegación Coyoacán de la Ciudad de México. Mientras tanto, las partes aéreas de *C. macrostemum* (Lamiaceae) fueron recolectadas el 21 de Julio de 2017 en Teococuilco de Marcos Pérez, Ixtlán, Oaxaca (Lote I), el 30 de marzo de 2018 (lote II) y el 8 de agosto de 2018 (lote III) en San Juan del Estado, Etlá, Oaxaca. Las partes aéreas de ambas especies se secaron y posteriormente se trituraron en un molino de cuchillas Thomas Wiley Modelo 4. Las muestras de referencia se depositaron en el Herbario Nacional de México (MEXU) con los números de voucher 1468647 (*C. lythrifolia*) y 1503393 (*C. macrostemum*).

3.2. Preparación del extracto acuoso.

La preparación del extracto acuoso se llevó a cabo con el lote II de ambas especies y se realizó mediante la decocción de las partes aéreas (Martínez, 1989). Para ello, se colocaron 25 g del material vegetal seco y molido en contacto con 250 mL de agua destilada, posteriormente, se calentó hasta su punto de ebullición durante 30 min, el extracto resultante se dejó reposar 5 min. Una vez transcurrido el tiempo, el preparado se filtró para descartar el material vegetal. La decocción resultante se concentró a sequedad utilizando un rotaevaporador (BUCHI R-II-HB) adaptado a una bomba de vacío (BUCHI-V-710). El rendimiento del extracto acuoso total de *C. lythrifolia* fue de 19.25% (19.25 mg/ g de droga cruda) y 20.16% (20.16 mg/ g de droga cruda) para *C. macrostemum*. Este proceso se repitió cuantas veces fue necesario para obtener la cantidad adecuada para la realización de los ensayos farmacológicos.

3.3. Obtención de las fracciones orgánicas del extracto acuoso.

El fraccionamiento del extracto acuoso se llevó a cabo mediante un método de reparto. Para lo cual se realizó la decocción como se describe en la sección 3.2. Inmediatamente después de filtrar la decocción, ésta se colocó en un embudo de separación de 500 mL y se agregaron 50 mL de hexano. El embudo se agitó vigorosamente para mezclarlos y posteriormente se dejó reposar hasta la separación de las dos fases. La fracción orgánica se recuperó en un matraz. Este proceso se realizó en tres ocasiones. Las fases orgánicas se combinaron, se filtraron sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentraron a vacío en un rotaevaporador. Posteriormente la fase acuosa restante se utilizó para un fraccionamiento con CH_2Cl_2 , el cual se obtuvo de la misma manera anteriormente descrita (3 x 50 mL) y finalmente a la fase acuosa restante del fraccionamiento con CH_2Cl_2 se le realizó un fraccionamiento con AcOEt (3 x 50 mL). Las tres fracciones orgánicas se analizaron por CLAE.

3.4. Preparación del aceite esencial.

El aceite esencial de la planta fue extraído de las partes aéreas frescas y fraccionadas (200 g) mediante hidrodestilación por 5 h. El material destilado fue particionado con diclorometano (2 x 100 mL). Las fracciones orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentraron a vacío. El aceite se almacenó en viales ámbar a 4 °C hasta su análisis por CG-EM. Esta metodología se repitió para los tres lotes.

3.5. Análisis de los compuestos volátiles presentes en los extractos acuosos de los poleos.

El lote II de ambos poleos se utilizó para el estudio de los componentes volátiles presentes en los extractos acuosos de *C. lythrifolia* y *C. macrostemum*. En primera instancia se realizó la decocción como se describe en la sección 3.2, posteriormente el extracto acuoso fue sometido a un proceso de hidrodestilación durante 1 hora, para así obtener una esencia con los compuestos volátiles. El material destilado se

particionó con diclorometano (2 x 100 mL), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a vacío. Se almacenó en viales ambar a 4 °C hasta su análisis por CG-EM.

3.6. Instrumentación y condiciones cromatográficas.

El aceite esencial se analizó por CG-EM en un cromatógrafo de gases de la serie Agilent 6890N acoplado con un detector de masas con tiempo de vuelo LECO (MS-TOF, Agilent Technology, Santa Clara, CA) con un voltaje de ionización de 70 eV y equipado con una columna capilar DB-5 de sílice fundida no polar (10 m x 0.18 mm; grosor de película 0.18 µm, Agilent HP). Las condiciones de operación fueron las siguientes: el inyector funcionó en modo Split (relación 20:1) y las temperaturas de la línea de transferencia del espectrómetro de masas se fijaron a 200 y 300 °C, respectivamente; la temperatura del horno subió gradualmente de 40 a 260 °C a una velocidad de calentamiento de 4°C/ min, siguiendo con 260°C durante 20 min, y finalmente hasta 340°C, a una velocidad de calentamiento de 4°C/ min durante 20 min isotérmicamente; la temperatura del inyector se fijó a 300 °C. El gas portador (He) se ajustó a un flujo de 1 mL/ min. Los compuestos se identificaron mediante la comparación de sus datos espectrales de masas con los de la Biblioteca de espectros de masas NIST 98 y la biblioteca del equipo, así como mediante la comparación de sus índices de retención en relación con una serie homóloga de n-alcanos C₈-C₂₀ calculados de acuerdo a Van Den Dool y Kratz (1963) y con los valores de literatura (Adams, 2007). Los análisis fueron realizados por triplicado y las cantidades relativas de los componentes individuales se calcularon en función de las áreas de sus picos de CG, sin corrección del factor de respuesta.

Los perfiles cromatográficos de las fracciones orgánicas de los extractos acuosos se obtuvieron con un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia de marca Waters equipado con una bomba cuaternaria Waters 600, un inyector manual, un horno para columna y un detector dual Waters 2487 cuyas longitudes de onda fueron 210 nm y 254 nm. El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y manipulación de la información se efectuaron utilizando el programa Empower 2. Todos los análisis

se realizaron en una columna XBridgeShieldRP18 (5 μ m x 4.6 x 250 mm). El volumen de inyección fue de 3 μ L, el gradiente de elución de ACN (A) y H₂O (B) se llevó a cabo como se muestra en la tabla 1, con un flujo de 1 mL/min.

Tabla 1. Gradiente de elución utilizado para el desarrollo de los perfiles cromatográficos.

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0	20	80
40	100	0
60	20	80

3.7. Análisis de microextracción en fase sólida (MEFS).

Los compuestos volátiles en *C. lythrifolia* y *C. macrostemum* se separaron e identificaron utilizando MEFS (Pawliszyn, 1977). Para este análisis se utilizaron fibras recubiertas con CAR/DVB/PDMS de un cm. Las fibras se acondicionaron en un puerto de inyección del cromatógrafo de gases a 250 °C por 2 h, antes de su uso. El procedimiento de extracción se realizó de acuerdo a lo descrito por Ovalle-Magallanes y colaboradores (2014), de la siguiente manera: las fases de la muestra que contenían material seco (30 mg), cloruro de sodio (7.5 mg) y agua destilada (5 mL) se colocaron en viales adecuados; luego, las agujas que contenía la fibra del dispositivo de MEFS se introdujeron a través del septum de los viales y se dejó durante 5 min a temperatura ambiente. Después de la toma de muestra, la desorción de los analitos se hizo térmicamente en el cromatógrafo; posteriormente se analizaron utilizando las condiciones de CG descritas. Todos los análisis se realizaron por triplicado y se utilizaron las partes aéreas secas y molidas del lote II.

3.8. Estudios farmacológicos *in vivo*.

Para la experimentación en animales se utilizaron ratones machos de la cepa ICR, con edad entre 3-4 semanas (25-30 g) que se obtuvieron a través del Centro UNAM-

ENVIGO (ENVIGO RMS, S.A. De C.V.) Los animales de experimentación se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio, con temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), ciclo de luz y oscuridad de 12 h, con acceso a alimento estándar y agua simple *ad libitum*, y un 70-80% de humedad relativa. Todos los protocolos experimentales se realizaron de acuerdo con los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Manipulación de Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999), con los lineamientos internacionales para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NIH, 2011) y de acuerdo a los protocolos experimentales aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química, UNAM: FQ/CICUAL/235/17 (modelo murino para establecer la toxicidad aguda de extractos vegetales y productos naturales de acuerdo al método de Lorke).

3.8.1. Preparación y administración de las muestras.

Todas las muestras se prepararon en suspensión utilizando como vehículo una solución salina isotónica (NaCl 0.9%, SSI) con 0.05% de Tween 80. La administración se realizó vía oral (*p.o.*) mediante sondas de acero inoxidable a razón de 0.2 mL/ 10 g de peso de animal. En la evaluación del potencial antinociceptivo, la formalina se administró vía subcutánea (*s.c.*) en el dorso de la extremidad posterior derecha del animal. La formalina se administró con jeringas hipodérmicas de 0.5 mL (31G x 8 mm) en volumen de 30 μL por pata.

3.8.2. Determinación de la toxicidad aguda en ratones.

Para establecer la toxicidad aguda de los extractos acuosos de *C. lythrifolia* y *C. macrostemum* se aplicó el protocolo descrito por Lorke (1983). Los tratamientos se administraron vía oral (*p.o.*) en dos etapas independientes, para cada una se utilizaron doce ratones divididos en cuatro grupos ($n=3$). En la primera, el extracto acuoso se administró a dosis de 10, 100 y 1000 mg/kg, mientras que en la segunda etapa se administraron dosis de 1600, 2900 y 5000 mg/kg. En cada etapa se tuvo un grupo

control el cual se administró únicamente con vehículo (SSI con 0.05 % de Tween 80). Después de cada administración, se observó a los animales cuidadosamente durante 1 h para detectar signos y síntomas de toxicidad aguda de acuerdo a las características presentes en el test de Irwin (Roux *et al.*, 2004), o bien para registrar el número de muertes. Durante catorce días posteriores a la administración se registraron diariamente los pesos de todos los animales. Al término de este periodo, se sacrificó a los animales sobrevivientes por dislocación cervical y se realizó la disección de los mismos para realizar un análisis macroscópico de los órganos internos (Corazón, hígado, riñones, pulmones y estómago) en busca de lesiones. El cálculo de la dosis letal media (DL₅₀) se realizó a partir de la media geométrica entre la dosis más baja en donde se presentó la muerte de un animal y la dosis en la que no se presentó muerte; en caso en el que no se presente la muerte de algún animal de experimentación en ninguna de las dosis ensayadas, se considera que la DL₅₀ es mayor a 5 g/kg de peso corporal del animal (Lorke, 1983).

3.8.3. Evaluación del potencial antinociceptivo mediante el modelo de la formalina.

Los ratones se sometieron a un proceso de acondicionamiento para lo cual se colocaron de manera individual dentro de cilindros de acrílico de 20 cm de diámetro x 40 cm de altura, a temperatura constante de 25 °C, durante 30 min. Los tratamientos fueron administrados por vía oral (*p.o.*) en dosis de 31.6, 100 y 316.2 mg/kg, en un volumen de 0.2 mL/ 10 g de peso corporal; mientras que el grupo vehículo recibió únicamente solución salina con 0.05% de Tween 80. Como agente nociceptivo se empleó una solución de formalina al 2% (preparado a partir de una solución de formaldehído al 37% en agua inyectable). Luego de 30 min de la administración de los tratamientos, se aplicaron 30 µL de la solución de formalina de forma subcutánea en el dorso de la extremidad posterior derecha del ratón. La respuesta bifásica inducida por la formalina (lamer la pata administrada), se cuantificó en intervalos de 5 min durante media hora (Tjolsen *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 2012) utilizando espejos de 40 x 40 cm detrás de los cilindros de acrílico para facilitar la observación. Como fármaco de

referencia se utilizó diclofenaco (DIC) a dosis de 50 mg/kg por vía oral (*p.o.*). Todos los grupos administrados (VEH, DIC, y tratamientos) fueron de ocho animales (n=8). Los animales se sacrificaron luego de concluir el procedimiento experimental y se calculó el área bajo la curva del curso temporal para la fase 1 y 2, y el área bajo la curva total.

3.8.4. Análisis estadístico.

Los datos se expresaron como el promedio \pm el error estándar de la media (EEM). La estimación de la diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos se calculó mediante un análisis de varianza (ANADEVA) de dos vías seguido de un análisis *post hoc* de Bonferroni; o alternativamente mediante un ANADEVA de una vía seguido de un análisis *post hoc* de Dunnett comparando con el grupo vehículo. El porcentaje de efecto antinociceptivo fue calculado a partir de los diferentes tratamientos en relación ABC del vehículo. Para el cálculo de las diferencias estadísticas se utilizó el programa GraphPad Prism (versión 7.0, GraphPad Inc., E.U.A.).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Las especies aromáticas *Cunila lythrifolia* y *Clinopodium macrostemum*, conocidas comúnmente como poleos, son plantas medicinales utilizadas popularmente en México como agentes analgésicos en casos de afecciones gastrointestinales, aunque no exclusivamente, (Argueta, 1994). A pesar de su amplio uso, no existe información documentada que permita justificar la calidad, inocuidad, y eficacia de estas especies. Por tal motivo, el presente proyecto de investigación pretende establecer algunas pruebas preclínicas preliminares de eficacia e inocuidad, así como establecer algunos parámetros de identidad de las drogas crudas de *C. lythrifolia* y *C. macrostemum* con la finalidad de generar parte de la información científica necesaria para integrar sus monografías tipo OMS y farmacopeica. El establecimiento de estas pruebas, en conjunto con otras pruebas de eficacia y composición que se realicen en el futuro, permitirá el uso racional de estos recursos naturales.

Los resultados generados se discutirán en dos secciones principales. En la primera, se abordará lo relacionado a inocuidad y eficacia, discutiendo primero los resultados de toxicidad aguda y posteriormente el potencial antinociceptivo de las especies. En la segunda parte, se compararán los resultados concernientes al análisis de los compuestos volátiles obtenidos del aceite esencial, de la decocción y por microextracción en fase sólida (MEFS) de ambos poleos. El análisis de los volátiles se realizó mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM).

4.1. Evaluación farmacológica de la inocuidad y eficacia.

4.1.1. Inocuidad.

Muchos productos herbolarios utilizados durante largo tiempo pueden provocar daños toxicológicos crónicos inadvertidos. Al realizar la investigación bibliográfica sobre los antecedentes toxicológicos de los dos poleos no se encontró descripción alguna sobre posibles efectos tóxicos. No obstante, fue posible documentar su utilización tradicional por más de cien años (Martínez, 1989).

Con base en estos antecedentes se determinó la toxicidad aguda de los preparados tradicionales de los poleos mediante la metodología establecida por Lorke (1983). Los resultados de esta prueba indican que ambos preparados no son tóxicos para ratones ya que los mismos no sufrieron cambios en su comportamiento, tampoco padecieron modificaciones de peso corporal, ni hubo decesos. De forma complementaria, el examen macroscópico de los órganos internos no reveló signos (formación de coágulos, tumoración, manchas) de toxicidad aguda. Los resultados permiten concluir que la DL₅₀ de las tisanas es mayor a 5 g/kg (Tabla 2), y que éstas no provocan efectos tóxicos agudos en roedores. Para completar estos estudios será necesario realizar estudios preclínicos de genotoxicidad, y toxicidad subcrónica y crónica.

Tabla 2. Toxicidad aguda de los extractos acuosos de *C. lythrifolia* y *C. macrostemum*

Dosis (mg/Kg)	Primera fase		Segunda fase	
	Mortalidad		Mortalidad	
	<i>C. lythrifolia</i>	<i>C. macrostemum</i>	<i>C. lythrifolia</i>	<i>C. macrostemum</i>
10	0/3	0/3	1600	0/3
100	0/3	0/3	2900	0/3
1000	0/3	0/3	5000	0/3

4.1.2. Evaluación del potencial antinociceptivo.

La evaluación del potencial antinociceptivo se realizó mediante la aplicación de la prueba de la formalina. La inyección de formalina en la pata del ratón produce una respuesta dolorosa bifásica (lamida o mordisqueo), la primera fase, de corta duración, se debe a la activación de los nociceptores de la pata; y la segunda (10-50 minutos después de la inyección) se debe a una respuesta inflamatoria con sensibilización de las neuronas nociceptoras de la médula espinal (Lee *et al.*, 2011). Como control positivo se utilizó el diclofenaco (DIC). Este fármaco es un antiinflamatorio no

esteroideo (AINE) que actúa como inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa (COX), disminuyendo la producción de prostaglandinas E₂ (PGE₂) y tromboxanos. A pesar de ser el principal mecanismo de acción del DIC, sus actividades antiinflamatorias y analgésicas involucran otros mecanismos periféricos y centrales incluyendo la vía L-arginina / óxido nítrico (NO) / monofosfato cíclico de la guanosina (GMPc) (Tonussi y Ferreira, 1994), el incremento de β -endorfinas (un opioide endógeno) en plasma, la activación de los receptores gamma activados por el factor proliferador de peroxisomas (PPAR γ), la reducción de la sustancia P, y finalmente, la disminución de IL-6 y el aumento de los niveles de IL-10 (Torres-López *et al.*, 2002; Atzeni *et al.*, 2018).

Los resultados obtenidos de la evaluación de la decocción de *C. lythrifolia* mediante el ensayo de la formalina indican su actividad antinociceptiva; el tiempo de lamida (s) de los ratones administrados con las dosis de 100 y 316 mg/kg del preparado se redujo significativamente como se puede observar en las gráficas del curso temporal (Figura 11) y del área bajo la curva (ABC, Figura 12A). El efecto antinociceptivo del extracto acuoso se mantuvo en las dos fases. En la fase 1 (Figura 12B) el mejor efecto se observó a la dosis de 316 mg/kg, en tanto que en la fase 2 con la de 100 mg/kg (Figura 12C).

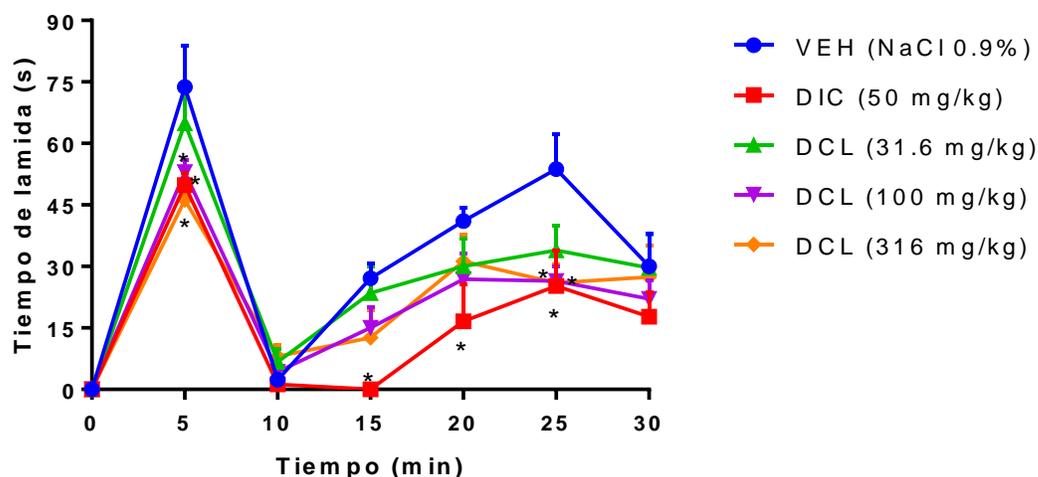


Figura 11. Curso temporal del efecto antinociceptivo del extracto acuoso de *C. lythrifolia* (DCL) lote II en el modelo de la formalina en ratones. VEH: vehículo (SSI 0.9%). DIC: diclofenaco (50 mg/kg). Cada medida representa el promedio \pm el EEM con $n=6-8$. * = $p < 0.05$, prueba estadística: ANADEVa de dos vías con una prueba *post-hoc* de Bonferroni

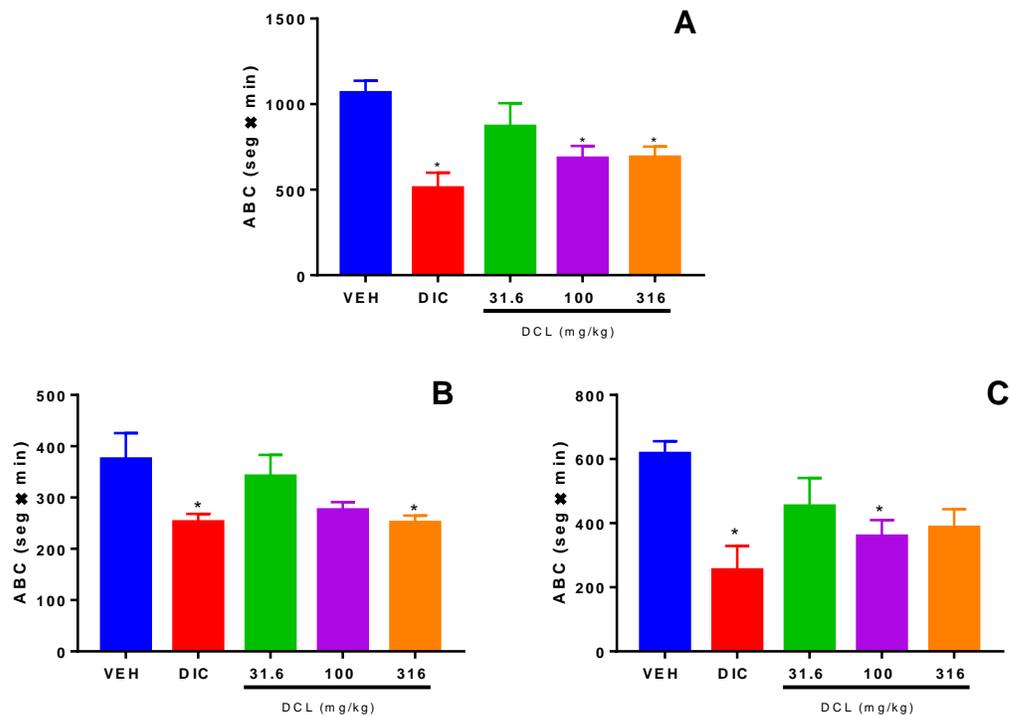


Figura 12. Efecto antinociceptivo del extracto acuoso de *C. lythrifolia* (DCL) lote II en el modelo de la formalina en ratones. VEH: vehículo (SSI 0.9%). DIC: diclofenaco (50 mg/kg, *p.o.*). **A.** Gráfico de ABC total (s x min) del tiempo de lamida. **B.** Gráfico del ABC de la fase 1. **C.** Gráfico del ABC de la fase 2. Cada barra es el promedio \pm el EEM con $n=6-8$. * = $p < 0.05$, prueba estadística: ANADEVIA de una vía con una prueba *post-hoc* Dunnett.

Por otra parte, el preparado de *C. macrostemum* también presentó actividad antinociceptiva, significativa en la segunda fase (inflamatoria) a la dosis de 316 mg/kg (Figuras 14B y 14C).

En conjunto estos resultados sugieren que los extractos acuosos de los poleos ejercen un efecto antinociceptivo por medio de mecanismos de acción diferentes. *C. lythrifolia* fue más activo contra el dolor de tipo neurogénico, el cual se relaciona directamente a la estimulación de nociceptores, mientras que *C. macrostemum* fue mejor contra el dolor inflamatorio mediado por mecanismos inflamatorios y sensibilización central dentro del asta dorsal (Tjolsen *et al.*, 1992).

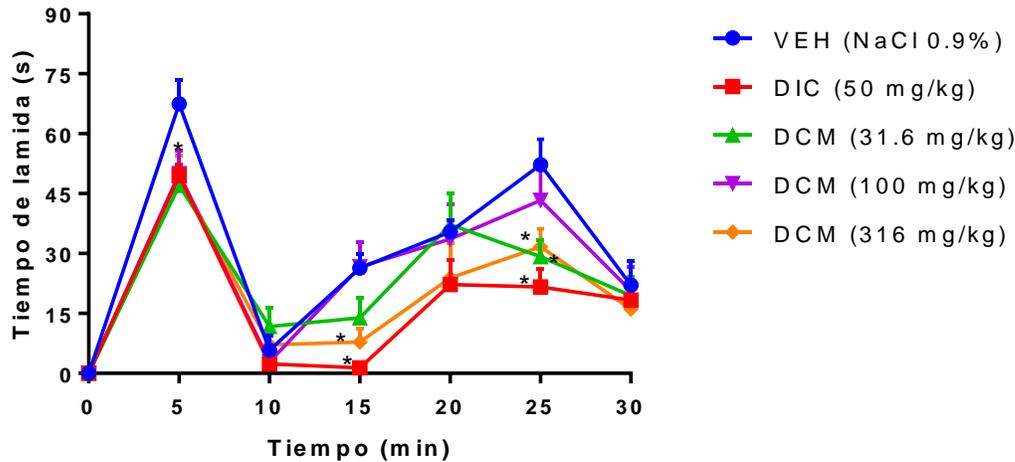


Figura 13. Curso temporal del efecto antinociceptivo del extracto acuoso de *C. macrostemum* (DCM) lote II en el modelo de la formalina en ratones. VEH: vehículo (SSI 0.9%). DIC: diclofenaco (50 mg/kg). Cada medición representa el promedio \pm el EEM con $n=6-8$. * = $p < 0.05$, prueba estadística: ANADEVa de dos vías con una prueba *post-hoc* de Bonferroni

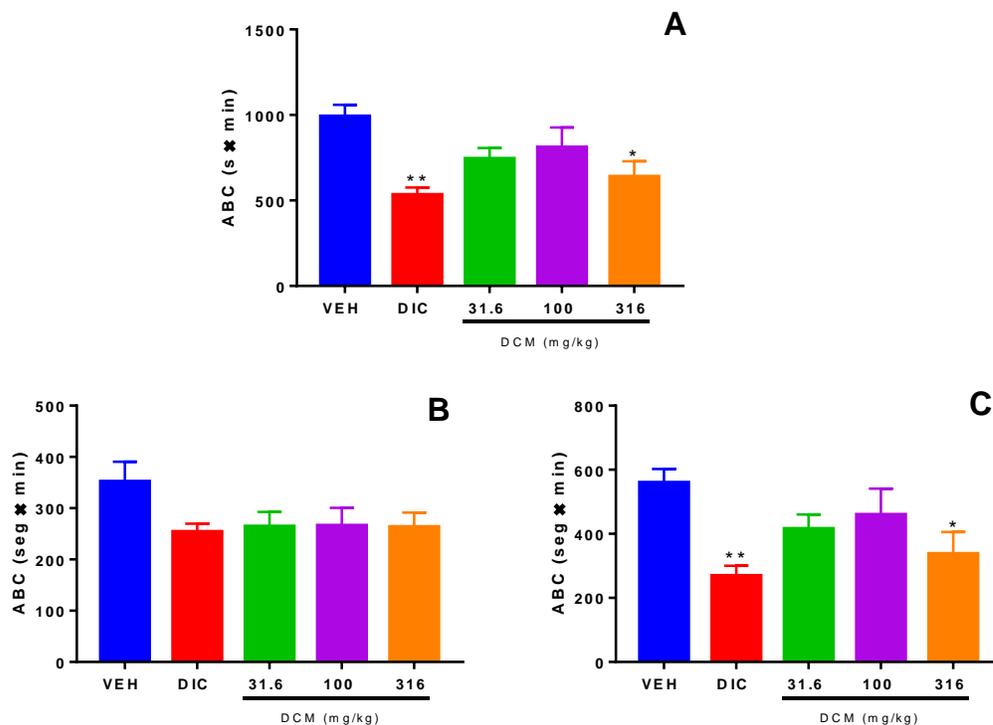


Figura 14. Efecto antinociceptivo del extracto acuoso de *C. macrostemum* (DCM) lote II en el modelo de la formalina en ratones. VEH: vehículo (SSI 0.9%). DIC: diclofenaco (50 mg/kg, *p.o.*). **A.** Gráfico de ABC total (s x min) del tiempo de lamida. **B.** Gráfico del ABC de la fase 1. **C.** Gráfico del ABC de la fase 2. Cada barra es el promedio \pm el EEM con $n=6-8$. * = $p < 0.05$, prueba estadística: ANADEVa de una vía con una prueba *post-hoc* Dunnett.

Otras especies de *Clinopodium* han demostrado efecto antinociceptivo. Así, el aceite esencial y la fracción polifenólica de *C. hortense* presentaron efecto antinociceptivo durante la segunda fase (inflamatoria) en el modelo de la formalina (Hajhashemi *et al.*, 2002). Los preparados de *C. thymbra* presentaron efecto en ambas fases del ensayo (Karabay-Yavasoglu *et al.*, 2006). En el caso del género *Cunila* no existen antecedentes sobre el efecto antinociceptivo de especie alguna.

Un vez, que se estableció el potencial antinociceptivo de ambas especies, se procedió a establecer los perfiles cromatográficos de las fracciones orgánicas obtenidas por un proceso de reparto de cada una de las tisanas de los dos poleos con hexano, diclorometano y acetato de etilo. Los perfiles de las fracciones orgánicas se indican en los cromatogramas de las Figuras 15-17.

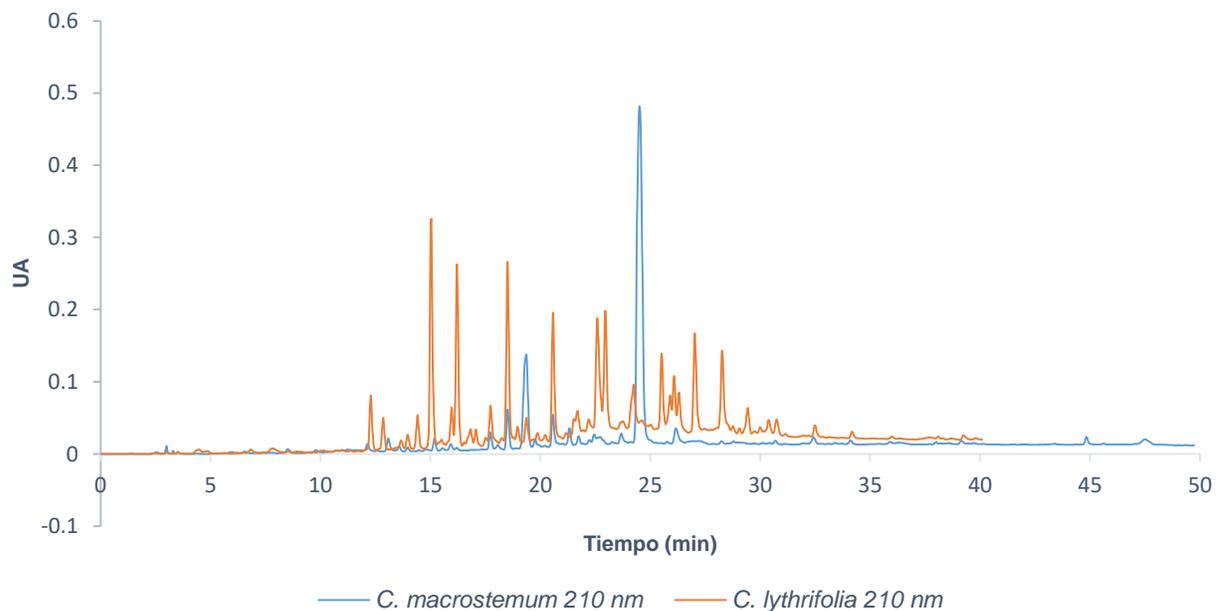


Figura 15. Cromatogramas de la fracción de hexano del extracto acuoso de *C. macrostemum* y *C. lythrifolia*. Las condiciones se indican en la sección de Metodología 3.6.

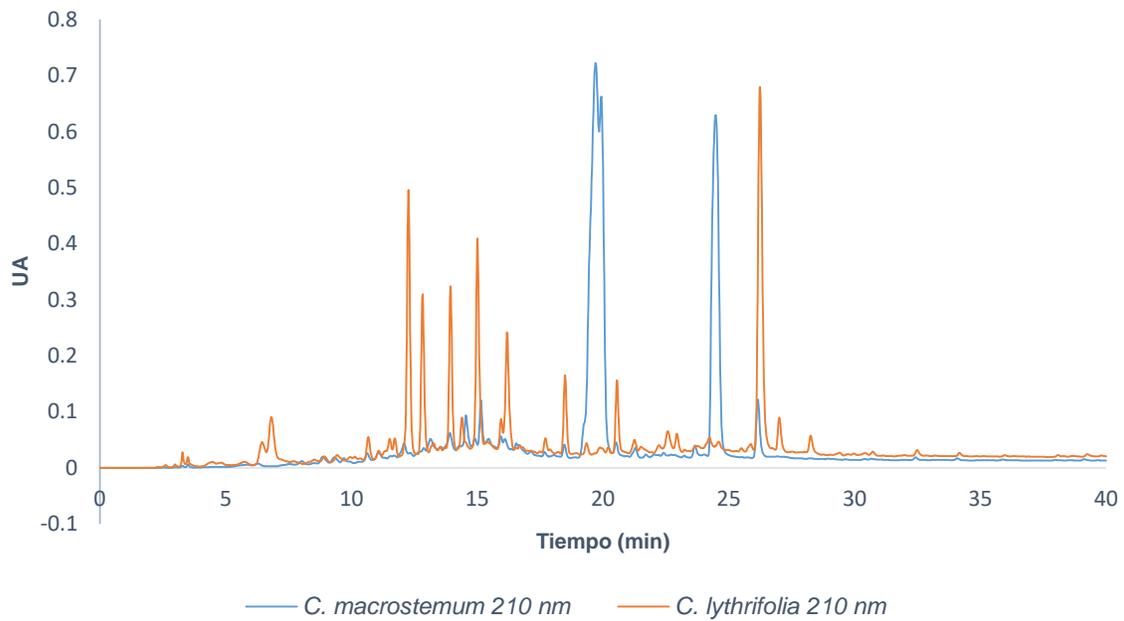


Figura 16. Cromatogramas de la fracción de diclorometano del extracto acuoso de *C. macrostemum* y *C. lythrifolia*. Las condiciones se indican en la sección de Metodología 3.6.

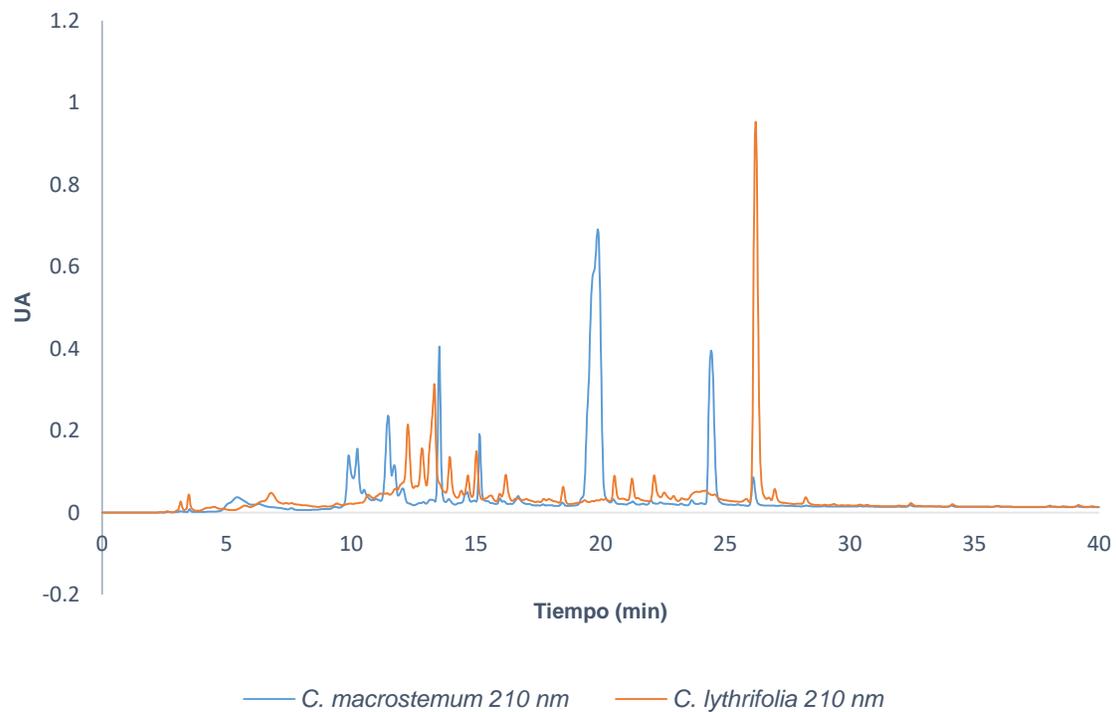


Figura 17. Cromatogramas de la fracción de acetato de etilo del extracto acuoso de *C. macrostemum* y *C. lythrifolia*. Las condiciones se indican en la sección de Metodología 3.6.

Resulta evidente que los perfiles cromatográficos de las diferentes fracciones derivadas de las tisanas, y por ende la composición química, de los dos poleos es muy diferente. Una de las principales perspectivas del trabajo es determinar la composición química de estas fracciones, y posteriormente la naturaleza de los constituyentes activos.

4.2. Establecimiento de las pruebas químicas de identidad.

4.2.1. Composición química del aceite esencial.

La identificación de los componentes del aceite esencial obtenido por hidrodestilación de ambos poleos se llevó a cabo por cromatografía de gases (CG) acoplada a espectrometría de masas (EM). La CG-EM es un método ampliamente aceptado para el análisis de aceites esenciales, debido a la volatilidad de sus constituyentes, a la sensibilidad, estabilidad y alta eficiencia del método. Especialmente, el acoplamiento con EM provee información confiable para el análisis cualitativo de los complejos constituyentes (Kumari *et al.* 2016).

Los resultados obtenidos a partir de estos análisis se ilustran en las Tablas 3 y 4, y en las Figuras 18 y 19. El análisis de las esencias se realizó por triplicado, a partir de tres lotes diferentes obtenidos en distintas épocas del año. Los rendimientos (%) de los aceites esenciales obtenidos a partir de *C. lythrifolia* y *C. macrostemum* fueron aproximadamente 0.247 ± 0.103 y 0.134 ± 0.029 , respectivamente. Los productos se identificaron mediante la comparación de sus índices de retención en relación con una serie homóloga de *n*-alcanos C₈-C₂₀ calculados de acuerdo a Van Del Dool y Kratz (1963), y con los reportados en la base de datos del NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología), y los descritos por Adams (2007). De manera simultánea se obtuvieron los espectros de masas de los componentes de las esencias por impacto electrónico (Anexos). Estos espectros de masas fueron comparados con los de la base de datos del equipo y con los datos reportados en la literatura.

Así, el análisis cromatográfico reveló la presencia de mentona (**12**) y pulegona (**15**) como compuestos mayoritarios de la esencia de *C. macrostemum*; estos se encontraron en los tres lotes analizados en proporciones similares. En el caso de *C. lythrifolia* los principales constituyentes encontrados en el lote II fueron β -cariofileno (**11**), α -cariofileno (**30**) y un producto caracterizado como acetato de nopilo (**31**) con base en su patrón de fragmentación. En los lotes I y III **11** y **30** están presentes en menor cantidad; sin embargo, el acetato de nopilo se encuentra en mayor proporción, junto a su isómero.

Como se observa en la Tabla 3, del lote I de *C. lythrifolia* se identificaron nueve constituyentes, mismos que representan el 70.52 % de la composición del aceite, de los cuales el 4,7-dimetil, benzofurano (**26**) es un compuesto exclusivo de este lote; de igual forma se identificaron once y nueve compuestos de los lotes II y III, que representan el 69.69 % y 98.68 % del total del aceite esencial, respectivamente. El biciclogermacreno (**21**) sólo está presente en el lote III.

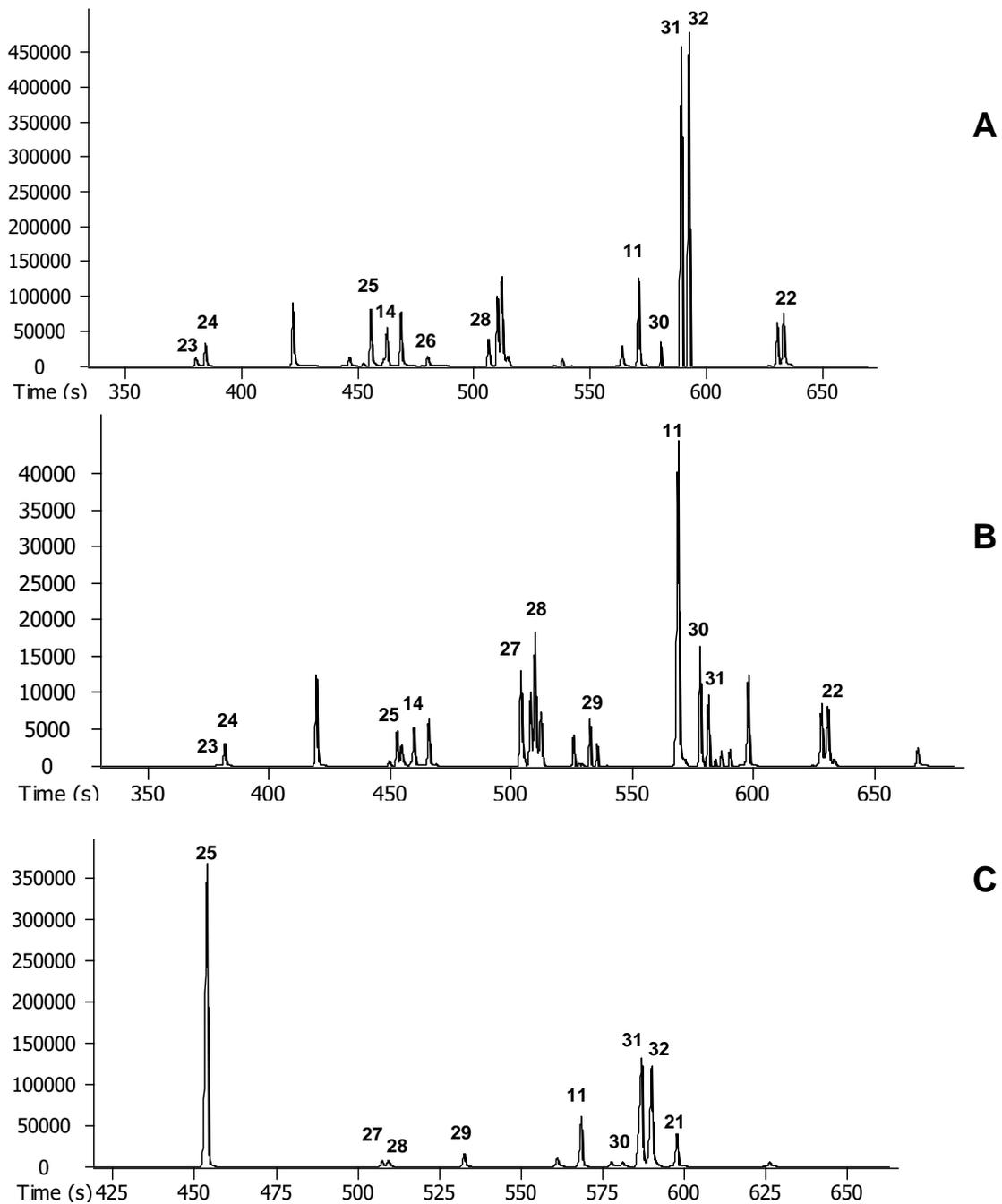


Figura 18. Cromatograma iónico total del aceite esencial de *C. lythrifolia* analizado en una columna capilar DB-5. **A.** Lote I **B.** Lote II **C.** Lote III. Las condiciones se indican en la sección de Metodología 3.6.

Tabla 3. Compuestos volátiles identificados por CG-EM a partir del aceite esencial de *C. lythrifolia*.

No	Compuesto	IR teórico	IR experimental	Area (%)			Método de identificación
				Lote I	Lote II	Lote III	
1	<i>o</i> -cimeno (23)	1023	1025	0.9136	2.9993		EM, IR
2	eucaliptol (24)	1031	1033	1.8549	5.0852		EM, IR
3	ND		1099	6.1116	3.3441		
4	ND		1150	0.9153			
5	mentofurano (25)	1164	1167	5.0568	0.6574	20.445	EM, IR
6	α -terpineol (14)	1188	1181	1.3186	1.7376		EM, IR
7	ND		1192	4.7265	3.0601		
8	4,7-dimetil benzofurano (26)	1220	1217	1.2058			EM, IR
9	ND		1273		6.6345		
10	ND		1279	1.0827			
11	acetato de bornilo (27)	1287	1286		0.8505	1.5261	EM, IR
12	acetato de isopulegol (28)	1283	1287	3.3964	0.7087	1.733	EM, IR
13	ND		1291	3.3074			
14	ND		1323		1.3052		
15	δ -elemeno (29)	1338	1339		2.3665	3.4409	EM, IR

80 % de similitud utilizado; IR: índice de retención; EM: espectrometría de masas; ND: no determinado.

Tabla 3. Compuestos volátiles identificados por CG-EM a partir del aceite esencial de *C. lythrifolia* (continuación).

No	Compuesto	IR teórico	IR experimental	Área (%)			Método de identificación
				Lote I	Lote II	Lote III	
16	ND		1352	0.8496	2.6263		
17	ND		1406	1.9475		1.0487	
18	β -cariofileno (11)	1419	1426	7.8567	32.265	13.646	EM, IR
19	ND		1457	3.9012	1.4932	0.1135	
20	α -cariofileno (30)	1454	1467	1.0863	11.190	2.1068	EM, IR
21	acetato de nopilo (31)	1426	1475	21.7783	9.0616	25.093	
22	acetato de nopilo (32)	1426	1483	26.0512		20.108	
23	ND		1503		5.1833		
24	biciclogermacreno (21)	1500	1504			10.583	EM, IR
25	ND		1579			0.1560	
26	ND		1584		0.6188		
27	ND		1590	2.9494			
28	óxido de cariofileno (22)	1583	1597	3.6902	2.767		EM, IR
29	ND		1701		6.0457		
	Total			100	100	100	

80 % de similitud utilizado; IR: índice de retención; EM: espectrometría de masas; ND: no determinado

Por otra parte, un total de siete constituyentes (75.25 % de la composición total del aceite) fueron identificados del lote I de *C. macrostemum*; el óxido de cariofileno (**22**) y el neo-mentol (**20**) solo estuvieron presentes en el lote I. Así mismo, del lote II se lograron identificar ocho compuestos que representaron el 95.68 % del total del aceite; el α -pineno (**16**) y el limoneno (**17**) sólo se detectaron en este lote; finalmente, en el aceite del lote III se identificaron cinco productos que representan el 100% de la esencia (Tabla 4). El biciclogermacreno (**21**) se encuentra solo en ese lote.

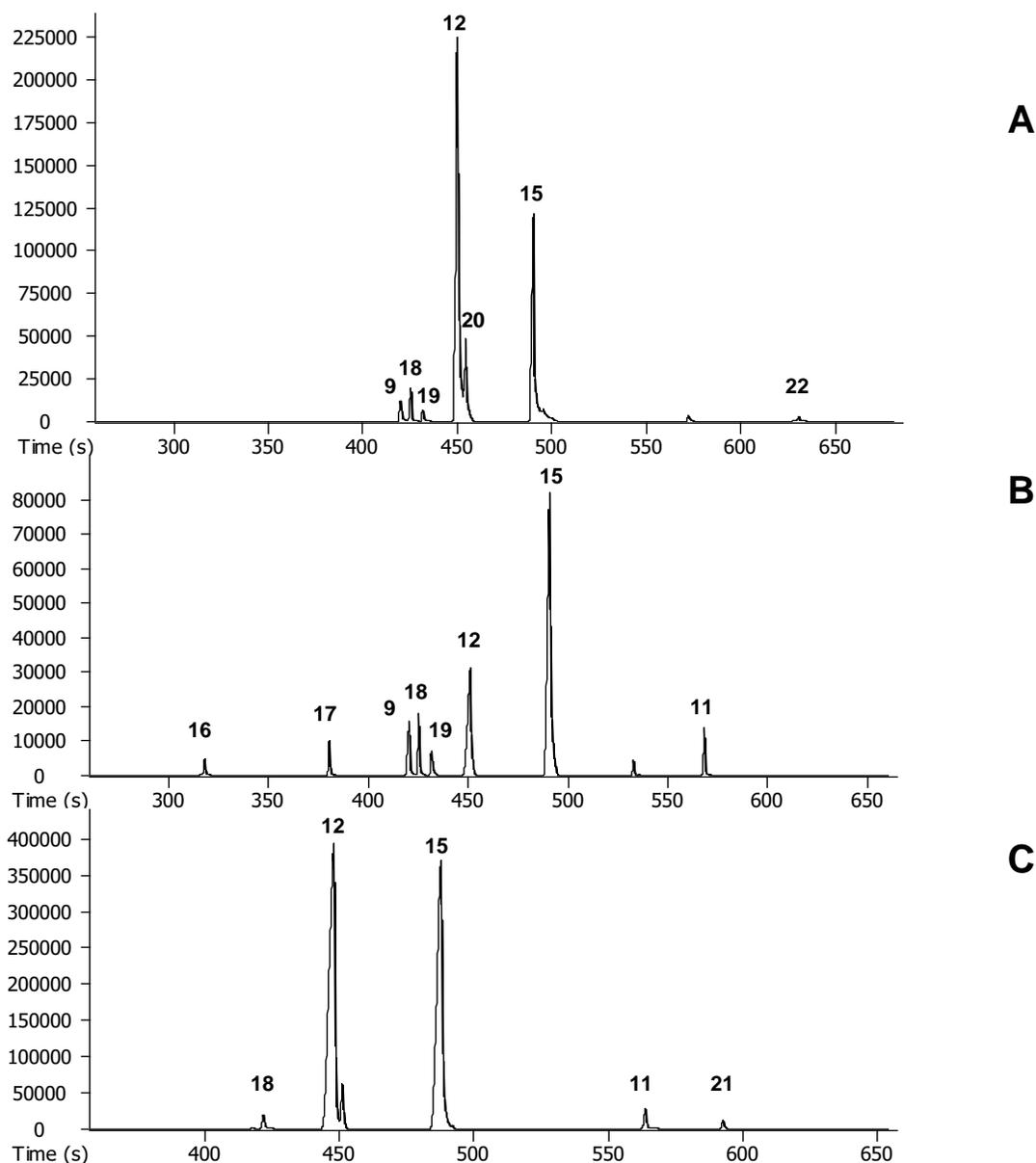


Figura 19. Cromatograma iónico total del aceite esencial de *C. macrostemum* analizado en una columna capilar DB-5. **A.** Lote I **B.** Lote II **C.** Lote III. Las condiciones se indican en la sección de Metodología 3.6.

Tabla 4. Compuestos volátiles identificados por CG-EM a partir del aceite esencial de *C. macrostemum*.

No	Compuesto	IR teórico	IR experimental	Area (%)			Método de identificación
				Lote I	Lote II	Lote III	
1	α -pineno (16)	939	930		3.086		EM, IR
2	limoneno (17)	1029	1024		2.6921		EM, IR
3	linalool (9)	1096	1100	1.6566	3.5966		EM, IR
4	acetato de 1-octen-3-ilo (18)	1112	1110	1.7989	3.8285	2.874	EM, IR
5	acetato de 3-octanol (19)	1123	1122	0.8113	1.0192		EM, IR
6	mentona (12)	1152	1159	38.526	53.629	54.402	EM, IR
7	neo-mentol (20)	1165	1166	14.606			EM, IR
8	pulegona (15)	1237	1240	16.518	23.763	38.825	EM, IR
9	ND		1241	17.185			
10	ND		1253	7.3951	2.6481		
11	ND		1339		1.6696		
12	cariofileno (11)	1419	1425		4.0679	2.718	EM, IR
13	ND		1436	0.1651			
14	biciclogermacreno (21)	1500	1490			1.181	EM, IR
15	óxido de cariofileno (22)	1583	1590	1.338			EM, IR
	Total			100	100	100	

80 % de similitud utilizado; IR: índice de retención; EM: espectrometría de masas; ND: no determinado

La composición encontrada para los lotes analizados de *C. macrostemum* es similar a la de estudios previos. Así el aceite esencial analizado en 2017 por Torres-Martínez y colaboradores contiene principalmente limoneno (17), linalool (9), mentona (12), pulegona (15), timol y β -cariofileno (11), mientras que el analizado por Rojas-Olivos *et al.* en 2018 contiene cantidades considerables de linalool (9), nerol (10), β -cariofileno (11), mentona (12), acetato de geraniol (13), terpineol (14) y pulegona (15). Sin embargo, a pesar de la similitud del contenido de ambos aceites esenciales, el componente mayoritario en esos estudios no fue la mentona. Ésta diferencia puede obedecer a causas ontogénicas, geográficas y fenológicas.

Respecto a *C. lythrifolia*, no existen estudios en la literatura hasta la fecha que reporten la composición de su aceite esencial. Aunque, ciertas especies del género como *C. incisa*, *C. microcephala*, *C. fasciculata*, *C. spicata* y *C. incana*, presentan en sus esencias al mentofurano (25), eucaliptol (24) y β -cariofileno (11) como componentes mayoritarios (Bordignon *et al.*, 1996, 1997; Agostini *et al.*, 2010).

4.2.2. Microextracción en fase sólida de los compuestos volátiles

Con la finalidad de establecer el contenido de los componentes volátiles con mayor detalle, se realizó un análisis de microextracción en fase sólida (MEFS). La MEFS consiste en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice fundida que está recubierta de un sorbente polimérico seguida de la desorción de los analitos mediante temperatura o un disolvente orgánico. Existen básicamente dos modos de extracción posibles en MEFS, introduciendo la fibra directamente en la muestra (inmersión) o bien en el espacio de cabeza o headspace (Figura 20). Si la MEFS se acopla a la CG, la desorción se realiza térmicamente y al aumentar la temperatura, la afinidad de los compuestos por la fibra disminuye, y los analitos son introducidos en la columna analítica por el flujo del gas acarreador (He). Generalmente, la naturaleza del analito a ensayar determina el tipo de fibra a utilizar, empleándose recubrimientos polares como PA o carbowax (CW) para compuestos de naturaleza química polar y recubrimientos como PDMS para aquellos menos polares. Dado que, los analitos estudiados presentan una tendencia

de mediana a baja polaridad se decidió utilizar la fibra de polaridad media con recubrimiento de divinil benceno/ carboxen/ poli dimetil siloxano (DVB/ CAR/ PDMS). La cual de acuerdo a algunos estudios anteriores (Santana *et al.*, 2017), reportó mejor eficiencia de extracción para terpenos.

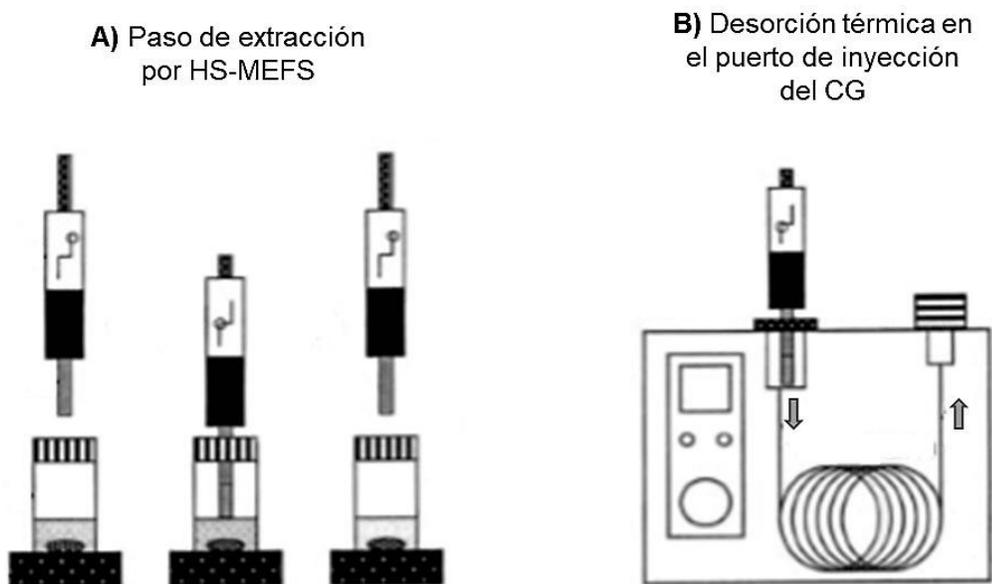


Figura 20. Esquema del proceso de extracción y desorción por HS-MEFS-CG

Los resultados obtenidos a partir de estos análisis permitieron identificar en el caso de *C. macrostemum* un total de cuatro constituyentes que representan el 94.04% de la composición total de volátiles, de los cuales mentona (**12**), neo-isomentol (**38**) y pulegona (**15**) son los componentes más abundantes, en tanto que el análisis de *C. lythrifolia* presentó 14 compuestos, que representan el 89.80% del total de volátiles, siendo acetato de isopulegol (**20**), β -cariofileno (**11**) y acetato de bornilo (**23**) los principales componentes (Tabla 5 y Figura 21).

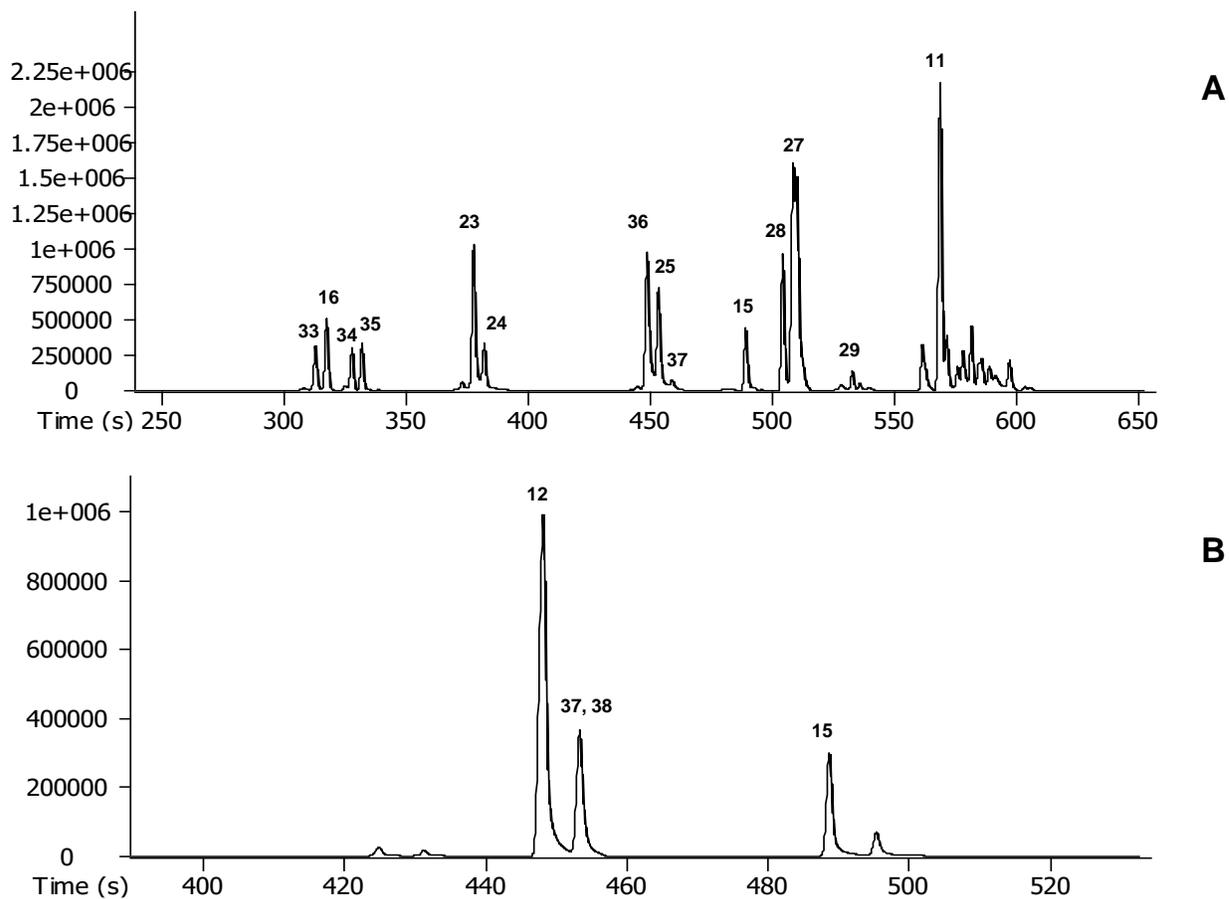


Figura 21. Cromatograma iónico total de los componentes volátiles presentes en las partes aéreas de **A.** *C. lythrifolia* y **B.** *C. macrostemum* analizados en una columna capilar DB-5 por la técnica de MEFS. Las condiciones se indican en la sección de Metodología 3.6.

Tabla 5. Componentes volátiles de las partes aéreas de los lotes II de *C. lythrifolia* y *C. macrostemum* obtenidos por MEFS

No	Compuesto	IR teórico	IR experimental		Área (%)		Método de identificación
			CL	CM	CL	CM	
1	α -tujeno (33)	930	922		1.3344		EM, IR
2	α -pineno (16)	939	928		1.8472		EM, IR
3	canfeno (34)	943	943		1.539		EM, IR
4	2,4-tujadieno (35)	945	949		0.5684		EM, IR
5	ND			1109		1.1323	
6	<i>o</i> -cimeno (23)	1023	1019		9.066		EM, IR
7	ND			1121		1.0809	
8	eucaliptol (24)	1031	1027		5.5887		EM, IR
9	mentona (12)	1152		1153		45.012	EM, IR
10	<i>trans-p</i> -mentona (36)	1154	1154		11.304		EM, IR
11	mentofurano (25)	1164	1162		4.5412		EM, IR
12	<i>cis-p</i> -mentona (37)	1163	1163	1163	4.5412	14.198	EM, IR
13	<i>neo</i> -isomentol (38)	1186		1164		18.601	EM, IR
14	pulegona (15)	1237	1237	1237	2.7185	16.235	EM, IR
15	ND		1252			3.7408	
16	acetato de isopulegol (28)	1277	1283		18.4465		EM, IR
17	acetato de bornilo (27)	1285	1287		14.759		EM, IR

80 % de similitud utilizado; IR: índice de retención; EM: espectrometría de masas; CL: *Cunila lythrifolia*; CM: *Clinopodium macrostemum*; ND: no determinado;

Tabla 5. Componentes volátiles de las partes aéreas de los lotes II de *C. lythrifolia* y *C. macrostemum* obtenidos por MEFS (continuación).

No	Compuesto	IR teórico	IR experimental		Área (%)		Método de identificación
			CL	CM	CL	CM	
18	δ-elemeno (29)	1338	1339		1.3548		EM, IR
19	ND		1406		2.8181		
20	cariofileno (11)	1419	1426		12.191		EM, IR
21	ND		1450		4.0664		
22	ND		1471		1.6729		
23	ND		1501		1.6427		
	Total				100	100	

80 % de similitud utilizado; IR: índice de retención; EM: espectrometría de masas; CL: *Cunila lythrifolia*; CM: *Clinopodium macrostemum*; ND: no determinado;

Cabe mencionar que los resultados obtenidos del análisis por CG de las esencias y los de MEFS no son comparables, debido a que los principios fisicoquímicos que fundamentan ambas técnicas analíticas son muy distintos. En este caso, los resultados cualitativos obtenidos en cada caso están en armonía, de tal manera que la MEFS puede ser utilizada como una técnica complementaria, rápida y eficiente para la detección de compuestos volátiles en ambos poleos.

4.2.3. Compuestos volátiles detectados en las decocciones.

Algunos terpenoides presentes en las esencias pueden modular varios de los mecanismos que contribuyen al alivio o control total del dolor. Debido a la gran cantidad de terpenoides presentes en las esencias de los poleos, es posible que estos compuestos sean los responsables del efecto antinociceptivo que presentaron sus extractos acuosos. Por lo tanto, se decidió analizar la composición de los compuestos volátiles presentes en las cocciones de ambos poleos. Estos se obtuvieron por hidrodestilación de la decocción. Así, el análisis por CG-EM indicó que el extracto acuoso de *C. macrostemum* contiene mentona (**12**), neo-mentol (**20**), pulegona (**15**) y piperitona (**40**), los cuales representan el 97.78 % de la composición de volátiles de la decocción, mientras que la de *C. lythrifolia* contiene eucaliptol (**24**), isopulegol (**39**), pulegona (**15**) y acetato de nopilo (**31**) que representan el 44.15% de los compuestos volátiles totales del extracto acuoso (Figura 22 y Tabla 6).

En estudios previos se comprobó que la pulegona (**15**) produce un efecto antinociceptivo cuando se evalúa mediante la prueba de ácido acético (de Sousa *et al.*, 2007). La acción nociceptiva de la decocción podría estar entonces relacionada con la presencia de este producto en la misma. De igual forma el aceite esencial de *Mentha mozaffarianii* que contiene piperitona (**40**) como componente mayoritario ejerció un efecto antinociceptivo importante en los ensayos de ácido acético y formalina; en éste último caso el efecto fue mejor durante la primera fase (Sam-Daliri *et al.*, 2016). También se demostró que el isopulegol (**39**) administrado oralmente en ratones, tuvo un efecto significativo cuando se evaluó en distintos modelos de nocicepción química (formalina, capsaicina y glutamato) (Andrade *et al.*

2018). Finalmente, se comprobó el potencial analgésico de la mentona (**12**) en combinación con diferentes monoterpenoides, entre ellos, el eucaliptol (**24**) como coadyuvantes en el tratamiento de la neuralgia posherpética (Guimarães, 2014).

Con base en las consideraciones anteriores es altamente factible que la acción antinociceptiva de los poleos esté ligada a la presencia de monoterpenoides en sus preparados. Sin embargo, se deben realizar estudios posteriores para comprobar la naturaleza de todos los ingredientes activos de las decocciones.

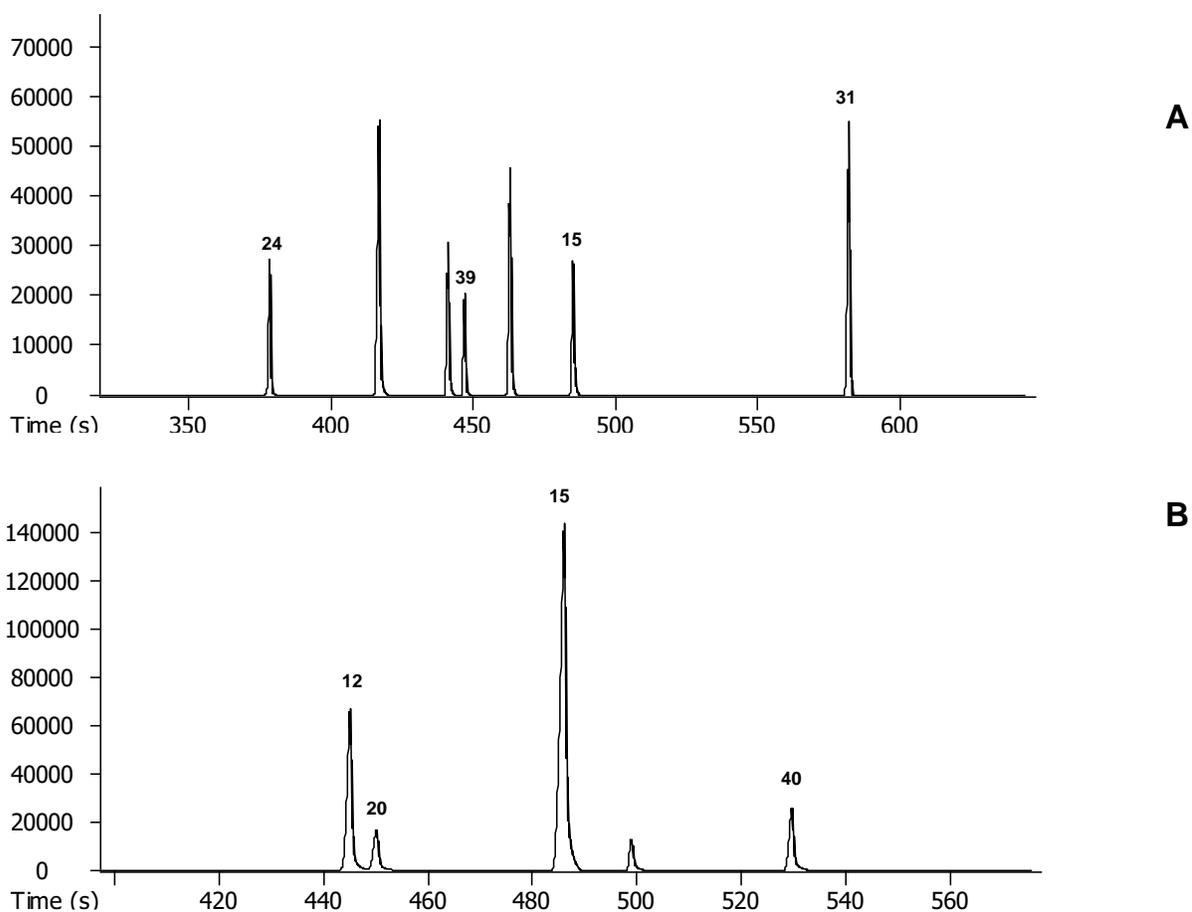


Figura 22. Cromatograma iónico total de los componentes volátiles presentes en las decocciones de **A.** *C. lythrifolia* y **B.** *C. macrostemum* analizados en una columna capilar DB-5. Las condiciones se indican en la sección de Metodología 3.6.

Tabla 6. Componentes volátiles de la decocción de los lotes II de *C. lythrifolia* y *C. macrostemum*

No	Compuesto	IR teórico	IR experimental		Área (%)		Método de identificación
			CL	CM	CL	CM	
1	eucaliptol (24)	1031	1021		10.34		EM, IR
2	ND		1094		20.815		
3	ND		1139		10.833		
4	ND		1140		10.833		
5	mentona (12)	1152		1147		24.966	EM, IR
6	isopulegol (39)	1149	1151		12.708		EM, IR
7	neo-mentol (20)	1165		1157		12.296	EM, IR
8	ND		1181		13.3642		
9	pulegona (15)	1237	1229	1231	5.9078	51.923	EM, IR
10	ND			1261		2.2162	
11	piperitona (40)	1252		1332		8.5988	EM, IR
12	acetato de nopilo (31)	1426	1461		15.199		
	Total				100	100	

80 % de similitud utilizado; IR: índice de retención; EM: espectrometría de masas; CL: *Cunila lythrifolia*; CM: *Clinopodium macrostemum*; ND: no determinado;

5. CONCLUSIONES.

- La inocuidad preclínica o inicial de los extractos acuosos de *C. macrostemum* y *C. lythrifolia* se estableció de acuerdo a los criterios propuestos por Lorke. Así, la DL₅₀ fue mayor a 5 g/kg, por lo que, con base en su uso histórico de más de 100 años y estos resultados, se presume que el consumo de estas especies sea seguro para el ser humano. Es recomendable realizar otros estudios como toxicidad crónica y potencial mutagénico, entre otros para determinar de forma integral su inocuidad.
- Los resultados correspondientes a la eficacia del preparado tradicional (decocción) corroboraron a nivel preclínico el potencial antinociceptivo de *C. lythrifolia* y *C. macrostemum*. Las diferentes respuestas generadas en las dos fases del ensayo de la formalina en ratones, sugieren que los dos poleos analizados presentan diferentes mecanismos de acción.
- Los perfiles cromatográficos de las fracciones orgánicas del extracto acuoso de *C. macrostemum* y *C. lythrifolia* se obtuvieron por CLAE. Este resultado evidencia de manera preliminar que la composición química de ambos poleos es muy diferente.
- El análisis de los aceites esenciales por CG-EM permitió establecer en todos los casos un elevado porcentaje de mentona (**12**) y pulegona (**15**) en *C. macrostemum* y un alto porcentaje de dos isómeros del acetato de nopilo (**31** y **32**), y cariofileno (**11**) en *C. lythrifolia*. Estas diferencias permitirán diferenciar químicamente ambas especies.
- El análisis de los componentes volátiles obtenidos mediante la técnica de micro extracción en fase sólida (MEFS), permitió la identificación de mentona (**12**) en *C. macrostemum* como el componente volátil más abundante; en tanto que en *C. lythrifolia* se identificaron acetato de isopulegol (**28**), acetato de isobornilo (**27**), y cariofileno (**11**) como sus principales componentes.
- De los componentes volátiles presentes en la decocción de *C. macrostemum*, es posible que la pulegona (**15**) contribuya al efecto antinociceptivo.

- Todos estos resultados generados constituyen pruebas de identidad química, eficacia y seguridad preclínicas de las drogas crudas de *C. lythrifolia* y *C. macrostemum* que serán de utilidad para la integración de sus monografías tipo OMS y FHEUM. La generación de estos documentos permitirá establecer el control de calidad riguroso de estas especies y diferenciarlas.

6. PERSPECTIVAS

Con la finalidad de complementar la información generada en el presente trabajo de investigación sobre la actividad farmacológica y composición química del preparado tradicional de *C. lythrifolia* y *C. macrostemum*, se pretende realizar estudios adicionales que permitan establecer de manera integral los parámetros de calidad, eficacia y seguridad de la planta. Para ello, será necesario establecer los principios activos y su mecanismo de acción. También se pretende desarrollar las pruebas de valoración del contenido de los principios activos y/o marcadores.

7. REFERENCIAS

- Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry* (Vol. 456). Carol Stream, IL: Allured publishing corporation.
- Agostini, F., Santos, A. C. A. D., Rossato, M., Pansera, M. R., Santos, P. L. D., Serafini, L. A., Molon, R., & Moyna, P. (2009). Essential oil yield and composition of Lamiaceae species growing in Southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(2), 473-478.
- Agostini, G., Agostini, F., Bertolazzi, M., Echeverrigaray, S., & Souza-Chies, T. T. (2010). Variation of the chemical composition of essential oils in Brazilian populations of *Cunila menthoides* Benth. (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 38(5), 906-910.
- Agostini, G., Souza-Chies, T. T., Agostini, F., Atti-Serafini, L., & Echeverrigaray, S. (2010). Essential oil composition of *Cunila incana* Benth. (Lamiaceae). *Journal of Essential Oil Research*, 22(5), 432-434.
- Alinkina, E. S., Misharina, T. A., & Fatkullina, L. D. (2013). Antiradical properties of oregano, thyme, and savory essential oils. *Applied biochemistry and microbiology*, 49(1), 73-78.
- Alonso-Carrillo, N., de los Ángeles Aguilar-Santamaría, M., Vernon-Carter, E. J., Jiménez-Alvarado, R., Cruz-Sosa, F., & Román-Guerrero, A. (2017). Extraction of phenolic compounds from *Satureja macrostema* using microwave-ultrasound assisted and reflux methods and evaluation of their antioxidant activity and cytotoxicity. *Industrial crops and products*, 103, 213-221.
- Andrade, D. F., Reis Filho, A. C., Piauilino, C. A., Lopes, E. M., de Sousa, D. P., & de Castro Almeida, F. R. (2018). Effects of isopulegol in acute nociception in mice: Possible involvement of muscarinic receptors, opioid system and l-arginine/NO/cGMP pathway. *Chemico-biological interactions*, 293, 55-60.

- Apel, M. A., Ribeiro, V. L. S., Bordignon, S. A., Henriques, A. T., & von Poser, G. (2009). Chemical composition and toxicity of the essential oils from *Cunila* species (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Parasitology research*, 105(3), 863.
- Atzeni, F., Masala, I. F., & Sarzi-Puttini, P. (2018). A Review of Chronic Musculoskeletal Pain: Central and Peripheral Effects of Diclofenac. *Pain and therapy*, 7(2), 163-177.
- Barrot, M. (2012). Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*, 211, 39-50.
- Bauer, R., & Tittel, G. (1996). Quality assessment of herbal preparations as a precondition of pharmacological and clinical studies. *Phytomedicine*, 2(3), 193-198.
- Bauer, R. (1998). Quality criteria and standardization of phytopharmaceuticals: Can acceptable drug standards be achieved?. *Drug Information Journal*, 32(1), 101-110.
- Bordignon, S. A. D. L., Schenkel, E. P., & Spitzer, V. (1996). The essential oil of *Cunila incisa* (Lamiaceae). A rich source of 1, 8-cineole. *Química Nova*, 19, 105-107.
- Bordignon, S. A. D. L., Schenkel, E. P., & Spitzer, V. (1997). The essential oil composition of *Cunila microcephala* and *Cunila fasciculata*. *Phytochemistry*, 44(7), 1283-1286.
- Bordignon, S. A. D. L., Schenkel, E. P., & Spitzer, V. (1998). Essential Oil of *Cunila menthoides* Benth (Lamiaceae). *Journal of Essential Oil Research*, 10(3), 317-320.
- Bordignon, S. A. D. L., Schenkel, E. P. (1998b). The Essential Oil Composition of *Cunila platyphylla* Epling (Lamiaceae). *Acta Farm. Bonaerense*, 17(2), 143-146.
- Bordignon, S. A., Schenkel, E. P., & Spitzer, V. (1999). The essential oil composition of *Cunila angustifolia* (Lamiaceae). *Journal of Essential Oil Research*, 11(2), 145-148.

- Bordignon, S. A. D.L., Montanha, J. A., & Schenkel, E. P. (2003). Flavones and flavanones from South American *Cunila* species (Lamiaceae). *Biochemical systematics and ecology*, 7(31), 785-788.
- Busse, W. (2000). The significance of quality for efficacy and safety of herbal medicinal products. *Drug Information Journal*, 34(1), 15-23.
- Cabana, R., Silva, L. R., Valentão, P., Viturro, C. I., & Andrade, P. B. (2013). Effect of different extraction methodologies on the recovery of bioactive metabolites from *Satureja parvifolia* (Phil.) Epling (Lamiaceae). *Industrial crops and products*, 48, 49-56.
- Cantino, P. D., & Sanders, R. W. (1986). Subfamilial classification of Labiatae. *Syst. Bot.* (1), 163-185.
- Castillo-España, P., Monroy-Ortiz, C., García, J. A., Estrada-Soto, S. E. & Perea-Arango, I. (2015). Traditional medicinal plants used for the treatment pain and inflammation in Morelos (México): An ethno-botanical survey. *Natural Products Chemistry and Research*, 3(6), 216.
- Ćavar, S., Maksimović, M., Šolić, M. E., Jerković-Mujkić, A., & Bešta, R. (2008). Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. *Food Chemistry*, 111(3), 648-653.
- Chalchat, J. C., Garry, R. P., Menut, C., Lamaty, G., Malhuret, R., & Chopineau, J. (1997). Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. *Journal of essential oil research*, 9 (1), 67-75.
- Coelho, J. A., Grosso, C., Pereira, A. P., Burillo, J., Urieta, J. S., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Mendes, R. L. & Palavra, A. M. F. (2007). Supercritical carbon dioxide extraction of volatiles from *Satureja fruticosa* Béguinot. *Flavour and fragrance journal*, 22 (5), 438-442.
- Coelho, J. P., Cristino, A. F., Matos, P. G., Rauter, A. P., Nobre, B. P., Mendes, R. L., Barroso, J. G., Mainar, A. Urieta, J. S., Fareleira J. M. N. A., Sovová, H. & Palavra, A. M. F. (2012). Extraction of volatile oil from aromatic plants with supercritical carbon dioxide: experiments and modeling. *Molecules*, 17 (9), 10550-10573.

- Dambolena, J. S., Zunino, M. P., Lucini, E. I., Zygodlo, J. A., Rotman, A., Ahumada, O., & Biurrun, F. (2009). Essential oils of plants used in home medicine in North of Argentina. *Journal of Essential Oil Research*, 21 (5), 405-409.
- De Diego, J. (1992). La calidad de los productos y medicamentos fitoterapéuticos. *Discurs en l'acte de recepció com a acadèmic corresponent de la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya*, 8.
- De Smet PAGM (1999). Overview of herbal quality control. *Drug Inform. J.*, 33: 717-724.
- de Sousa, D. P., Junior, E. V., Oliveira, F. S., de Almeida, R. N., Nunes, X. P., & Barbosa-Filho, J. M. (2007). Antinociceptive activity of structural analogues of rotundifolone: structure-activity relationship. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 62(1-2), 39-42.
- Delgado, G., Hernández, J., & Pereda-Miranda, R. (1989). Triterpenoid acids from *Cunila lythrifolia*. *Phytochemistry*, 28(5), 1483-1485.
- Eblen-Zajjur, A. (2005). Neurofisiología de la nocicepción. *Gaceta Médica de Caracas*, 113(4), 466-473.
- Echeverrigaray, S., Fracaro, F., dos Santos, A. C. A., Paroul, N., Wasum, R., & Serafini, L. A. (2003). Essential oil composition of south Brazilian populations of *Cunila galioides* and its relation with the geographic distribution. *Biochemical systematics and ecology*, 31(5), 467-475.
- Echeverrigaray, S., Albuquerque, M., Zacaria, J., Atti dos Santos, A. C., & Atti-Serafini, L. (2009). Chemical variations on the essential oils of *Cunila spicata* Benth. (Lamiaceae), an aromatic and medicinal plant from south Brazil. *Journal of Essential Oil Research*, 21(3), 241-245
- EMEA (2005). Guidelines on Quality of Herbal Medicinal Products/Traditional Medicinal Products, EMEA/CVMP/81400 Review. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMEA), London.

- Escop, & European Scientific Cooperative on Phytotherapy. (2003). *ESCOP Monographs: the scientific foundation for herbal medicinal products*. Thieme.
- FHEUM (2013). Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos.
- Franz, G., & Vlietinck, A. J. (2001). Results and methods of work of the european pharmacopoeia. *Pharmeuropa special issue biologicals. 20001116 (Herbal Medicinal Products)*, 17-25.
- García-Peña, M. D. R., & González-Gallegos, J. G. (2013). *Cunila jaliscana* (Lamiaceae) a new species from Jalisco, México. *Phytotaxa*, 125 (1), 17-24.
- Guimarães, A. G., Serafini, M. R., & Quintans-Júnior, L. J. (2014). Terpenes and derivatives as a new perspective for pain treatment: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents*, 24(3), 243-265.
- Grosso, C., Figueiredo, A. C., Burillo, J., Mainar, A. M., Urieta, J. S., Barroso, J. G., Coelho, A., & Palavra, A. M. (2009). Enrichment of the thymoquinone content in volatile oil from *Satureja montana* using supercritical fluid extraction. *Journal of separation science*, 32 (2), 328-334.
- Hajhashemi, V., Ghannadi, A., & Pezeshkian, S. K. (2002). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Satureja hortensis* L. extracts and essential oil. *Journal of ethnopharmacology*, 82(2-3), 83-87.
- Hajhashemi, V., Zolfaghari, B., & Yousefi, A. (2012). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Satureja hortensis* seed essential oil, hydroalcoholic and polyphenolic extracts in animal models. *Medical Principles and Practice*, 21(2), 178-182.
- Harley, R. M. & Granda-Paucar, A. (2000). List of species of Tropical American Clinopodium (Labiatae), with new combinations. *Kew Bull.* 55 (4): 917-927
- Harley, R. M., Atkins, S., Budantsev, A. L., Cantino, P. D., Conn, B. J., Grayer, R., Harley, M. M., De Kok, R., Krestovskaja, T., Morales, R., Paton, A. J., Ryding, O. & Upson, T. (2004). Labiatae. IN: The families and genera of vascular plants VII. Flowering plants Dicotyledons: Lamiales, except

- Acanthaceae including Avicenniaceae (J.W. Kadereit, Ed.), pp. 167-275. Springer-Verlag, Berlin.
- Hatami, T., Rahimi, M., Veggi, P. C., Portillo-Prieto, R., & Meireles, M. A. A. (2011). Near-critical carbon dioxide extraction of khoa (*Satureja boliviana* Benth Briq) using ethanol as a co-solvent: experiment and modeling. *The Journal of Supercritical Fluids*, 55 (3), 929-936.
 - <https://www.gbif.org/species/8424305> consultado en febrero del 2019
 - <https://www.gbif.org/species/2926907> consultado en febrero del 2019
 - https://www.gbif.org/occurrence/gallery?taxon_key=7307037 consultado en febrero del 2019
 - Keller, K. (1996). Herbal medicinal products in Germany and Europe: experiences with national and European assessment. *Drug information journal*, 30(4), 933-948.
 - Kim, J., Marshall, M. R., & Wei, C. I. (1995). Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of agricultural and food chemistry*, 43 (11), 2839-2845.
 - Kumari, R., & Kotecha, M. (2016). A review on the standardization of herbal medicines. *Int J Pharm Sci Res*, 7, 97-106.
 - Kunle, O. F., Egharevba, H. O., & Ahmadu, P. O. (2012). Standardization of herbal medicines-A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 4(3), 101-112.
 - Le Bars, D., Gozariu, M., & Cadden, S. W. (2001). Animal models of nociception. *Pharmacological reviews*, 53(4), 597-652.
 - Lee, A. T. H., Ariffin, M. Z., Zhou, M., Ye, J. Z., Moochhala, S. M., & Khanna, S. (2011). Forebrain medial septum region facilitates nociception in a rat formalin model of inflammatory pain. *Pain*, 152(11), 2528-2542.
 - Lima, B., López, S., Luna, L., Agüero, M. B., Aragón, L., Tapia, A., Zacchino, S., López, M. L., Zygadlo, J. & Feresin, G. E. (2011). Essential Oils of Medicinal Plants from the Central Andes of Argentina: Chemical Composition, and Antifungal, Antibacterial, and Insect-Repellent Activities. *Chemistry & biodiversity*, 8(5), 924-936.

- Lorke, D. (1983). A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of Toxicology*, 54, 275-287.
- Luna, L., Lima, B., Tapia, A., Feresin, G. E., Duschatzky, C., Possetto, M., Lampasona, M. P. D. & Schuff, C. (2008). Chemical composition and antibacterial activity of *Satureja parvifolia* (Phil.) Epling essential oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 11 (1), 106-111.
- Manjili, H. K., Jafari, H., Ramazani, A., & Davoudi, N. (2012). Anti-leishmanial and toxicity activities of some selected Iranian medicinal plants. *Parasitology research*, 111(5), 2115-2121.
- Martínez, A. L. (2015). Herbolaria mexicana para el tratamiento del dolor. *Ciencia*, 66 (3), 60-67.
- Martínez, M. (1989). Las plantas medicinales de México, 5ta edición. Editorial Botas. México D.F. pp 184.
- Martínez-Gordillo, M., Fragoso-Martínez, I., del Rosario García-Peña, M., & Montiel, O. (2013). Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. *Revista mexicana de biodiversidad*, 84 (1), 30-86.
- Mastelić, J., & Jerković, I. (2003). Gas chromatography–mass spectrometry analysis of free and glycoconjugated aroma compounds of seasonally collected *Satureja montana* L. *Food chemistry*, 80(1), 135-140.
- Mirjana, S., & Nada, B. (2004). Chemical composition and antimicrobial variability of *Satureja montana* L. essential oils produced during ontogenesis. *Journal of Essential Oil Research*, 16(4), 387-391.
- Mogil, J. S., Davis, K. D., & Derbyshire, S. W. (2010). The necessity of animal models in pain research. *Pain*, 151(1), 12-17.
- Momtaz, S., Abdollahi, M. (2010). An update on pharmacology of *Satureja* species; from antioxidant, antimicrobial, antidiabetes and anti-hyperlipidemic to reproductive stimulation. *International Journal of Pharmacology*, 6 (4), 346-53.
- Moradi, F., Gohari, A. R., Saeidnia, S., Gohari, M. R., Fouladi, F., Malmir, M., Yasa, N. & Hadjiakhoondi, A. (2008). Cytotoxicity and phytochemical investigation of *Satureja atropatana* Bunge. *Planta Medica*, 74(09), PB7.

- NIH. National Institutes of Health. The National Academies. (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (8va ed.). Washington, D.C: The National Academies Press.
- Nottingham, S. F., Hardie, J., Dawson, G. W., Hick, A. J., Pickett, J. A., Wadhams, L. J., & Woodcock, C. M. (1991). Behavioral and electrophysiological responses of aphids to host and nonhost plant volatiles. *Journal of chemical ecology*, 17(6), 1231-1242.
- Nottingham, S. F., & Hardie, J. I. M. (1993). Flight behaviour of the black bean aphid, *Aphis fabae*, and the cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae*, in host and non-host plant odour. *Physiological Entomology*, 18(4), 389-394.
- Organización Mundial de la Salud (1999). WHO monographs on selected medicinal plants. Volumen 1. World Health Organization. Geneva, Switzerland.
- Organización Mundial de la Salud (2000). General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine. Geneva.
- Organización Mundial de la Salud (2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. World Health Organization. Ginebra, Suiza.
- Ortega-Ortega, T., & Vázquez-García, V. (2014). Satureja macrostema: situación ambiental, conocimiento local y roles de género. *Madera y bosques*, 20(2), 71-86.
- Ovalle-Magallanes, B., Rivero-Cruz, I., & Mata, R. (2014). Quality control tests for the crude drug of *Conyza filaginoides*. *Pharmaceutical biology*, 52(1), 117-123.
- Palavra, A. M. F., Coelho, J. P., Barroso, J. G., Rauter, A. P., Fareleira, J. M. N. A., Mainar, A., Urieta, J. S., Nobre, B. P., Gouveia, L., Mendes, R. L., Cabral, J. M. S. & Novais, J. M. (2011). Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive compounds from microalgae and volatile oils from aromatic plants. *The Journal of Supercritical Fluids*, 60, 21-27.

- Pawliszyn, J. (1997). *Solid phase microextraction: theory and practice*. John Wiley & Sons.
- Pérez-Cajaraville, J., Abejón, D., Ortiz, J. R., & Pérez, J. R. (2005). El dolor y su tratamiento a través de la historia. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 12(6), 373-384.
- Puebla Díaz, F. (2005). Tipos de dolor y escala terapéutica de la OMS: Dolor iatrogénico. *Oncología (Barcelona)*, 28(3), 33-37.
- Radonic, A., & Milos, M. (2003). Chemical composition and in vitro evaluation of antioxidant effect of free volatile compounds from *Satureja montana* L. *Free Radical Research*, 37(6), 673-679.
- Ribeiro, V. L. S., dos Santos, J. C., Bordignon, S. A., Apel, M. A., Henriques, A. T., & von Poser, G. L. (2010). Acaricidal properties of the essential oil from *Hesperozygis ringens* (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Bioresource Technology*, 101(7), 2506-2509.
- Rocha-González, H. I., Blaisdell-López, E., Granados-Soto, V., Navarrete, A. (2010). Antinociceptive effect of 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalin isolated from *Heterotheca inuloides*: role of peripheral 5-HT₁ serotonergic receptors. *European Journal of Pharmacology*, 649:154-160.
- Rojas-Olivos, A., Solano-Gómez, R., Granados-Echegoyen, C., Santiago-Santiago, L. A., García-Dávila, J., Pérez-Pacheco, R., & Lagunez-Rivera, L. (2018). Larvicidal effect of *Clinopodium macrostemum* essential oil extracted by microwave-assisted hydrodistillation against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 51(3), 291-296.
- Romera, E., Perena, M. J., Perena, M. F., & Rodrigo, M. D. (2000). Neurofisiología del dolor. *Rev Soc Esp Dolor*, 7(Supl II), 11-17.
- Roux, S., Sablé, E., & Porsolt, R. D. (2004). Primary observation (Irwin) test in rodents for assessing acute toxicity of a test agent and its effects on behavior and physiological function. *Current Protocols in Pharmacology*, 27(1), 10-10.

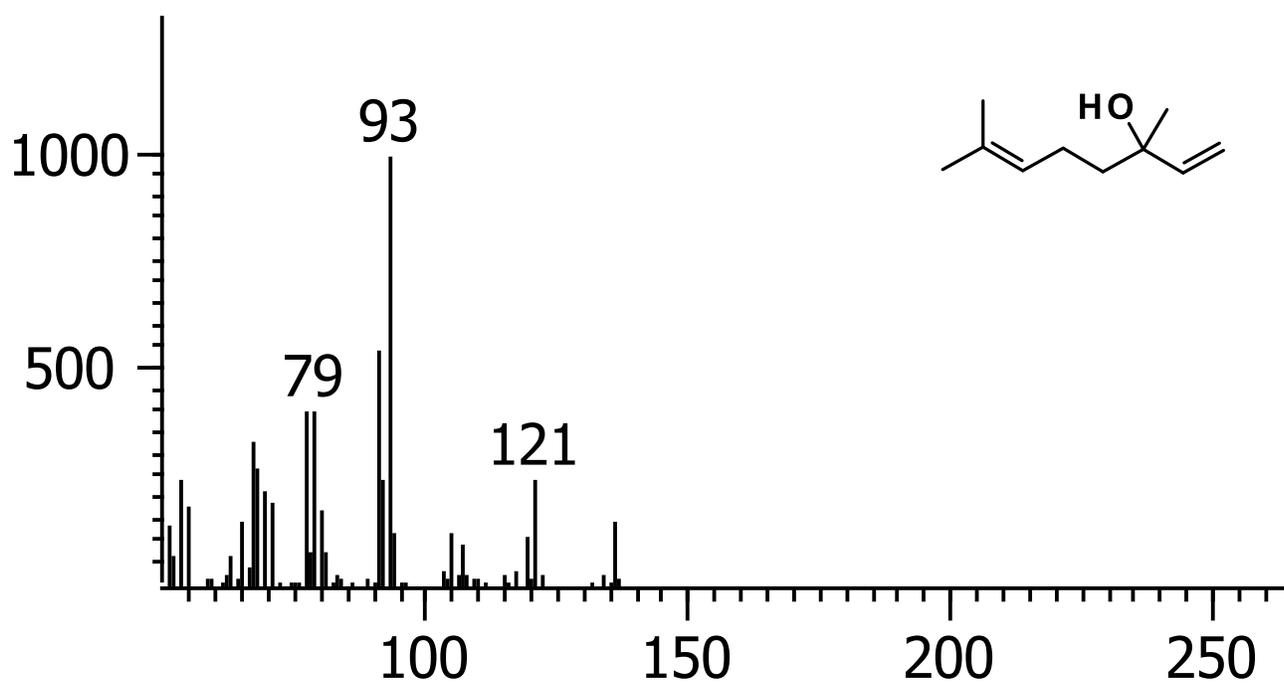
- Rzedowski, J. y G. Calderón de Rzedowski. 2010. Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México D. F. 975 p.
- Saeidnia, S., Gohari, A. R., Manayi, A., & Kourepaz-Mahmoodabadi, M. (2015). *Satureja: ethnomedicine, phytochemical diversity and pharmacological activities*. Springer.
- Sam-Dahri, H., Mousavi, Z., Naderi, N., & Asgarpanah, J. (2016). Chemical composition and analgesic activity of the essential oil of *Mentha mozaffarianii* jamzad leaves. *Bulgarian Chemical Communications*, 48, 641-5.
- Sandri, I. G., Zacaria, J., Fracaro, F., Delamare, A. P. L., & Echeverrigaray, S. (2007). Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Cunila* against foodborne pathogens and spoiling bacteria. *Food Chemistry*, 103(3), 823-828.
- Santana, K. L. D., Galvao, M. D. S., Jesus, M. S. D., Nogueira, J. P., & Narain, N. (2017). HS-SPME optimization and extraction of volatile compounds from soursop (*Annona muricata* L.) pulp with emphasis on their characteristic impact compounds. *Food Science and Technology*, 37(2), 250-260.
- Savaris, M., Sabedot-Bordin, S., Mendes, C., Moura, N., Teixeira, C., & Garcia, F. (2014). Evaluation of extrats and essential oils from “poejo” *Cunila angustifolia* (Lamiales: Lamiaceae) leaves to control adults of maize weevil *sitophilus zeamais* (Coleopteran: Curculionidae). *International Journal of Entomological Research*, 2 (1), 23-28.
- Senatore, F., Urrunaga Soria, E., Urrunaga Soria, R., Della Porta, G., & De Feo, V. (1998). Essential oils from two Peruvian *Satureja* species. *Flavour and fragrance journal*, 13 (1), 1-4.
- Serrano, C., Matos, O., Teixeira, B., Ramos, C., Neng, N., Nogueira, J., Nunes, M. L. & Marques, A. (2011). Antioxidant and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(9), 1554-1560.

- Simmonds, M. S. J., & Blaney, W. M. (1992). Labiate-insect interactions: effects of labiate derived compounds on insect behaviour. *Advances in Labiate science*, 1, 375-392.
- Simões, C. M. O., Mentz, L.A., Schenkel, E. P., Irgang, B. E., Stehmann, J. R. (1994). Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul, 4th ed., Editora da Universidade/ UFRGS, Porto Alegre, Brazil.
- Skočibušić, M., & Bezić, N. (2004). Phytochemical analysis and in vitro antimicrobial activity of two *Satureja* species essential oils. *Phytotherapy Research*, 18(12), 967-970.
- Sneddon, L. U., Elwood, R. W., Adamo, S. A., & Leach, M. C. (2014). Defining and assessing animal pain. *Animal behaviour*, 97, 201-212.
- Taborsky, J., Kunt, M., Kloucek, P., Lachman, J., Zeleny, V., & Kokoska, L. (2012). Identification of potential sources of thymoquinone and related compounds in Asteraceae, Cupressaceae, Lamiaceae, and Ranunculaceae families. *Open Chemistry*, 10(6), 1899-1906.
- Tepe, B., & Cilkiz, M. (2016). A pharmacological and phytochemical overview on *Satureja*. *Pharmaceutical biology*, 54 (3), 375-412.
- Thai, V., Fainsinger, R. L. (2011). Pain en Palliative Care: Core Skills and Clinical Competencies (Segunda edición). Saunders, 95-113.
- Tjolsen, A., Berge, O.-G., Hunskaar, S., Rosland, J. H., Hole, K. (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, 51, 5-17.
- Tonussi, C. R., & Ferreira, S. H. (1994). Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. *European journal of pharmacology*, 251(2-3), 173-179.
- Torres-López, J. E., Ortiz, M. I., Castañeda-Hernández, G., Alonso-López, R., Asomoza-Espinosa, R., & Granados-Soto, V. (2002). Comparison of the antinociceptive effect of celecoxib, diclofenac and resveratrol in the formalin test. *Life sciences*, 70(14), 1669-1676.
- Torres-Martínez, R., García-Rodríguez, Y. M., Ríos-Chávez, P., Saavedra-Molina, A., López-Meza, J. E., Ochoa-Zarzosa, A., & Garciglia, R. S. (2017). Antioxidant activity of the essential oil and its major terpenes of *Satureja*

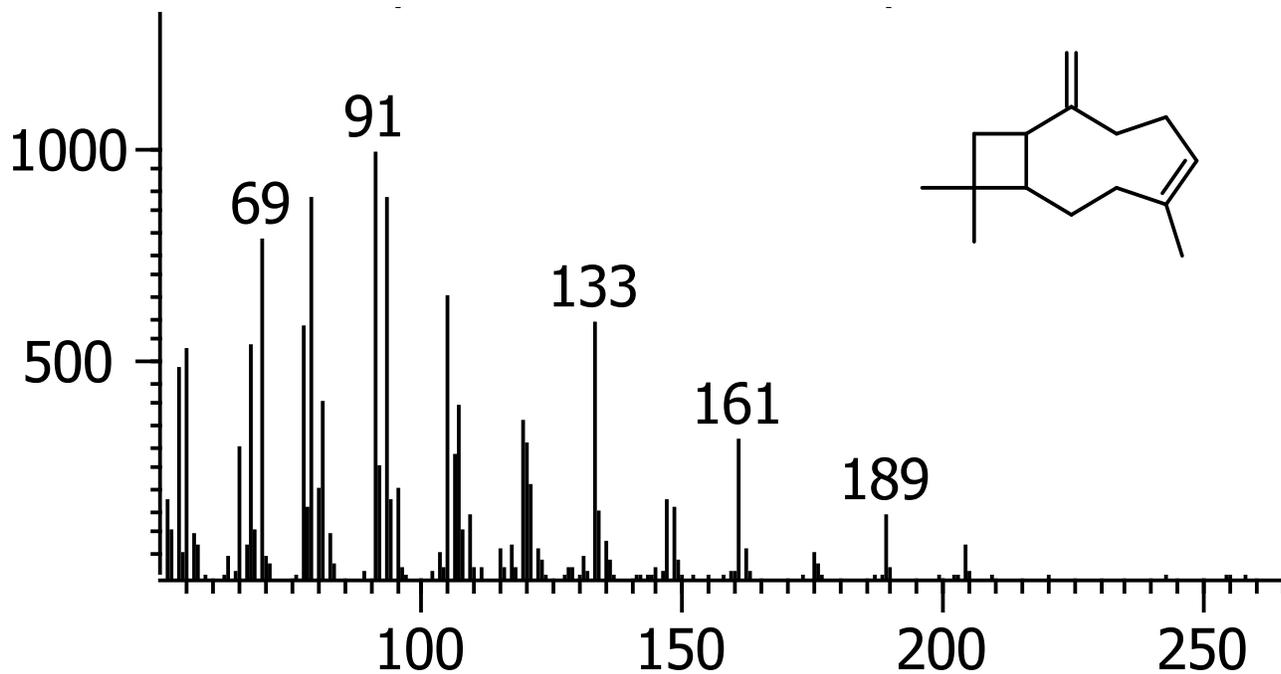
- macrostema (Moc. and Sessé ex Benth.) Briq. *Pharmacognosy magazine*, 13(Suppl 4), S875.
- Turner, B. L. (2008). Taxonomic status of *Clinopodium macrostemun* (Lamiaceae). *Phytologia*, 90(3), 411-413.
 - Ulku Karabay–Yavasoglu, N., Baykan, S., Ozturk, B., Apaydin, S., & Tuglular, I. (2006). Evaluation of the Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of *Satureja thymbra*. L. Essential Oil. *Pharmaceutical biology*, 44(8), 585-591.
 - Van Baren, C. M., Muschietti, L. V., Leo Lira, P. D., Coussio, J. D., & Bandoni, A. L. (2001). Volatile constituents from aerial parts of *Cunila spicata*. *Journal of Essential Oil Research*, 13(5), 351-353.
 - Van den Dool, H. & Kratz, P. D. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr. A*, 11, 463-471.
 - Vila, R., & Cañigüeral, S. (2005). La Fitoterapia como herramienta terapéutica. *Ginecología y obstetricia clínica*, 6(1), 43-51.
 - Viturro, C. I., Molina, A., Guy, I., Charles, B., Guinaudeau, H., & Fournet, A. (2000). Essential oils of *Satureja boliviana* and *S. parvifolia* growing in the region of Jujuy, Argentina. *Flavour and fragrance Journal*, 15 (6), 377-382.
 - Von Poser, G. L., Menut, C., Toffoli, M. E., Vérin, P., Sobral, M., Bessiere, J. M., Lamaty, G., & Henriques, A. T. (1996). Essential oil composition and allelopathic effect of the Brazilian Lamiaceae *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling and *Hesperozygis rhododon* Epling. *Journal of agricultural and food chemistry*, 44(7), 1829-1832.
 - Watson DG (1999). *Pharmaceutical Analysis*. Churchill Livingstone, Edinburgh.
 - WHO (2002). *General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine*. World Health Organization, Geneva.
 - WHO (1998). *Basic Tests for Drugs, Pharmaceutical Substances, Medicinal Plant Materials and Dosage Forms*. World Health Organization, Geneva.

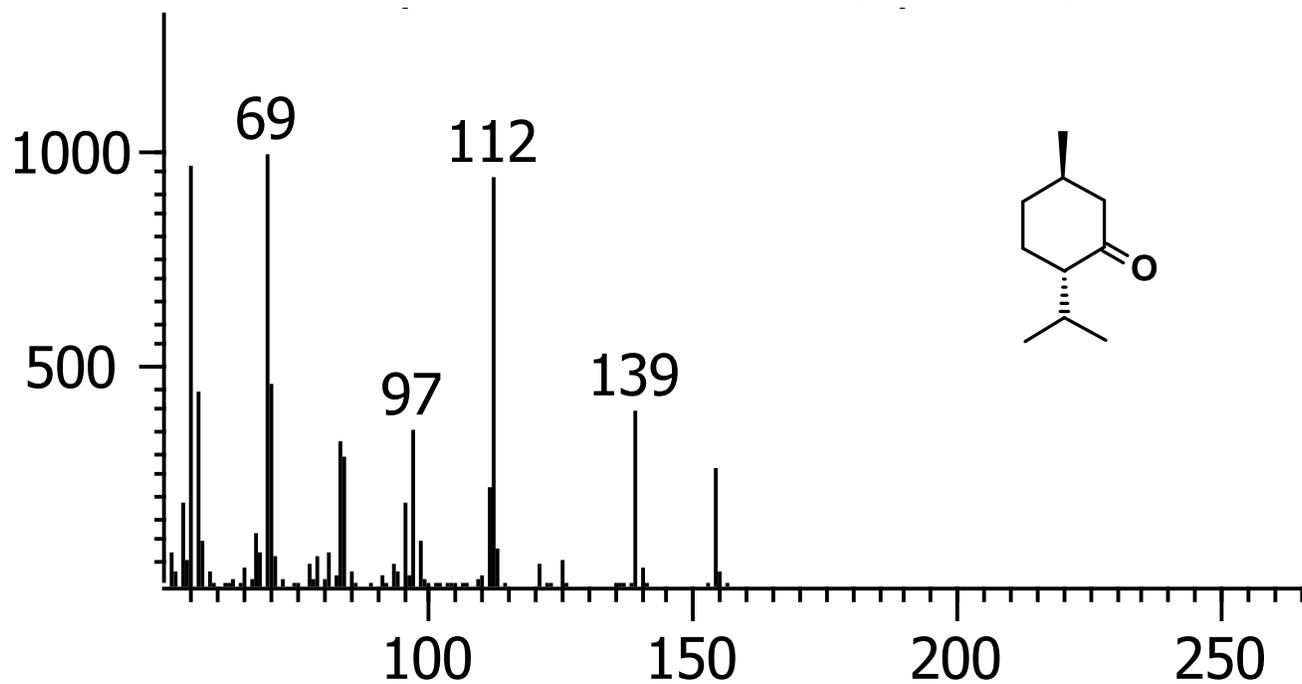
- WHO (1996a). Quality Assurance of Pharmaceuticals: A Compendium of Guidelines and Related Materials, Good Manufacturing Practices and Inspection. World Health Organization, Geneva. 2.
- WHO (1996b). Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines. WHO Technical Report Series, World Health Organization, Geneva. 863.
- WHO (1990). The Use of Essential Drugs. Eighth report of the WHO Expert committee. World Health Organization, Geneva.
- WHO (1988). Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials. World Health Organization, Geneva.
- Yang, S., Yang, A., Su, S., Wang, H., Wang, N., Chen, Q. (2012). Neuronostatin induces hyperalgesia in formalin test in mice. *Neuroscience Letters*, 506, 126-130.
- Zargari, A. (1990). *Medicinal Plants*. 4th ed. Tehran: Tehran University Publications, 42-45.
- Zani, F., Massimo, G., Benvenuti, S., Bianchi, A., Albasini, A., Melegari, M., Vampa, G., Belloti, A. & Mazza, P. (1991). Studies on the genotoxic properties of essential oils with *Bacillus subtilis* rec-assay and *Salmonella*/microsome reversion assay. *Planta medica*, 57(03), 237-241.

ANEXOS

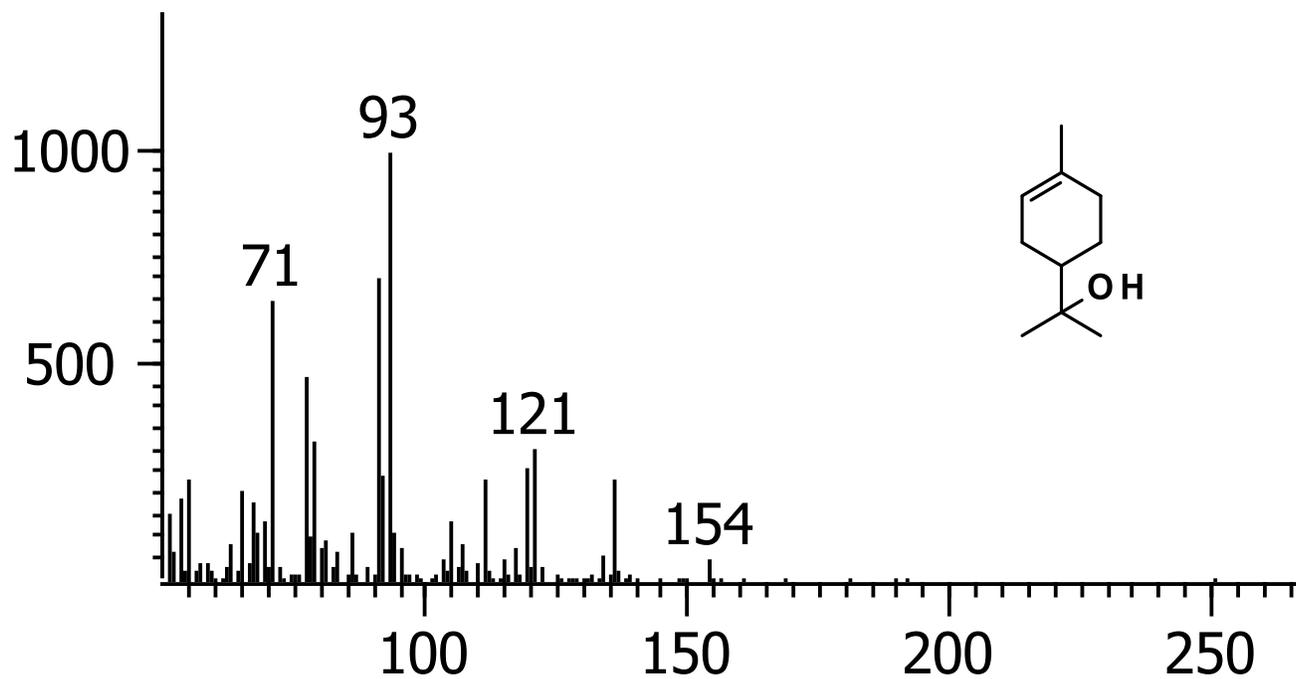


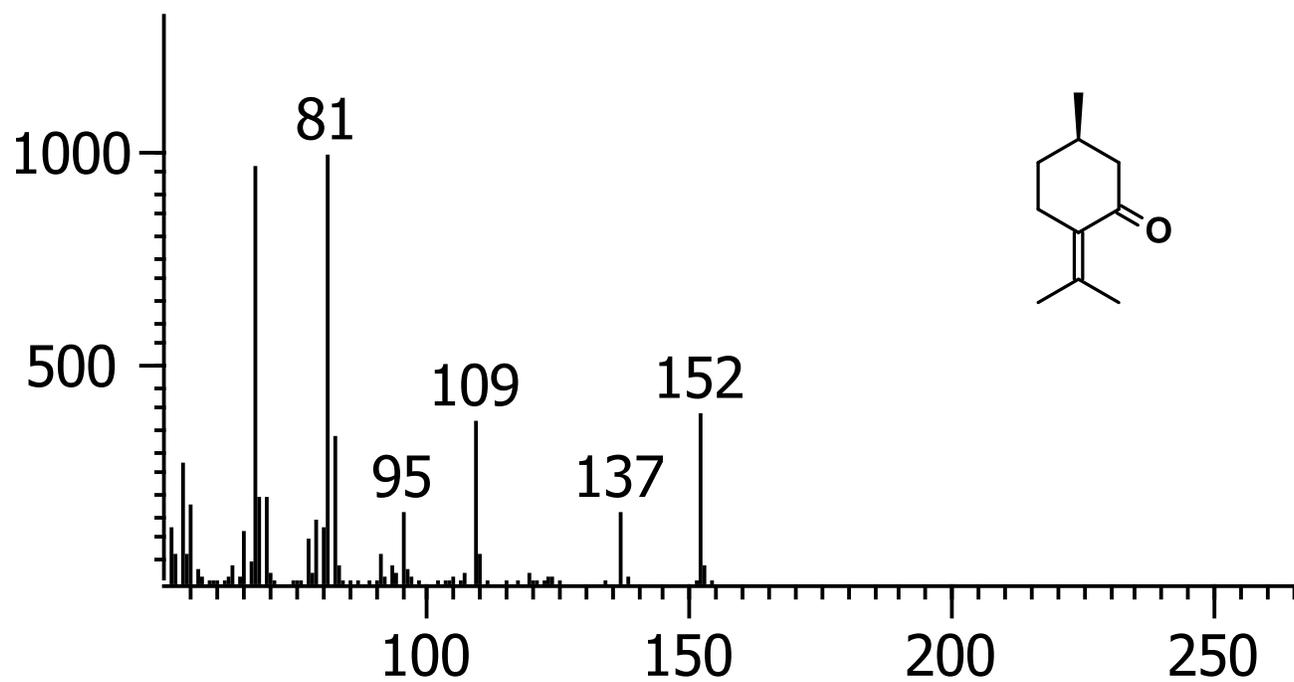
Espectro 1. Espectro de masas de linalool (9)

Espectro 2. Espectro de masas de β -cariofileno (11)

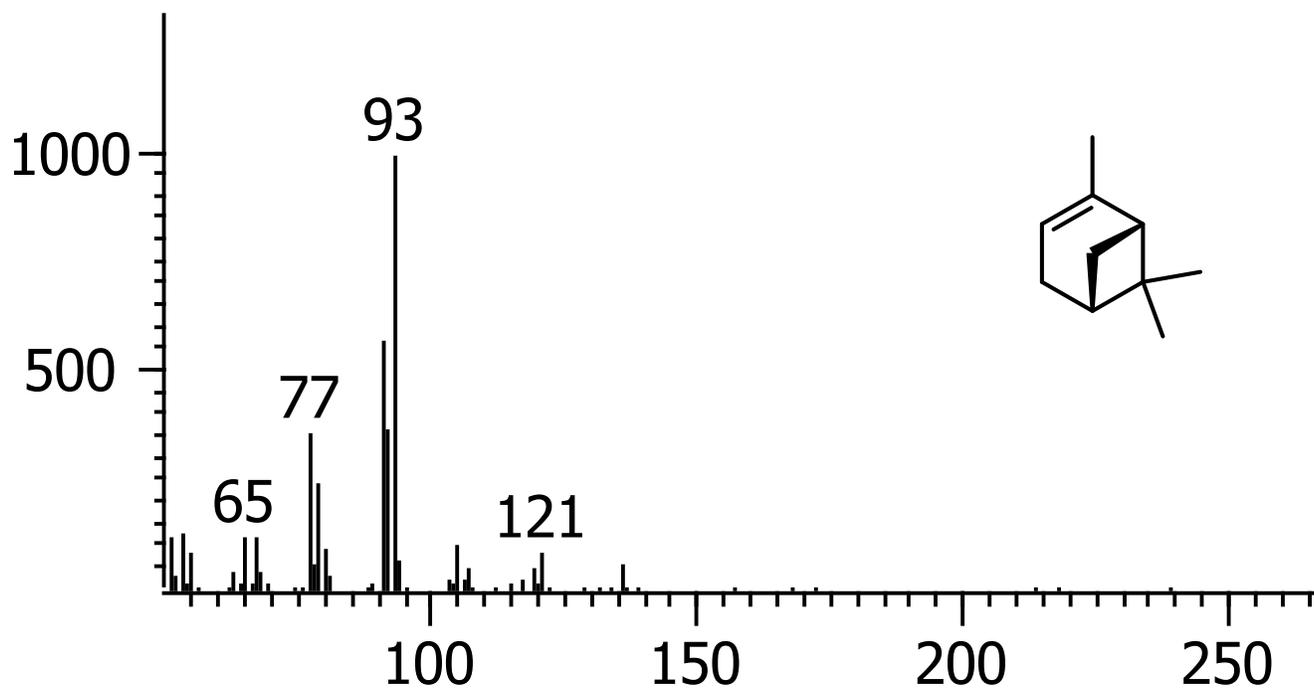


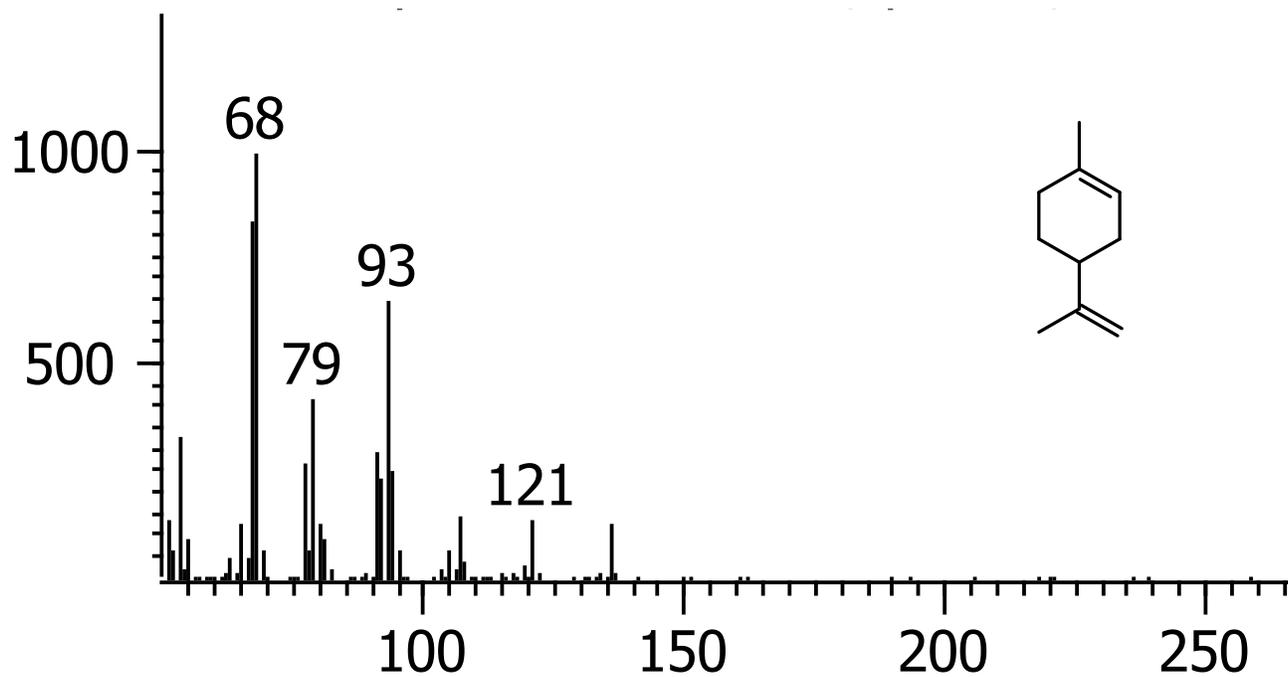
Espectro 3. Espectro de masas de mentona (12)

Espectro 4. Espectro de masas de α -terpineol (14)

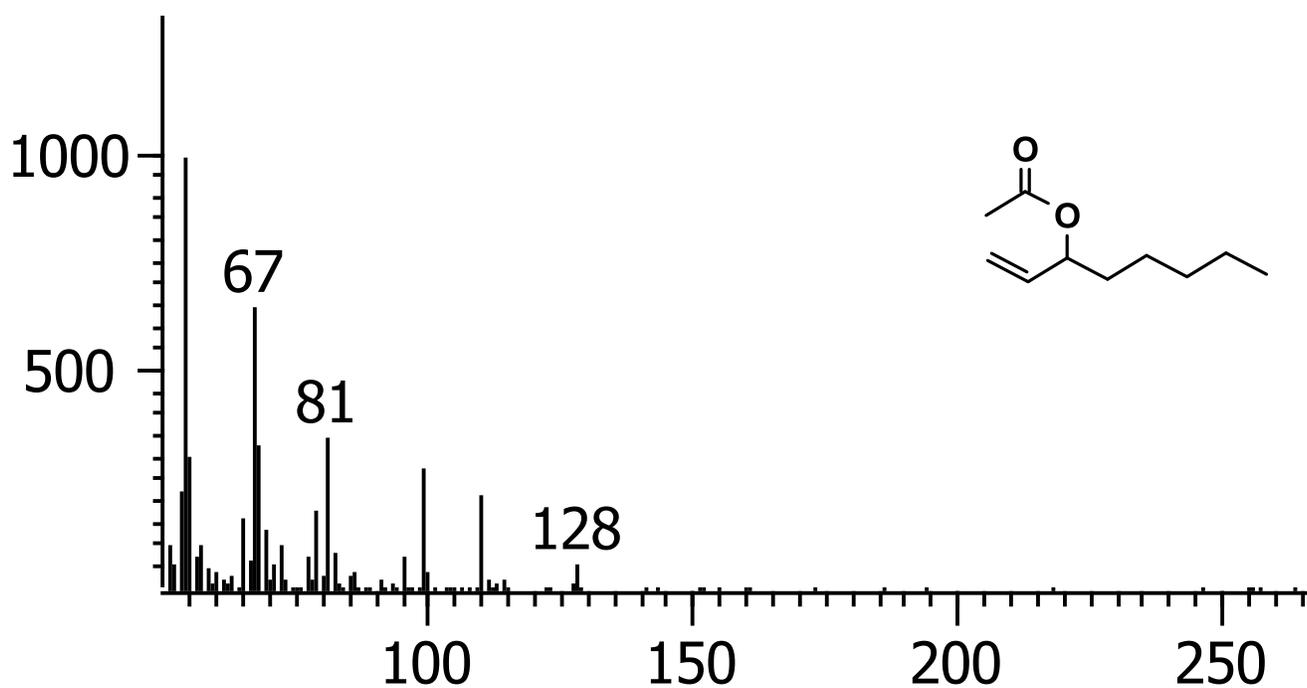


Espectro 5. Espectro de masas de pulegona (15)

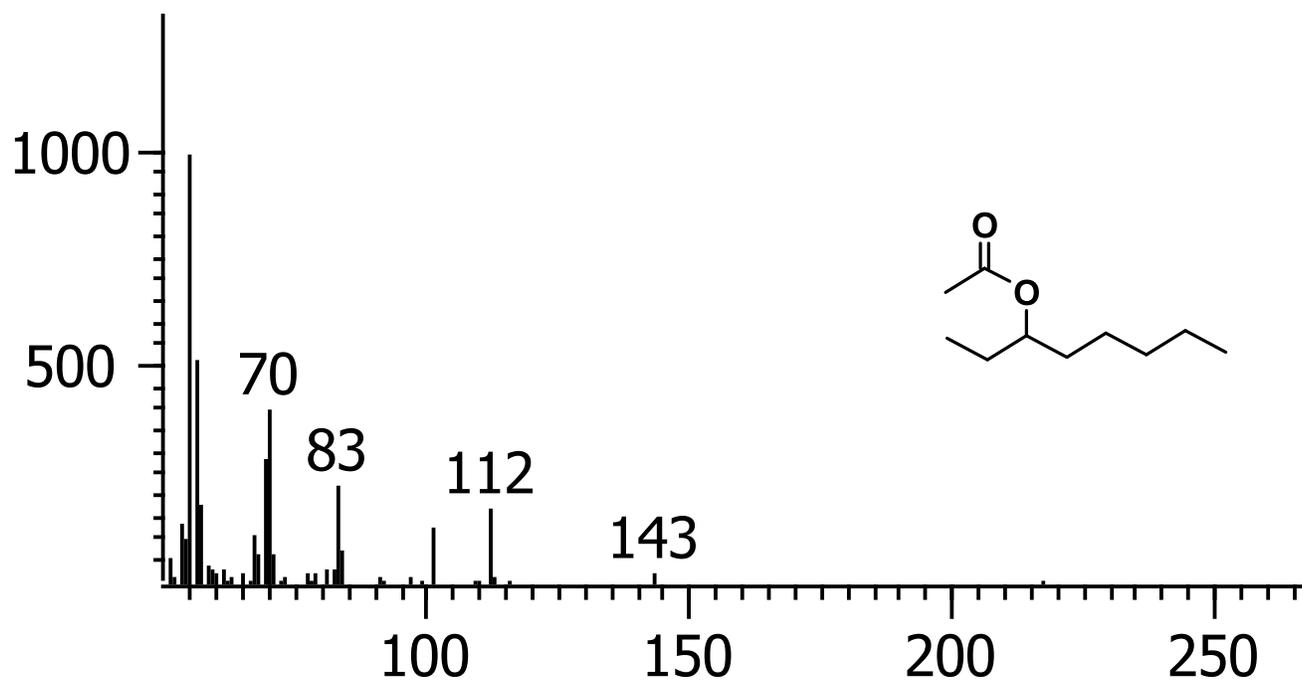
Espectro 6. Espectro de masas de α -pineno (16)



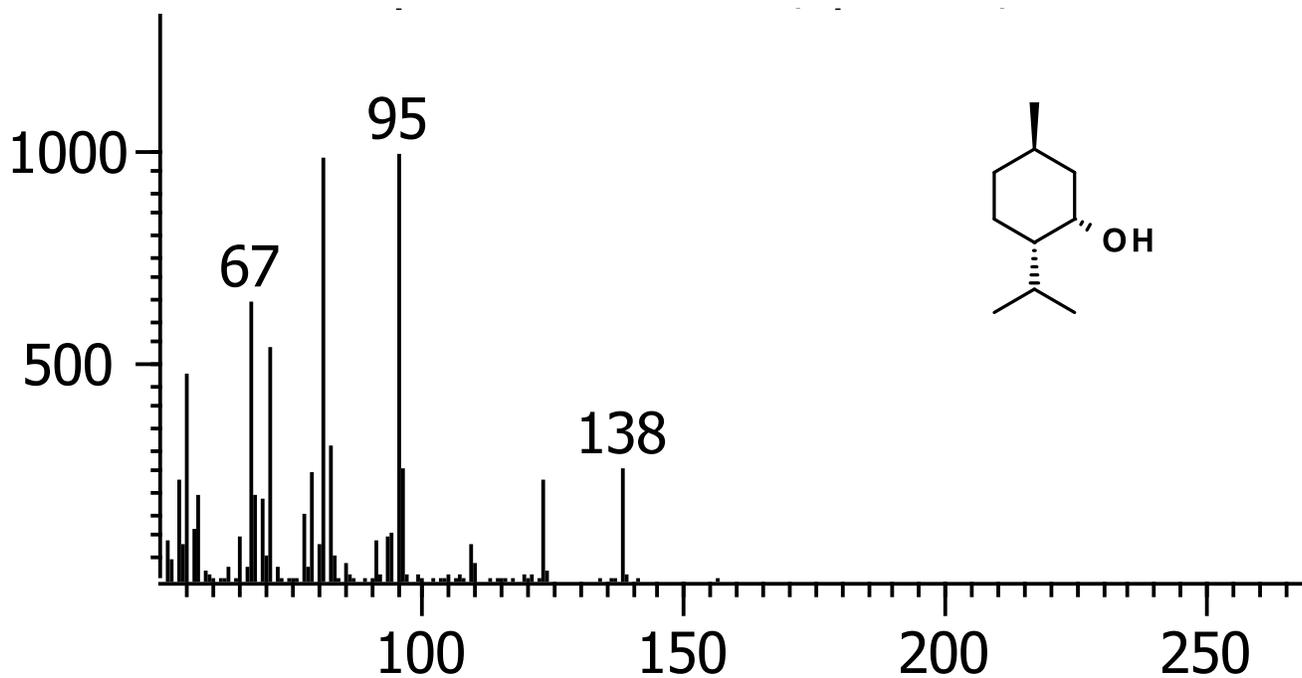
Espectro 7. Espectro de masas de D-limoneno (17)



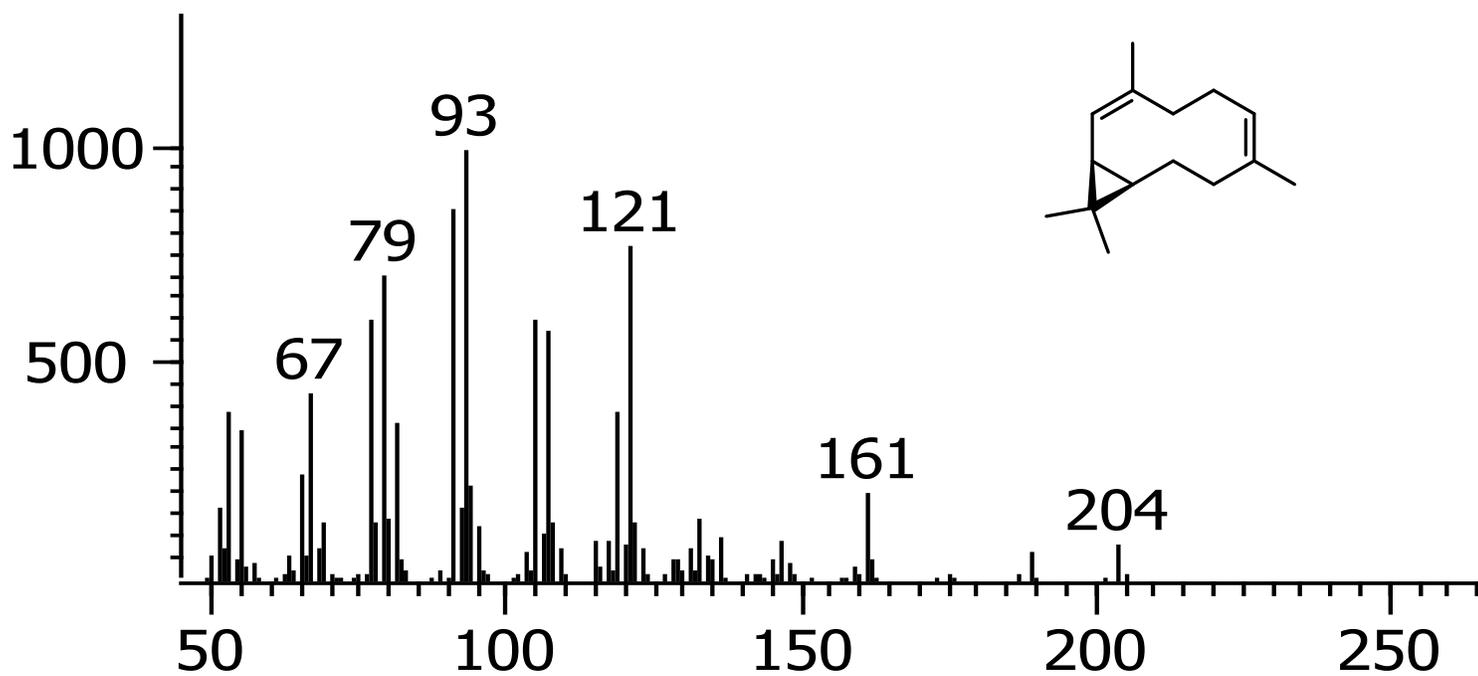
Espectro 8. Espectro de masas de acetato de 1-octen-3-ilo (18)



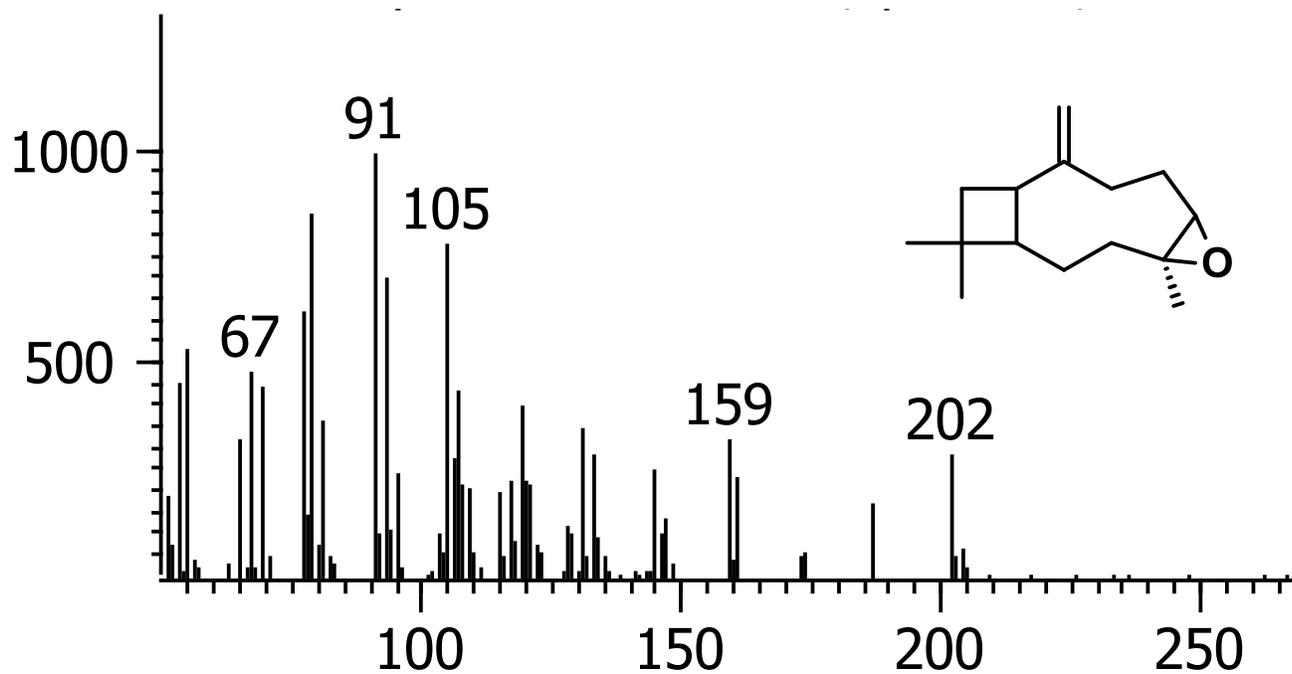
Espectro 9. Espectro de masas de acetato de 3-octanol (19)



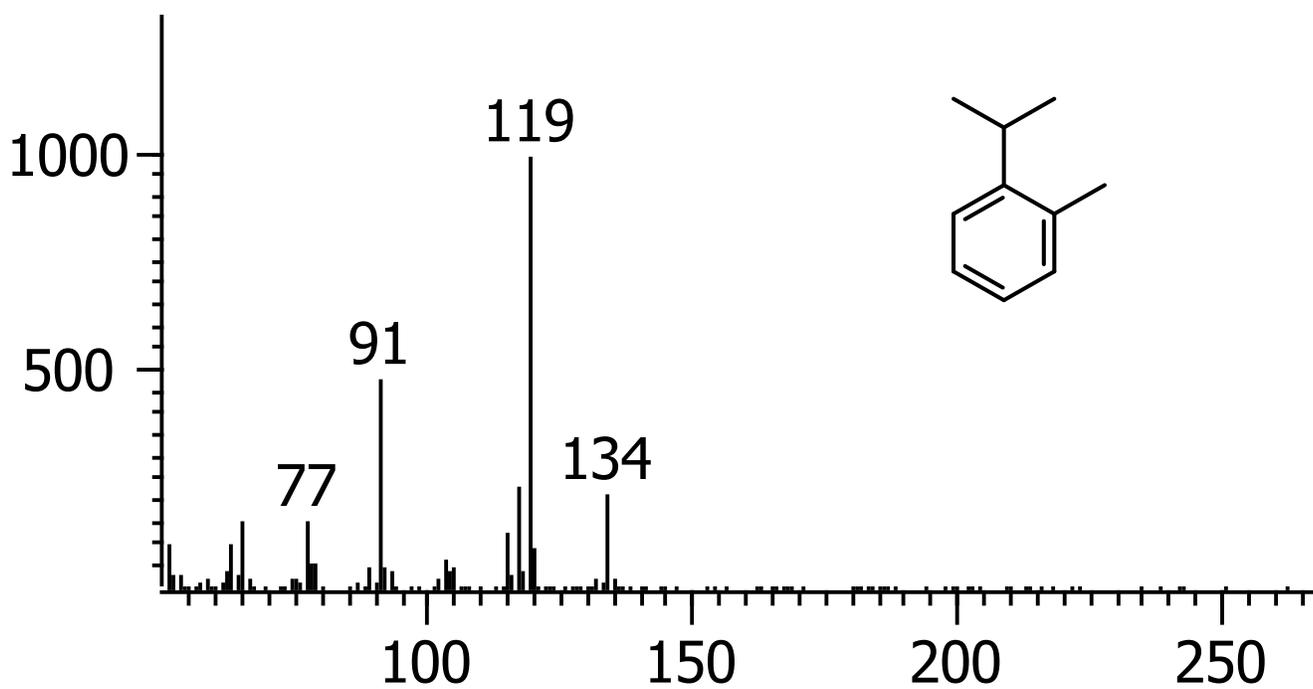
Espectro 10. Espectro de masas de neo-mentol (20)



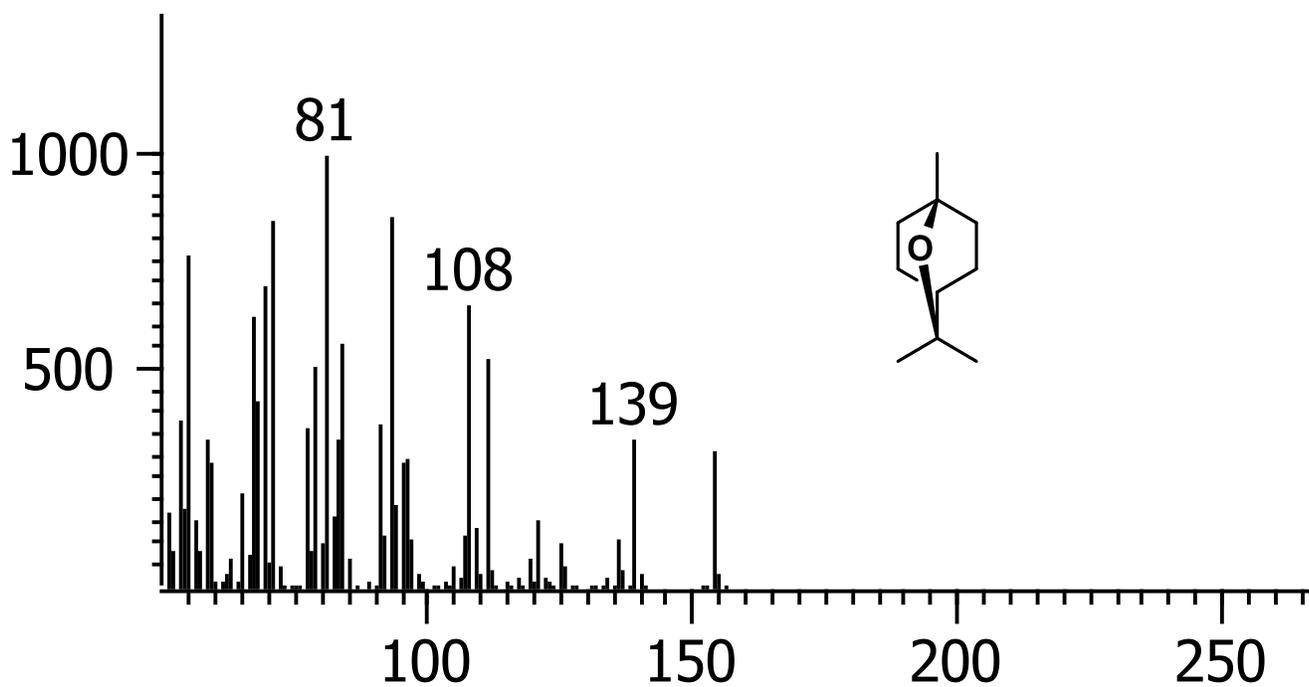
Espectro 11. Espectro de masas de bicylogermacreno (21)



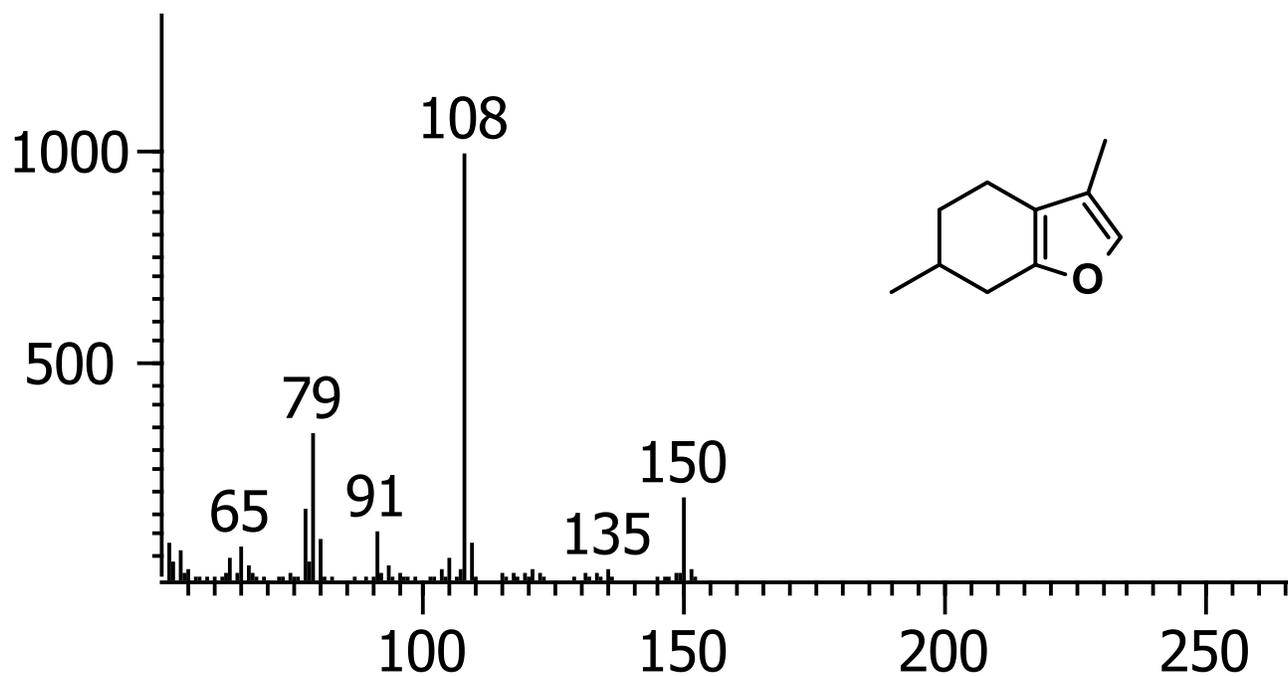
Espectro 12. Espectro de masas de óxido de cariofileno (22)



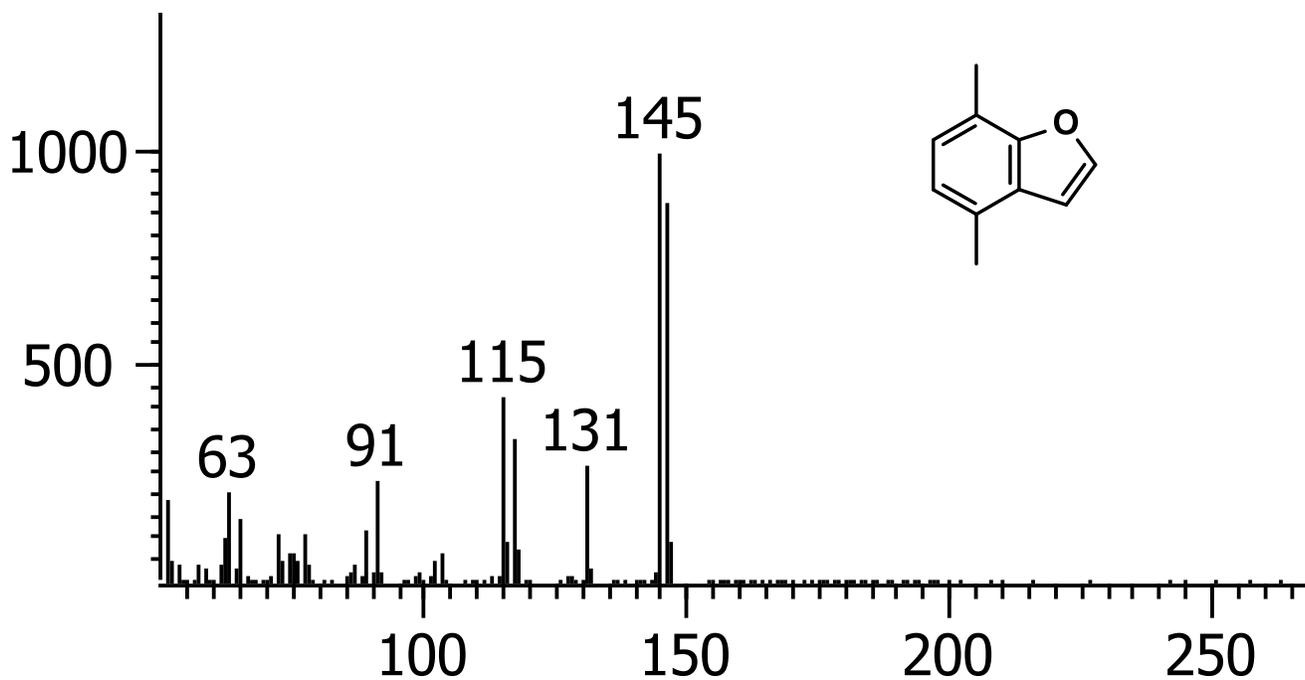
Espectro 13. Espectro de masas de o-cimeno (23)



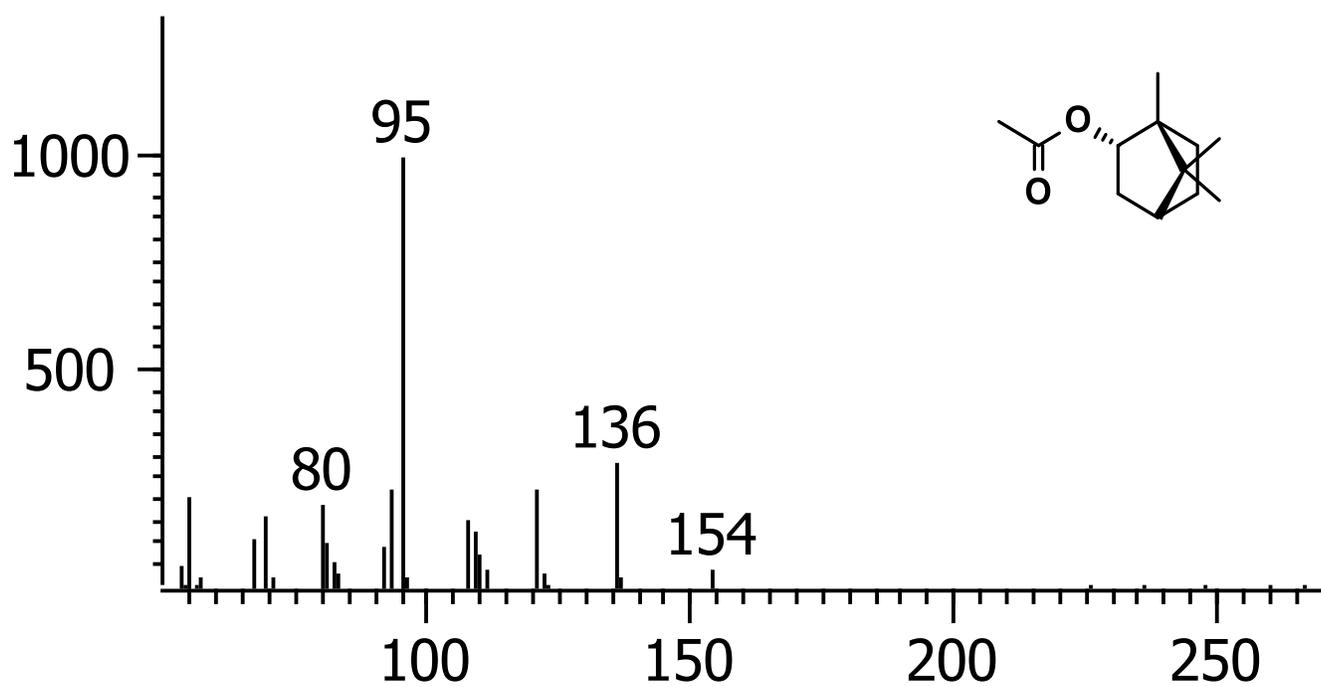
Espectro 14. Espectro de masas de eucaliptol (24)



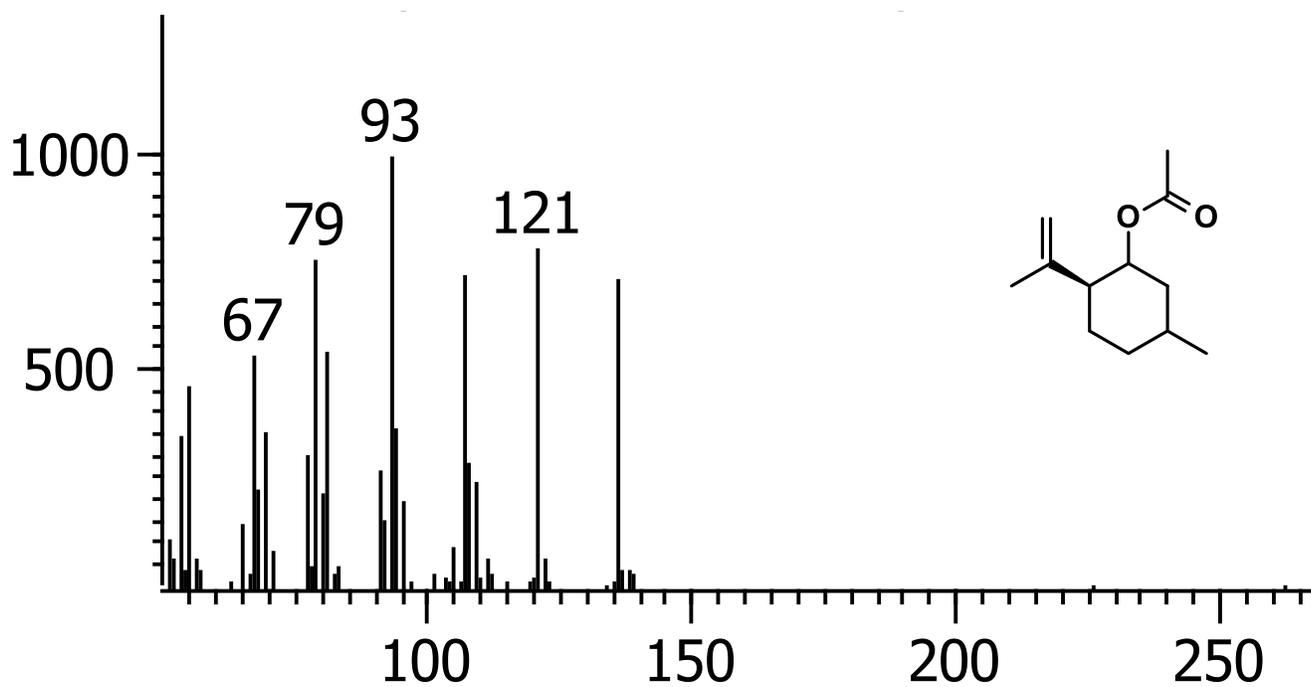
Espectro 15. Espectro de masas de mentofurano (25)



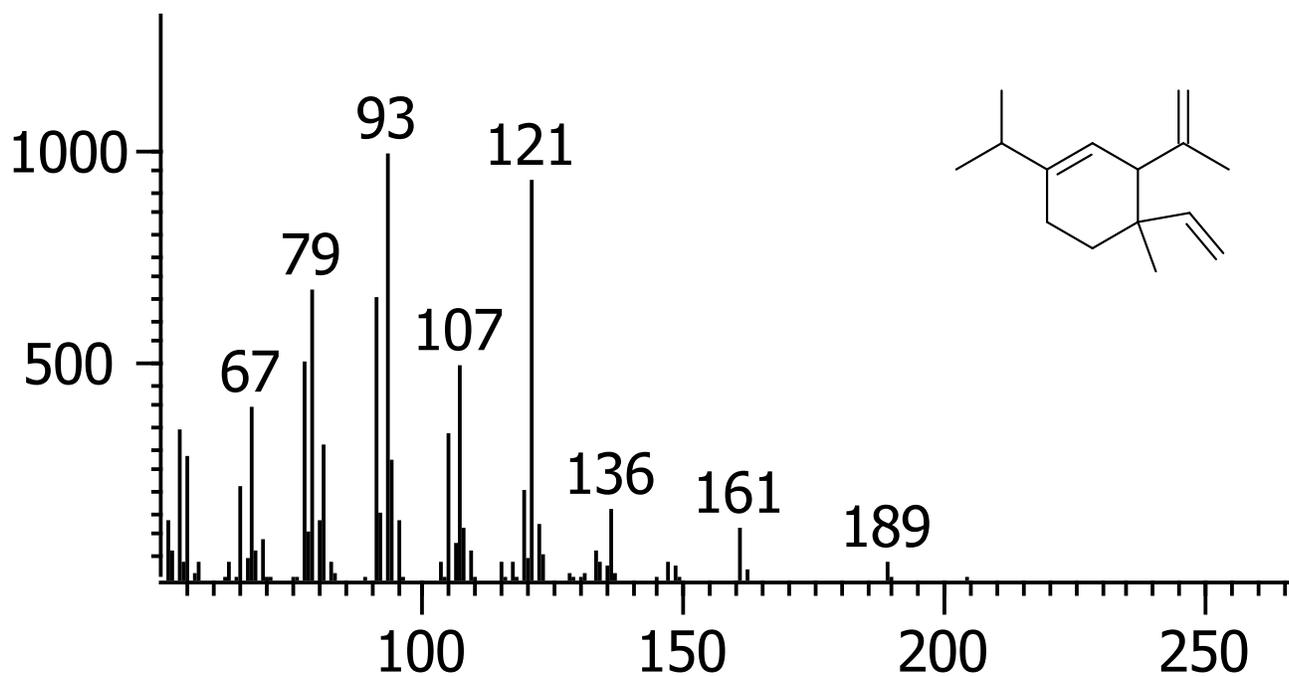
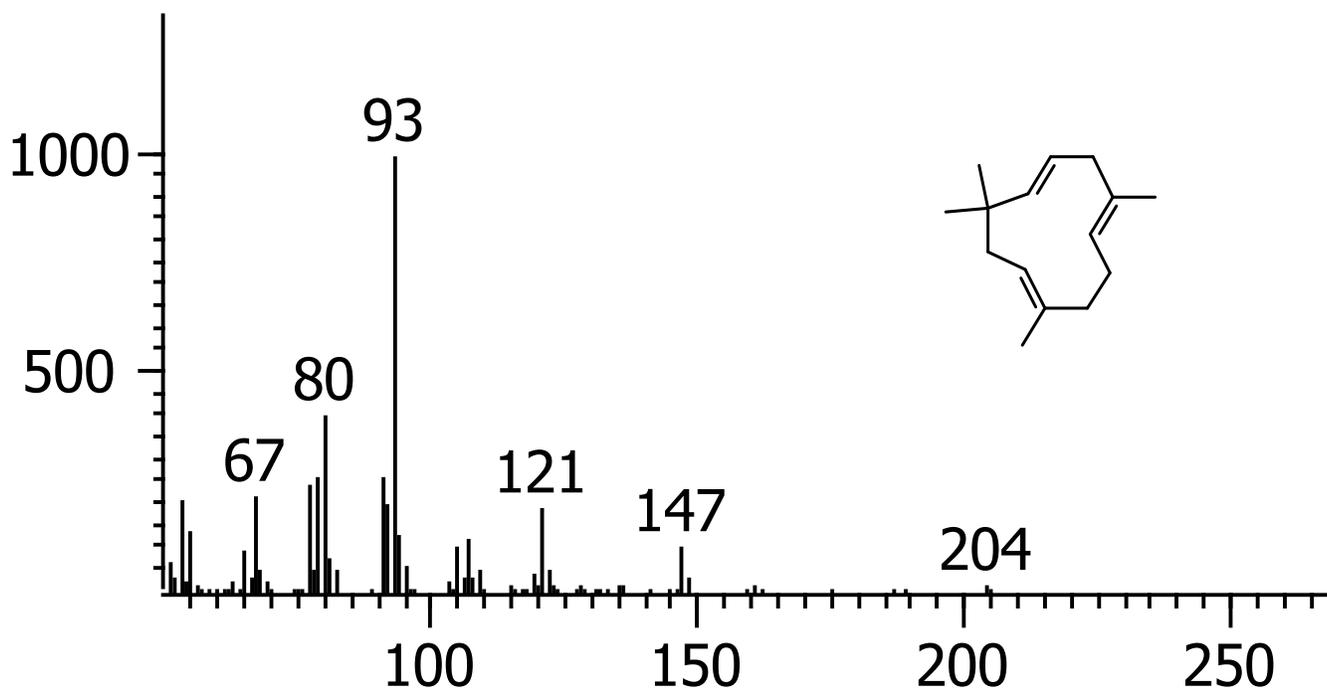
Espectro 16. Espectro de masas de 4,7-dimetil benzofurano (26)

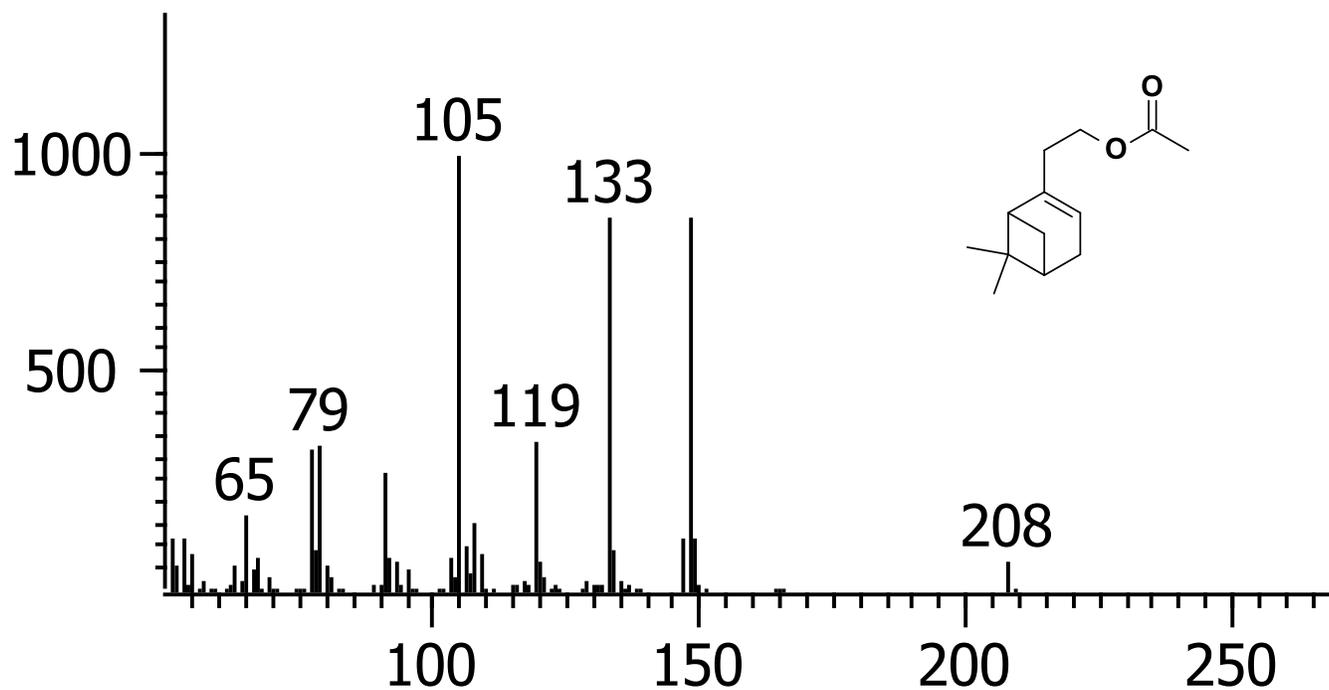


Espectro 17. Espectro de masas de acetato de bornilo (27)

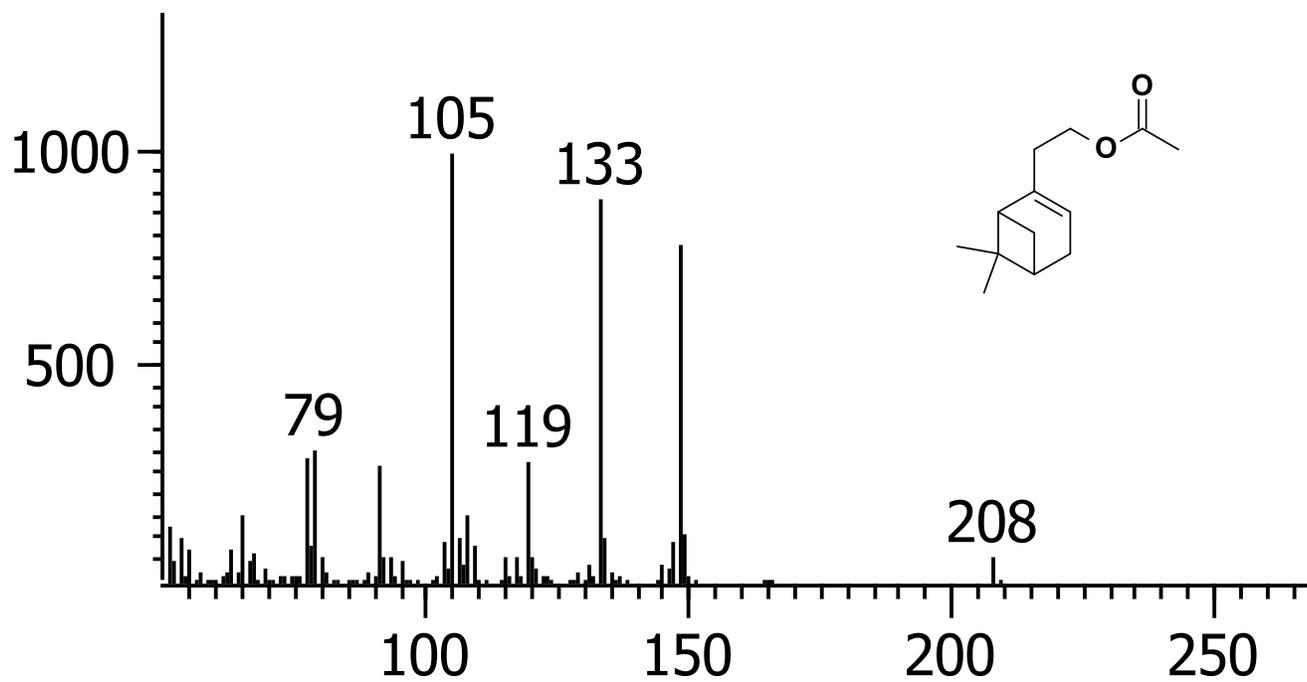


Espectro 18. Espectro de masas de acetato de isopulegol (28)

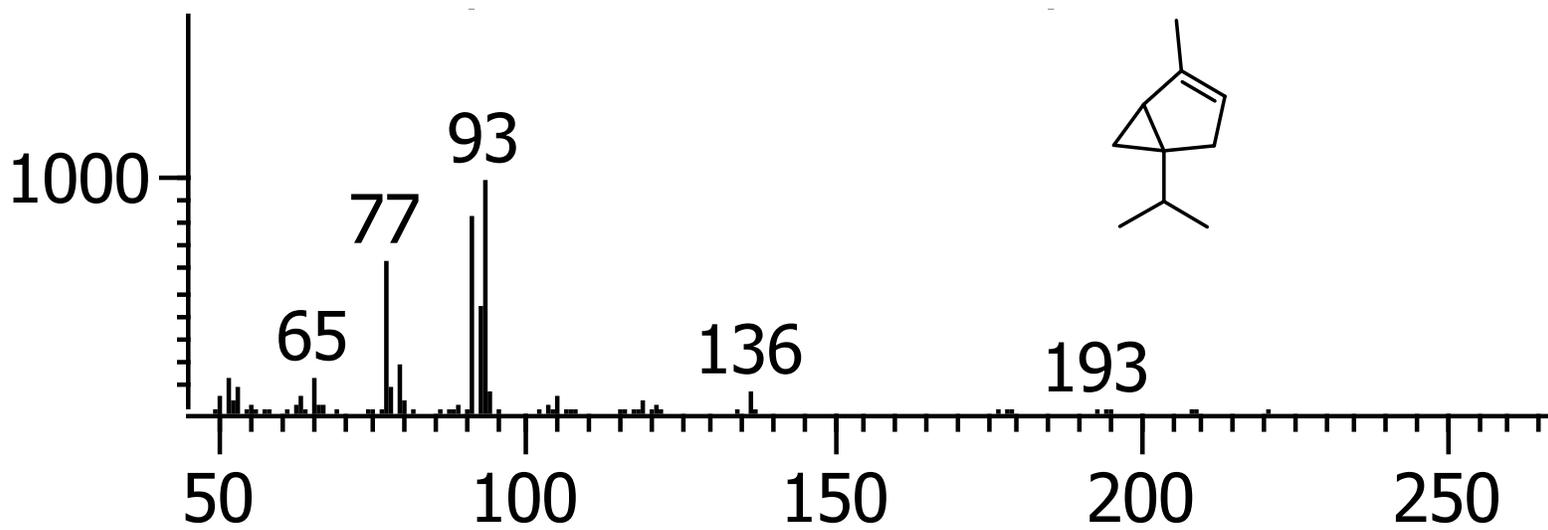
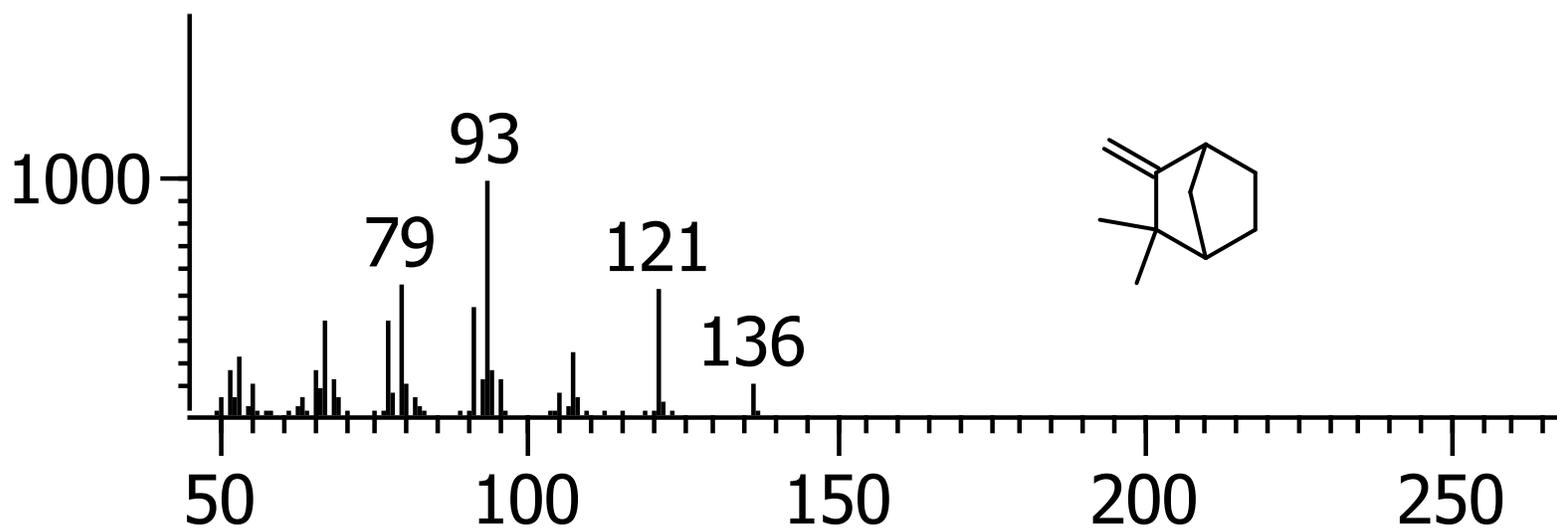
Espectro 19. Espectro de masas de δ -elemeno (29)Espectro 20. Espectro de masas de α -cariofileno (30)



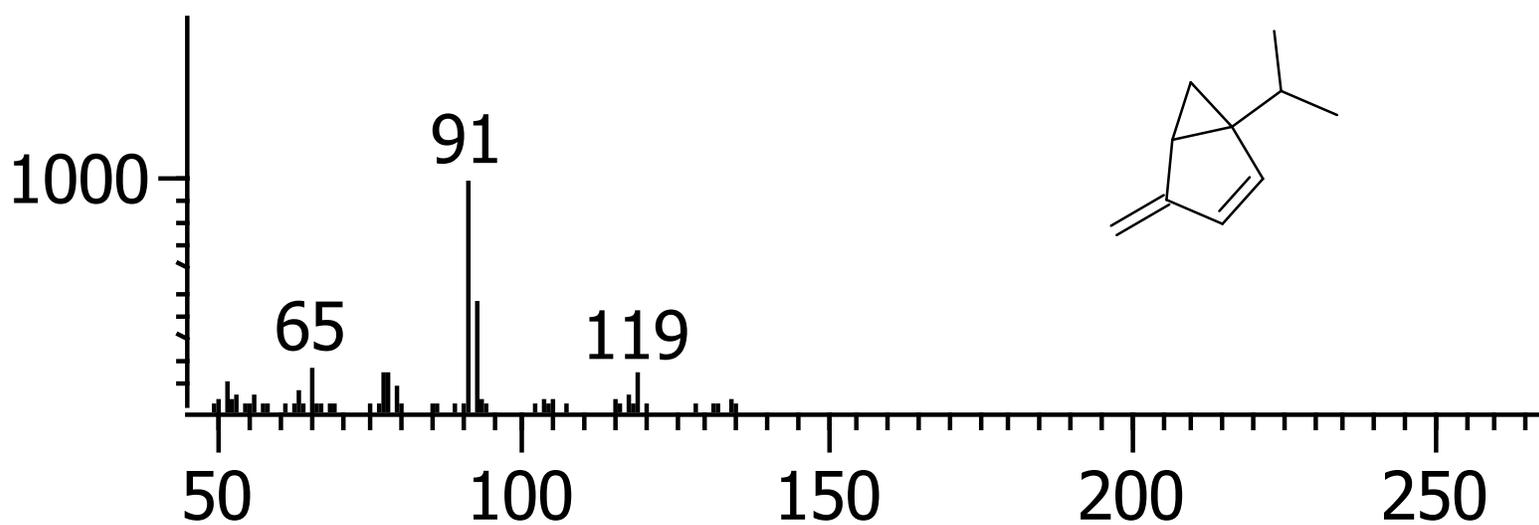
Espectro 21. Espectro de masas de acetato de nopilo (31)



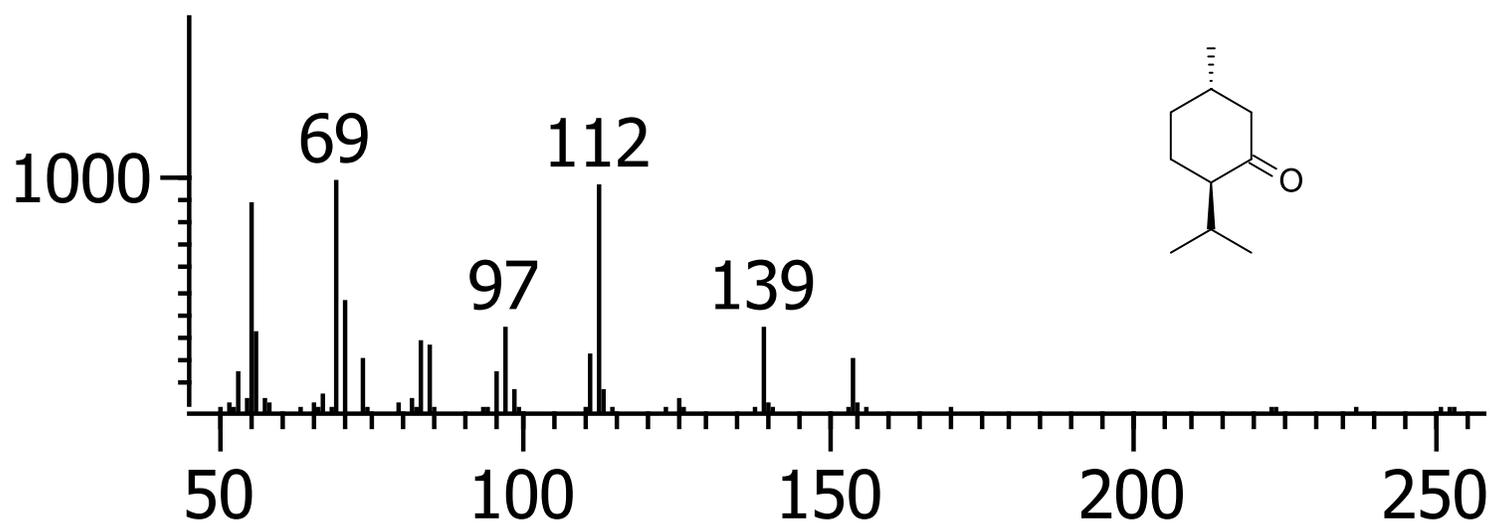
Espectro 22. Espectro de masas de acetato de nopilo (32)

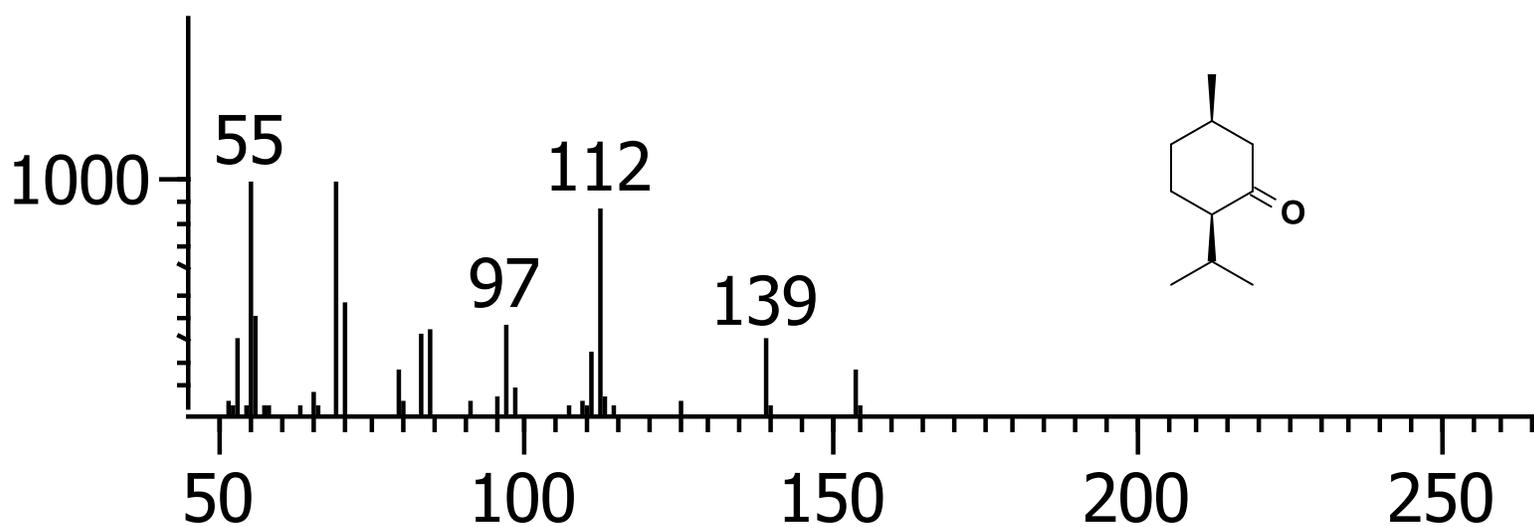
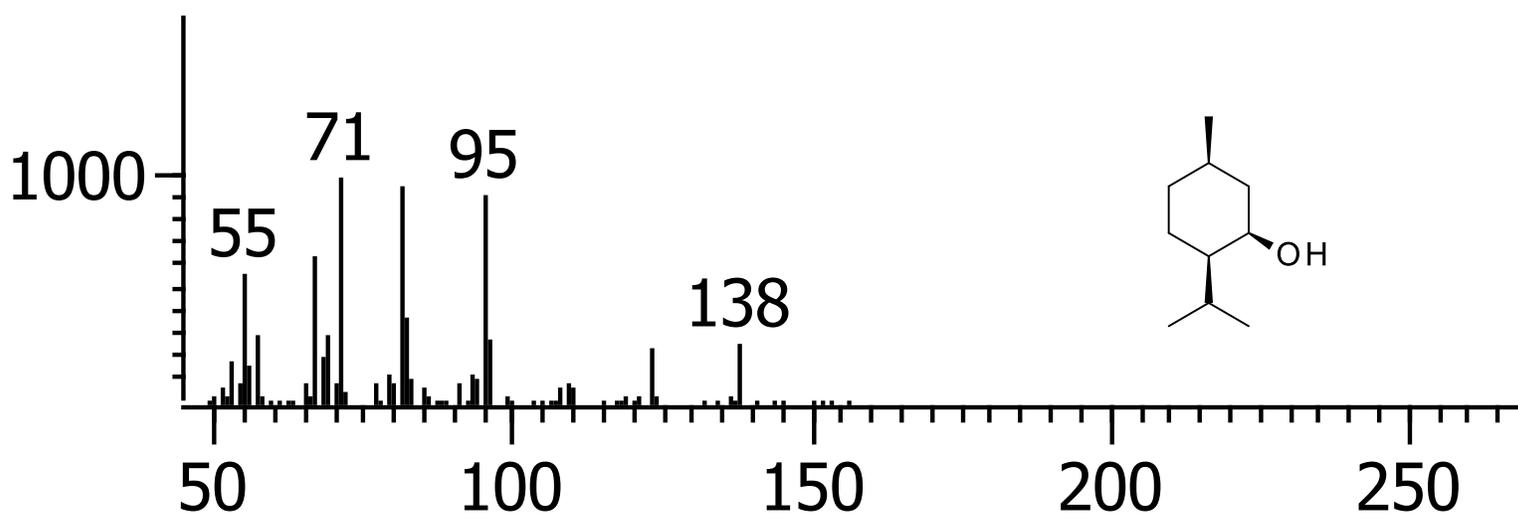
Espectro 23. Espectro de masas de α -tujeno (33)

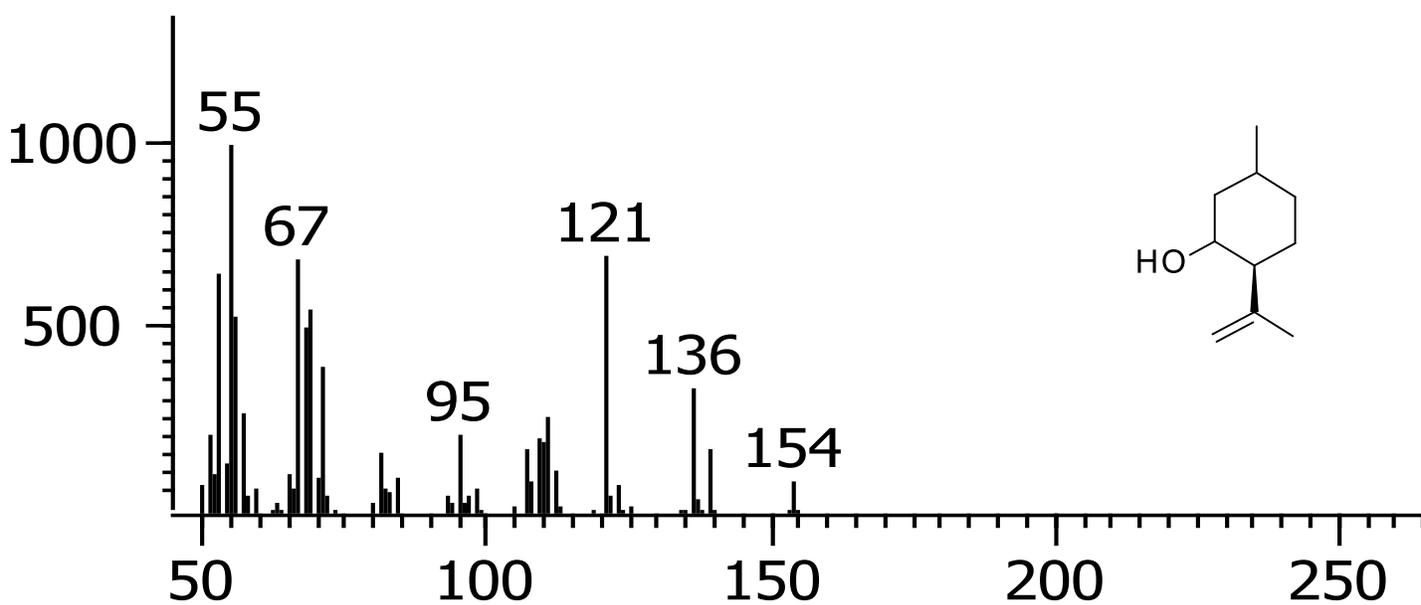
Espectro 24. Espectro de masas de canfeno (34)



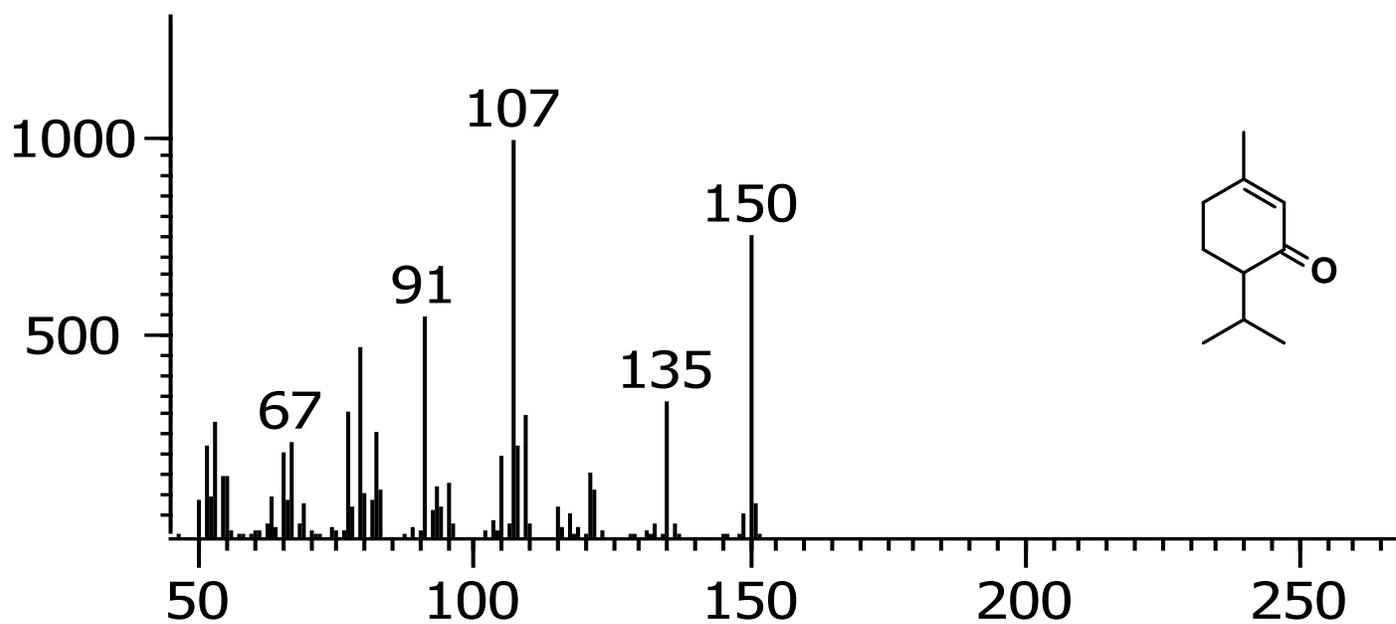
Espectro 25. Espectro de masas de 2,4-tujadieno (35)

Espectro 26. Espectro de masas de *trans-p*-mentona (36)

Espectro 27. Espectro de masas de *cis-p*-mentona (37)Espectro 28. Espectro de masas de *neo*-isomentol (38)



Espectro 29. Espectro de masas de isopulegol (39)



Espectro 30. Espectro de masas de piperitona (40)