



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOMEDICINA

**Fitoquímica y farmacología de *Salvia semiatrata* Zucc. Lamiaceae**

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**NANCY ORTIZ MENDOZA**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. EVA AGUIRRE HERNÁNDEZ  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA EVA GONZÁLEZ TRUJANO  
INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA RAMÓN DE LA FUENTE

DRA. MARTHA JUANA MARTÍNEZ GORDILLO  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**CD. MX. ENERO, 2020**



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.



## OFICIO DE EMPASTE



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

OFICIO FCIE/DAIP/1024/2019

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas y Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 4 de noviembre de 2019 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en el campo de conocimiento de Biomedicina de la estudiante ORTIZ MENDOZA NANCY con número de cuenta 411003371 con la tesis titulada "Fitoquímica y farmacología de *Salvia semiatrata* Zucc. Lamiaceae", realizada bajo la dirección de la DRA. EVA AGUIRRE HERNANDEZ, quedando integrado de la siguiente manera:

|             |   |
|-------------|---|
| Presidente: | DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ      |
| Vocal:      | DR. RICARDO REYES CHILPA                |
| Secretario: | DRA. MARTHA JUANA MARTÍNEZ GORDILLO     |
| Suplente:   | M. EN C. BALDOMERO ESQUIVEL RODRÍGUEZ   |
| Suplente:   | M. EN C. FRANCISCO ALBERTO BASURTO PEÑA |

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 21 de noviembre de 2019

COORDINADOR DEL PROGRAMA

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA

AGNS/MMVA/ASR/grf\*



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
UNIDAD DE POSGRADO

Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria  
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX  
Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**BIOMEDICINA**

**Fitoquímica y farmacología de *Salvia semiatrata* Zucc. Lamiaceae**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**NANCY ORTIZ MENDOZA**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. EVA AGUIRRE HERNÁNDEZ**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA EVA GONZÁLEZ TRUJANO**  
INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA RAMÓN DE LA FUENTE

**DRA. MARTHA JUANA MARTÍNEZ GORDILLO**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**MÉXICO, CD. MX. ENERO, 2020**

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT, por la beca número 477874 (CVU 850320).

Investigación realizada gracias al programa UNAM-PAPIIT-IN218418

### **A los miembros del comité tutor:**

Dra. Eva Aguirre Hernández

Dra. María Eva González Trujano

Dra. Martha Juana Martínez Gordillo

Al Bioterio de la Facultad de Ciencias por el apoyo brindado para la realización de este proyecto. Asimismo, agradezco la asesoría técnica proporcionada por el M. en C. Agustín Carmona Castro y el M. en C. Christian Alan Cabello Hernández.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONALES**

A todas las personas que día a día a lo largo de este episodio, compartieron conmigo un pensamiento, les deseo:

salud física, emocional, mental y espiritual.



## ÍNDICE

|   |     |
|---|-----|
| RESUMEN.....  | 13  |
| ABSTRACT.....   | 14  |
| 1. INTRODUCCIÓN.....  | 15  |
| 2. JUSTIFICACIÓN.....   | 18  |
| 3. OBJETIVO.....  | 19  |
| 4. HIPÓTESIS .....  | 19  |
| 5. ANTECEDENTES.....  | 20  |
| 5.1. Medicina tradicional .....   | 20  |
| 5.2. Plantas medicinales.....   | 21  |
| 5.3. Distribución de la familia Lamiaceae.....                                    | 22  |
| 5.4. El género <i>Salvia</i> en México.....                                       | 23  |
| 5.5. <i>Salvia</i> en la medicina tradicional mexicana.....                       | 24  |
| 5.6. Farmacología del género <i>Salvia</i> .....                                  | 27  |
| 5.7. Fitoquímica del género <i>Salvia</i> .....                                   | 30  |
| 5.8. Metabolitos secundarios con actividad sobre el sistema nervioso central..... | 34  |
| 5.9. <i>Salvia semiatrata</i> Zucc. (Lamiaceae) .....                             | 37  |
| 5.10. La ansiedad y sus trastornos.....   | 41  |
| 5.10.1. Epidemiología de los trastornos de ansiedad.....                          | 42  |
| 5.10.2. Fisiología de la<br>ansiedad.....   | 432 |
| 5.10.2.1. Ansiedad y cerebro.....   | 43  |
| 5.10.3. Neurotransmisores implicados en la modulación de la ansiedad.....         | 44  |
| 5.10.4. Medicamentos con acción ansiolítica.....                                  | 46  |
| 5.11. Dolor .....   | 48  |
| 5.11.1. Epidemiología del dolor abdominal.....                                    | 48  |
| 5.11.2. Bases estructurales y anatomía del dolor.....                             | 49  |
| 5.11.3. Neurobiología del dolor.....  | 49  |
| 5.11.3.1. Vías del control nociceptivo .....                                      | 50  |
| 5.11.4. Taxonomía del dolor.....  | 52  |

|  |    |
|--|----|
| 5.11.5. Dolor nociceptivo.....   | 52 |
| 5.11.6. Dolor agudo.....   | 53 |
| 5.11.7. Dolor visceral.....  | 53 |
| 5.11.8. Fármacos para tratar el dolor.....   | 54 |
| 5.12. Alternativas para el tratamiento de los trastornos de ansiedad y dolor.....                                  | 56 |
| 5.13. Modelos animales para la evaluación de los trastornos de ansiedad y la<br>nocicepción.....                   | 57 |
| 5.13.1. Modelos para el estudio de la ansiedad.....  | 58 |
| 5.13.1.1. Campo abierto.....   | 58 |
| 5.13.1.2. Tablero con orificios.....   | 59 |
| 5.13.1.3. Laberinto elevado en cruz.....   | 59 |
| 5.12.2 Potenciación de la hipnosis inducida con pentobarbital sódico (PS).....                                     | 60 |
| 5.12.3. Modelos para el estudio del dolor.....   | 61 |
| 5.12.3.1. Prueba de Writhing.....  | 62 |
| 6. MÉTODO.....   | 63 |
| 6.1. Colecta de <i>S. semiatrata</i> .....   | 63 |
| 6.2. Obtención de los extractos.....   | 63 |
| 6.3. Sujetos experimentales.....   | 65 |
| 6.4. Preparación de extractos y fármacos.....  | 65 |
| 6.5. Determinación de la toxicidad oral aguda .....  | 65 |
| 6.6. Evaluación del efecto ansiolítico .....   | 66 |
| 6.7. Potenciación de la hipnosis inducida con pentobarbital sódico (PS).....                                       | 67 |
| 6.8. Evaluación de la actividad antinociceptiva.....   | 67 |
| 6.9. Identificación de los compuestos presentes en los extractos mediante<br>cromatografía en capa fina (CCF)..... | 68 |
| 6.10. Análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) de los<br>extractos.....                    | 69 |
| 6.10.1. Elaboración de las curvas patrón .....   | 69 |
| 6.11. Separación y análisis de los componentes de los extractos activos .....                                      | 70 |
| 6.12. Análisis estadístico.....  | 71 |
| 7. RESULTADOS.....   | 72 |

|  |     |
|--|-----|
| 7.1. Rendimiento de los extractos.....   | 72  |
| 7.2. Determinación de la toxicidad oral aguda.....   | 73  |
| 7.3. Efecto ansiolítico de los extractos.....  | 74  |
| 7.4. Potenciación de la hipnosis inducida por PS.....  | 75  |
| 7.5. Efecto antinociceptivo de los extractos.....  | 76  |
| 7.6. Evaluación de las curvas dosis-respuestas de los extractos activos.....   | 77  |
| 7.6.1. Evaluación del efecto ansiolítico del extracto de hexano.....   | 77  |
| 7.6.2. Potenciación de la hipnosis inducida con pentobarbital sódico del<br>extracto de hexano.....  | 78  |
| 7.6.3. Evaluación del efecto ansiolítico del extracto de acetato de etilo.....   | 79  |
| 7.6.4. Potenciación de la hipnosis inducida con PS del extracto de acetato de<br>etilo.....  | 80  |
| 7.6.5. Evaluación del efecto antinociceptivo de los extractos de hexano, acetato<br>de etilo y acetona/metanol.....                                  | 81  |
| 7.7. Identificación de los compuestos presentes en los extractos mediante CCF....  | 83  |
| 7.8. Análisis por CLAR de los extractos orgánicos y acuoso de <i>S. semiatrata</i> .....   | 84  |
| 7.9. Separación y análisis de los componentes de los extractos activos.....  | 86  |
| 7.9.1. Análisis de los componentes del extracto de hexano.....   | 86  |
| 7.9.2. Análisis de los componentes del extracto de acetato de etilo .....  | 87  |
| 7.9.3. Aislamiento y caracterización del 7-ceto-neoclerodan-3,13-dien<br>18,19:15,16-diólida.....  | 91  |
| 7.10. Efecto ansiolítico y potenciación de la hipnosis inducida con pentobarbital<br>sódico del -ceto-neoclerodan-3,13-dien-18,19:15,16-diólida..... | 92  |
| 7.10.1. Efecto ansiolítico.....  | 92  |
| 7.10.2. Potenciación de la hipnosis inducida con PS.....   | 93  |
| 7.11. Evaluación de la curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo del -ceto-<br>neoclerodan-3,13-dien-18,19:15,16-diólida .....                | 94  |
| 8. DISCUSIÓN .....   | 95  |
| 9. CONCLUSION.....   | 99  |
| 10. REFERENCIAS.....   | 100 |

## LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

### Índice de figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Porcentaje de especies del género <i>Salvia</i> con estudio etnobotánico, fitoquímico y/o farmacológico.....                                 | 24 |
| <b>Figura 2.</b> Número de metabolitos secundarios aislados y caracterizados del género <i>Salvia</i> .....   | 30 |
| <b>Figura 3.</b> Principales terpenoides sintetizados por el género <i>Salvia</i> .....   | 32 |
| <b>Figura 4.</b> Compuestos fenólicos sintetizados por el género <i>Salvia</i> .....  | 33 |
| <b>Figura 5.</b> Diterpenos neo-clerodano aislados y caracterizados de <i>S.semiatrata</i> .....  | 38 |
| <b>Figura 6.</b> Diterpenos aislados y caracterizados de <i>S. semiatrata</i> con actividad farmacológica...  | 39 |
| <b>Figura 7.</b> Ejemplar fresco de <i>S. semiatrata</i> .....  | 40 |
| <b>Figura 8.</b> Proceso del dolor.....   | 51 |
| <b>Figura 9.</b> Obtención de los extractos orgánicos de <i>S. semiatrata</i> .....   | 64 |
| <b>Figura 10.</b> Evaluación del efecto ansiolítico.....  | 67 |
| <b>Figura 11.</b> Registro del peso de los ratones durante 14 días en la evaluación de la toxicidad oral aguda de los extractos de <i>S. semiatrata</i> ..... | 73 |
| <b>Figura 12.</b> Evaluación del efecto ansiolítico y la actividad ambulatoria de los extractos de <i>S. semiatrata</i> .....                                 | 74 |
| <b>Figura 13.</b> Evaluación de la duración de la potenciación de la hipnosis de los extractos de <i>S. semiatrata</i> .....                                  | 75 |
| <b>Figura 14.</b> Efecto antinociceptivo de los extractos de <i>S. semiatrata</i> . .....   | 76 |
| <b>Figura 15</b> Evaluación del efecto ansiolítico y la actividad ambulatoria del extracto de hexano de <i>S. semiatrata</i> . .....                          | 77 |
| <b>Figura 16.</b> Evaluación de la potenciación de la hipnosis inducida con PS del extracto de hexano.....  | 78 |
| <b>Figura 17.</b> Evaluación del efecto ansiolítico y la actividad ambulatoria del extracto de acetato de etilo de <i>S. semiatrata</i> .....                 | 79 |
| <b>Figura 18.</b> Evaluación de la potenciación de la hipnosis inducida con PS del extracto de acetato de etilo de <i>S. semiatrata</i> .....                 | 80 |
| <b>Figura 19.</b> Curvas dosis-respuesta del efecto antinociceptivo de <i>S. semiatrata</i> .....   | 82 |
| <b>Figura 20.</b> Identificación de terpenoides y flavonoides en los extractos de <i>S. semiatrata</i> .....  | 83 |
| <b>Figura 21.</b> Estructura molecular de 7-ceto-neoclerodan-3,13-dien-18,19:15,16-diólida.....   | 91 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 22.</b> Evaluación del efecto ansiolítico y la actividad ambulatoria del 7-ceto-neoclerodan-3,13-dien-18,19:15,16-diólida..... | 92 |
| <b>Figura 23.</b> Evaluación de la potenciación de la hipnosis inducida con PS del 7-ceto-neoclerodan-3,13-dien-18,19:15,16-diólida..... | 93 |
| <b>Figura 24.</b> Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo del 7-ceto-neoclerodan-3,13-dien-18,19:15,16-diólida.....             | 94 |

## Índice de cuadros

|   |    |
|---|----|
| <b>Cuadro 1.</b> Usos en la medicina tradicional mexicana de algunas especies de género <i>Salvia</i> .....   | 25 |
| <b>Cuadro 2.</b> Farmacología de algunos extractos del género <i>Salvia</i> .....   | 27 |
| <b>Cuadro 3.</b> Metabolitos secundarios aislados del género <i>Salvia</i> con acción sobre el sistema nervioso central.....  | 34 |
| <b>Cuadro 4.</b> Usos medicinales de <i>S. semiatrata</i> en la localidad de Santiago Huaucilla, Oaxaca.  | 40 |
| <b>Cuadro 5.</b> Clasificación de los trastornos de ansiedad de acuerdo con el DSM-V.....   | 41 |
| <b>Cuadro 6.</b> Clasificación del dolor de acuerdo con la OMS.....   | 52 |
| <b>Cuadro 7.</b> Clasificación de la medicina complementaria y alternativa por la NCCAM, 2011 .....   | 56 |
| <b>Cuadro 8.</b> Rendimientos de los extractos orgánicos y acuoso de <i>S. semiatrata</i> .....   | 72 |
| <b>Cuadro 9.</b> Identificación y cuantificación de metabolitos secundarios mediante CLAR. El número representa la concentración en µg de compuesto/mg de extracto..... | 85 |
| <b>Cuadro 10.</b> Fracciones colectadas de la separación del extracto de hexano de <i>S. semiatrata</i> ....  | 86 |
| <b>Cuadro 11.</b> Análisis por CG-EM de las fracciones 10-24 obtenida del extracto de hexano de <i>S. semiatrata</i> .....  | 87 |
| <b>Cuadro 12.</b> Componentes del precipitado del extracto de acetato de etilo de <i>S. semiatrata</i> determinadas mediante CG-EM.....                                 | 88 |
| <b>Cuadro 13.</b> Fracciones colectadas de la separación del extracto de acetato de etilo de <i>S. semiatrata</i> .....   | 88 |
| <b>Cuadro 14.</b> Componentes del extracto de acetato de etilo de <i>S. semiatrata</i> determinadas mediante CG-EM.....   | 90 |

## RESUMEN

*Salvia semiatrata* Zucc. (Lamiaceae) es una especie utilizada en la medicina tradicional de Santiago Huauclilla, Oaxaca, México, como tranquilizante y para el alivio del dolor. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto ansiolítico y antinociceptivo de las partes aéreas de *S. semiatrata* y la identificación de, al menos, un metabolito activo. Los extractos orgánicos fueron obtenidos por maceración utilizando disolventes de polaridad creciente (hexano, acetato de etilo, mezcla de acetona/metanol 1:1 y metanol), y el extracto acuoso mediante decocción y liofilización. Se determinó la toxicidad oral aguda de los extractos por medio del protocolo de la OCDE (2001). Para la valoración farmacológica se utilizaron ratones macho CD-1, los cuales fueron evaluados en los modelos de campo abierto, tablero con orificios, cruz elevada y potenciación de la hipnosis, inducida con pentobarbital sódico, para determinar el efecto ansiolítico/sedante, mientras que la actividad antinociceptiva fue valorada con la prueba de estiramiento abdominal o "Writhing". Los extractos fueron analizados mediante técnicas cromatográficas (capa fina, columna, CLAR y CG-EM). La estructura del compuesto aislado fue determinada por RMN-<sup>1</sup>H y cristalografía. De acuerdo con la OCDE, los extractos orgánicos y acuoso de *S. semiatrata*, evaluados a la dosis de 2000 mg/kg fueron clasificados en la categoría cinco (no tóxicos). Asimismo, los extractos de baja y mediana polaridad presentaron efectos ansiolíticos y antinociceptivos significativos con respecto al control, en los cuales mediante CLAR se identificaron terpenoides como  $\alpha$ -amirina, ácido oleanólico, ácido ursólico, estigmasterol y  $\beta$ -sitosterol y los flavonoides quercetina y naringenina, los cuales posiblemente sean los responsables de dichos efectos. El fraccionamiento de los extractos activos permitió la identificación mediante CG-EM, de ácidos grasos, triterpenos y sesquiterpenos, tales como: ácido palmítico,  $\beta$ -sitosterol, fucostanol, fucosterol, espatulenol, fitol y óxido de cariofileno. También, del extracto de acetato de etilo se aisló y caracterizó el diterpeno neo-clerodano, 7-ceto-neoclerodan-3,13-dien-18,19:15,16-diólida, el cual mostró efectos ansiolítico-sedante y antinociceptivo en las dosis evaluadas (0.1, 1 y 10 mg/kg). Los resultados evidencian el uso como ansiolítico y analgésico de *S. semiatrata* en la medicina tradicional, donde compuestos de naturaleza terpénica, ya conocidos y el diterpeno neo-clerodano aislado por primera vez en esta especie son parcialmente responsables de dichas actividades.

## ABSTRACT

*Salvia semiatrata* Zucc. (Lamiaceae) is a species used in the traditional medicine of Santiago Huaucilla, Oaxaca, Mexico, as a tranquilizer and for pain relief. The objective of this study was to evaluate the anxiolytic and antinociceptive effect of the aerial parts of *S. semiatrata* and the identification of at least one active metabolite. The organic extracts were obtained by maceration using solvents of increasing polarity (hexane, ethyl acetate, acetone / methanol mixture 1: 1 and methanol), and the aqueous extract by decoction and lyophilization. The acute oral toxicity of the extracts was determined by means of the OECD protocol (2001). For the pharmacological assessment, male CD-1 mice were used, which were evaluated in open-field, hole-board, elevated cross and potentiation of hypnosis induced with sodium pentobarbital models, to determine the anxiolytic / sedative effect, while the antinociceptive activity was assessed with the abdominal stretch test Writhing. The extracts were analyzed by chromatographic techniques (thin layer, column, HPLC and GC-MS). The structure of the isolated compound was determined by <sup>1</sup>H-NMR and crystallography. According to the OCDE, the organic and aqueous extracts of *S. semiatrata* evaluated at the dose of 2000 mg / kg were classified in category five (non-toxic). Likewise, the extracts of low and medium polarity presented significant anxiolytic and antinociceptive effects with respect to the control, in which terpenoid such as  $\alpha$ -amirin, oleanolic acid, ursolic acid, stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol were identified by HPLC. The quercetin and naringenin flavonoids, which are possibly responsible for these effects. The fractionation of the active extracts allowed the identification by GC-MS of fatty acids, triterpenes and sesquiterpenes, such as: palmitic acid,  $\beta$ -sitosterol, fucostanol, fucosterol, spatulenol, phytol and caryophyllene oxide. Also, from the ethyl acetate extract, diterpene neo-clerodano, 7-keto-neoclerodan-3,13-dien-18,19: 15,16-diolide was isolated and characterized, which showed anxiolytic-sedative and antinociceptive effects in the doses evaluated (0.1, 1 and 10 mg / kg). The results show the use as an anxiolytic and analgesic of *S. semiatrata* in traditional medicine, where already known terpenic nature compounds and neo-clerodano diterpene isolated for the first time in this species are partially responsible for these activities.



# 1. INTRODUCCIÓN

Desde tiempos antiguos, las plantas han sido valoradas por su capacidad curativa, de tal forma que en la actualidad las plantas medicinales son utilizadas como terapia complementaria y alternativa en el tratamiento de diversas enfermedades y como materia prima en la elaboración de fitofármacos y medicamentos. En los últimos años, las investigaciones han estado encaminadas a validar el uso tradicional de los remedios herbolarios, así como el aislamiento de compuestos activos (Kantati et al., 2016).

En México, las plantas medicinales son de gran importancia, ya que, a pesar de los diferentes cambios y pérdidas de conocimientos en las nuevas generaciones sigue vigente su uso como terapéutica tradicional debido a su eficacia y demanda (Aguilar et al., 1994; Gispert, 2008). Al respecto, Taddei-Bringas et al., (1999) menciona que aproximadamente el 90% de la población mexicana utiliza frecuentemente las plantas medicinales.

Actualmente, los trastornos de ansiedad y la depresión son enfermedades psiquiátricas de alta prevalencia en todo el mundo (Griebel y Holmes, 2013). Las benzodiacepinas, antidepresivos tricíclicos y los inhibidores de la recaptura de serotonina son algunos de los fármacos de elección para el tratamiento de la ansiedad; sin embargo, el uso crónico de éstos produce tolerancia y una alteración en el tratamiento puede inducir un síndrome abrupto de abstinencia así como otros efectos como sedación, relajación muscular y somnolencia (Dell'osso y Lader, 2013; López-Rubalcava y Estrada, 2016). Por otro lado, el dolor abdominal, es la razón de atención en medicina de urgencia de hasta 3,218 pacientes en un lapso de 3 meses (Chavarías, 2010). Los fármacos que tienen la capacidad de aliviar el dolor son denominados analgésicos y existen principalmente dos grupos, los opioides y los antiinflamatorios no esteroideos, los cuales, debido a su uso sin prescripción médica, han ocasionado efectos tales como problemas cardiovasculares y renales, entre otros (Jiménez, 2003). Por lo anterior los remedios herbolarios representan una alternativa para el tratamiento de diversos padecimientos.

Tanto en épocas pasadas como en la actualidad, las salvias han sido utilizadas por su amplio espectro de usos en medicina tradicional mexicana, por ejemplo, se utilizan para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales, como disentería y diarrea. Así como para efectos como tranquilizante, en limpias, el susto, el mal de ojo, como somnífero y para el dolor de cabeza, entre otros (Argueta, 1994). Se han reportado efectos ansiolíticos y analgésicos en especies como *S. guaranitica*, *S. haematodes*, *S. lerrifolia*, *S. miltiorrhiza*, *S. coccinea*, *S. elegans*, *S. lavanduloides*, entre otras (Imanshahidi y Hosselinzadeh, 2006).

De aproximadamente 138 especies de salvias estudiadas se han aislado y caracterizado aproximadamente 760 metabolitos secundarios. El tipo de compuesto que destaca en este género son los terpenos y los polifenoles (Wu, 2012). Compuestos de naturaleza terpénica como las salvinatorinas y la tilifodiólida se les han atribuido propiedades ansiolíticas y antinociceptivas (John et al., 2006; Braida et al., 2009; Maione et al., 2009; González-Chávez et al., 2018). Asimismo, compuestos como el óxido de cariofileno y la miricetina cuentan con estudios que demuestran su propiedad antinociceptiva (Fidy et al., 2016; Chavan et al., 2010; Rosas-Martínez, 2019).

*Salvia semiatrata* Zucc. (Lamiaceae) es un arbusto de 1 a 2 m de altura, con flores moradas y periodo de floración entre junio-octubre. Esta especie es común en los bosques de pino-encino del estado de Oaxaca (Martínez-Gordillo et al., 2013). Esquivel (1986) describió por primera vez dos metabolitos de tipo diterpeno neo-clerodano obtenidos a partir de la purificación del extracto de acetona de la parte aérea de *S. semiatrata*: el  $7\alpha$ -hidroxi-neoclerodan-3,13-dien-18,19:15,16-diólida y la semiatrina. De ambos compuestos, se ha reportado el efecto anti alimentario en *Spodoptera littoralis*, demostrando a la semiatrina como un potente antialimentario (Simmonds, 1996). Otros metabolitos de tipo diterpeno aislados y caracterizados de la raíz de *S. semiatrata* son la horminona, la tilifolidiona y el 20-norinuroyleanol, los cuales tienen propiedades antibacterianas y citotóxicas (Esquivel et al., 2005; Nicolas et al., 2013).

Un estudio etnobotánico realizado previamente en la localidad de Santiago Huaucuililla, Oaxaca, permitió identificar alrededor de 114 especies vegetales útiles en el tratamiento de varios padecimientos, destacando el género *Salvia*, cuyas especies son ampliamente

utilizadas como desinflamatorias, analgésicas, para el dolor de estómago, diarrea, nerviosos e insomnio. *S. semiatrata* es utilizada en esta comunidad como cicatrizante, desinflamatorio, para el dolor de oído, dolor estomacal y para los trastornos nerviosos (Nambo, 2015). A pesar de la gran importancia que tienen las especies de dicho género como plantas medicinales en Santiago Huaucuililla, Oaxaca, es necesario ampliar la información científica de su fitoquímica y farmacología. Por ello, en esta investigación se pretende evaluar el efecto ansiolítico y antinociceptivo de los extractos de *S. semiatrata*, así como, identificar y caracterizar los metabolitos secundarios presentes en los extractos activos.

## 2. JUSTIFICACIÓN

A pesar del uso medicinal de las salvias en las comunidades rurales de México, pocas de ellas han sido estudiadas fitoquímica y farmacológicamente. *S. semiatrata* es utilizada en la comunidad de Santiago Huaucilla, Oaxaca, para aliviar tanto la ansiedad como el dolor preparada en forma de té. La prevalencia de los trastornos de ansiedad y del dolor, específicamente el dolor de tipo abdominal, en México es significativa. Las alternativas de terapéutica para estas afecciones son escasas, y si bien son eficaces causan diversos efectos adversos. Lo anterior conlleva a la búsqueda de nuevas alternativas eficaces, tratando de disminuir los efectos adversos severos. Una opción es el uso de especies vegetales medicinales como las del género *Salvia*.

En este estudio se plantea llevar a cabo la evaluación química y biológica de *S. semiatrata* mediante la valoración del efecto ansiolítico en los modelos experimentales de campo abierto, tablero con orificios, cruz elevada y potenciación de la hipnosis con pentobarbital sódico y de dolor con el modelo de estiramiento abdominal o "Writhing". Estas son pruebas validadas y utilizadas ampliamente para la evaluación farmacológica de los efectos ansiolíticos y antinociceptivos que presentan los extractos de plantas medicinales.

### 3. OBJETIVO

#### **Objetivo general:**

Evaluar el efecto ansiolítico y antinociceptivo de *S. semiatrata* y caracterizar al menos uno de los compuestos activos.

#### **Objetivos particulares:**

1. Obtener los extractos orgánicos y acuoso de *S. semiatrata*.
2. Determinar la toxicidad oral aguda de los extractos crudos.
3. Evaluar el efecto ansiolítico de los extractos crudos y los compuestos aislados mediante las pruebas de actividad ambulatoria, tablero con orificios, cruz elevada y potenciación de hipnosis inducida por pentobarbital sódico.
4. Evaluar el efecto antinociceptivo de los extractos crudos y los compuestos aislados mediante la prueba de estiramiento abdominal.
5. Aislar e identificar los compuestos presentes en los extractos activos de *S. semiatrata* mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas.

### 4. HIPOTESIS

Si los extractos de *S. semiatrata* tienen compuestos con actividad depresora sobre el SNC entonces producirán efectos como ansiolítico y/o antinociceptivo en ratones.

## 5. ANTECEDENTES

### 5.1. Medicina tradicional

Toda sociedad, independientemente de su origen histórico o de su localización geográfica, forja en algún momento de su desarrollo un sistema de salud. En el caso de las comunidades indígenas rurales de México han creado la medicina tradicional: la cual es un sistema de conceptos, creencias, prácticas y recursos materiales y simbólicos -destinado a la atención de diversos padecimientos y procesos desequilibrantes-, cuyo origen se remonta a las culturas prehispánicas. Las expresiones empleadas para designarla son abundantes: medicina indígena, medicina paralela, medicina popular, medicina natural, medicina herbolaria, etnomedicina, etc. Sin embargo, el término universalizado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) es "medicina tradicional" (Zolla, 2005).

El principal recurso curativo de la medicina tradicional son las plantas, ya que desde los albores de la historia de la humanidad, la flora ha sido un acompañante vital y trascendental y el hombre, al conocer y manipularla ha ido descubriendo sus propiedades, entre ellas las curativas, y las ha empleado para aliviar sus dolencias (Velasco, 1999).

Los médicos tradicionales sistematizaron el conocimiento sobre las propiedades de las plantas y su aplicación en el tratamiento de las enfermedades. Dicho conocimiento se refleja en escritos como el Códice de la Cruz-Badiano (1552), el Códice Florentino (1577) escrito por Bernardino de Sahagún y la Historia de las Plantas de la Nueva España (1571-1576) de Francisco Hernández de Toledo (Lozoya, 1999).

El volumen I y II de la real Expedición Botánica a Nueva España: 1787-1803 de José Mariano de Mocino y Martín Sessé, el libro de Relaciones geográficas del siglo XVI: Nueva Galicia de René Acuña, que fueron impresos en los años de 2010 y 2017, respectivamente, reflejan conocimiento de la medicina tradicional de la época que se dicta en sus títulos. En el México contemporáneo destaca la obra de Maximino Martínez:

las plantas Medicinales de México (1934) y el Atlas de la Medicina Tradicional Mexicana (1994).

En estas obras se enfatiza, no solo la diversidad natural y cultural de México, sino también la inventiva y riqueza del saber popular.

## 5.2. Plantas medicinales

La Organización Mundial de la Salud (1979) define a una planta medicinal como “Cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir como precursores para la síntesis de nuevos fármacos”.

En México existen cerca de 30,000 diferentes especies de plantas con flor, de las cuales se ha calculado que, no menos de una quinta parte, cuenta con propiedades medicinales significativas (Hersch, 1999). Las principales familias botánicas a las cuales pertenecen estas especies son: Asteraceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Malvaceae, Rosaceae, Solanaceae y Verbenaceae. Algunos ejemplos de plantas comúnmente empleadas son gordolobo (*Gnaphalium sp.*), eucalipto (*E. globulus*), hierbabuena (*Mentha sp.*), manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y nopal (*Opuntia sp.*), para tratar enfermedades respiratorias, desórdenes digestivos, afecciones en los ojos y diabetes. De acuerdo con un estudio realizado en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), se estima que aproximadamente el 90% de la población hace uso de las plantas medicinales (Aguilar, 1994; Taddei-Bringas, 1999).

Otra perspectiva que realza la importancia de las plantas medicinales es su aplicación en la medicina moderna. Entre otras, son fuente directa de agentes terapéuticos, se emplean como materia prima para la fabricación de medicamentos semisintéticos más complejos, la estructura química de sus principios activos puede servir de modelo para la elaboración de fármacos sintéticos y tales principios se pueden utilizar como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos.

Entre algunos de los compuestos de origen vegetal con alto valor que son utilizados hoy en día se pueden mencionar:

La digoxina extraído de *Digitalis lanata*, la cual sirve para tratar problemas cardíacos. La artemisinina extraída de *Artemisia annua* es empleada contra la malaria. La codeína y morfina son dos eficaces y potentes analgésicos extraídos de *Papaver somniferum*. La vincristina, la camptotecina, la podofilotoxina y el taxol extraídos de *Catharanthus roseus*, *Camptotheca acuminata*, *Podophyllum sp.* y *Taxus brevifolia*, respectivamente, son empleados como antineoplásicos. Debido a hechos como éstos, la OMS ha promovido el estudio de las plantas como fuente de medicamentos, dentro del programa “Salud para todos en el año 2000”. A pesar de lo anterior, se estima que la validación química, farmacológica y biomédica de los principios activos de las plantas medicinales se ha llevado a cabo sólo en 5% de estas especies (Ocegueda, 2005).

No obstante, en muchos países ha ocurrido una pérdida importante del conocimiento tradicional transmitido de padres a hijos sobre el uso de plantas medicinales, y por lo tanto su uso se ha vuelto indiscriminado, debido entre otras cosas a el acceso limitado a la seguridad social y al alto costo de los medicamentos de patente, teniendo como consecuencia el desconocimiento de la dosificación exacta de las plantas y la combinación con medicamentos alópatas que generan efectos indeseables para la salud de la población (Bermúdez, 2005; Magallanes, 2013).

Con base en todo lo anterior, el estudio de las plantas medicinales se vuelve cada vez más importante, tanto para dar un respaldo a la medicina tradicional como para la obtención de principios biológicamente activos.

### **5.3. Distribución de la familia Lamiaceae**

La familia Lamiaceae, incluye 240 géneros y 7200 especies. Ésta se encuentra en el sexto lugar por su riqueza cosmopolita (Harley y Pastore, 2012). México cuenta con 33 géneros y 598 especies, de las cuales 66.2% son endémicas. Los géneros mejor representados de esta familia son *Salvia*, *Scutellaria*, *Stachys* e *Hyptis* y se encuentran ampliamente distribuidos, principalmente a lo largo de las zonas montañosas y de manera



primordial en el eje neovolcánico transversal (Martínez-Gordillo, 2013). Con aproximadamente 1000 especies, el género *Salvia* es el más diverso de esta familia.

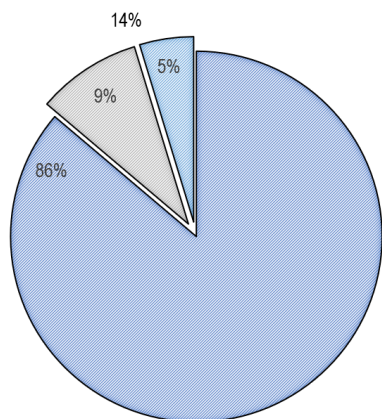
#### 5.4. El género *Salvia* en México

De las casi 100 especies a nivel cosmopolita del género *Salvia*; 312 se encuentran en México y el 43.22% son endémicas (Martínez-Gordillo et al., 2011). Los estados con mayor riqueza de salvias son Oaxaca (63), Guerrero (51), Puebla (50), Jalisco (49) y Michoacán (48) (Ramamoorthy y Eliot, 1998). Debido a la complejidad y diversidad, el género *Salvia* se clasifica en cuatro subgéneros: *Calosphace*, *Salvia*, *Sclarea* y *Leonia*. El subgénero más grande es *Calosphace* con aproximadamente 500 especies agrupadas en 105 secciones, de las cuales, 298 se hallan en México (Olvera, 2017). *Salvia semiatrata*, pertenece al subgénero *Calosphace*, sección *Scorodonia* (Jenks, 2013).

Con el nombre de salvias se conoce una serie de plantas, pertenecientes al género *Salvia*. En México, en diversas comunidades rurales también son conocidas como mirtos. El nombre *Salvia*, deriva del latín *salvare* (ser salvado) debido a sus cualidades curativas, que son conocidas desde la antigüedad y gozan de la consideración de panacea.

Las salvias son hierbas anuales y perennes, arbustos y raramente arbustos trepadores, con tallos tetraédricos, hojas simples, opuestas y decusadas, carentes de estípulas y flores en inflorescencias bracteadas, cimosas o racemosas. Las flores son zigomorfas y pentámeras, con cáliz bilabiado, persistente, con 5 sépalos, parcialmente connados en una estructura tubulosa. La corola está constituida por 5 pétalos soldados (Hernández-Agero, 2002).

De las aproximadamente 1000 especies del género *Salvia* solo el 14% cuentan con estudios de tipo etnobotánico, fitoquímico y/o farmacológico, y de ese porcentaje solo el 5% son especies mexicanas (Wu, 2012) (Figura 1).



- ❖ 1000 especies de *Salvia* a nivel mundial
- ❖ 138 cuentan con estudios de tipo etnobotánico, fitoquímico y farmacológico (14%)
- ❖ 47 especies son mexicanas (5%)

Figura 1. Porcentaje de especies del género *Salvia* con estudio etnobotánico, fitoquímico y/o farmacológico.

### 5.5. *Salvia* en la medicina tradicional mexicana

Tanto en épocas pasadas como en la actualidad, las salvias han sido utilizadas por su amplio espectro de usos en medicina tradicional mexicana, por ejemplo, se utilizan para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales, como disentería, diarrea, cólicos, vómito, indigestión y pérdida de apetito. Así como para efectos como tranquilizante, en limpias, susto, mal de ojo, como somnífero, como sedante, para el llanto, para la inquietud, para el dolor de cabeza, entre otros. Otros usos que se le han atribuido a especies del género *Salvia* son para tratar el reumatismo, problemas de piel como los granulomas, para infecciones de los ojos y para baños postparto (Argueta, 1994; Jenks & Seung-Chul, 2013).

Un ejemplo de que las salvias son utilizadas desde tiempos prehispánicos es el libro de Francisco Hernández de Toledo. En el tomo I se puede leer lo siguiente respecto a las propiedades curativas de estas especies:

“Además, algunas especies, *S. longispicata* por ejemplo, se emplean como sudoríficas”.

“Las semillas de algunas especies de este género se usan como bebida refrescante. En Guerrero se utiliza el cocimiento de una *Salvia sp.* para curar granos y contusiones”.

“*S. lavanduloides*, conocida también como “cantueso” es empleada para combatir la caída del pelo”.

“*S. polystachia* “Chía”, la semilla es usada para preparar bebidas refrescantes, agregando limón y azúcar; en Veracruz es utilizado este refresco para los que padecen diarreas”.

En la actualidad, en México, las salvias siguen siendo muy empleadas para tratar diferentes padecimientos. En el cuadro 1, se describen algunos usos de las salvias.

Cuadro 1. Usos en la medicina tradicional mexicana de algunas especies de género *Salvia*.

| <b>Especie</b>                          | <b>Estado</b>                     | <b>Usos</b>   | <b>Referencia</b>                                     |
|---|-----------------------------------|---|---|
| <i>S. amarissima</i><br>Ortega.         | Meseta<br>purépecha,<br>Michoacán | Inflamación de la piel.   | Esquivel-<br>García, 2018                             |
| <i>S. cinnabarina</i><br>Vahl.          | Chiapas                           | Reumas, enfermedades<br>respiratorias. Ansiolítica.                                       | Cruz-Jiménez,<br>2014;<br>Domínguez-<br>Vázquez, 2002 |
| <i>S. circinata</i> Cav.                | Santiago<br>Huaclilla,<br>Oaxaca  | Diarrea, dolor estomacal,<br>somniafero.  | Nambo, 2015   |
| <i>S. divinorum</i><br>Epling & Játiva. | Oaxaca (Etnia<br>mazateca)        | Antidiarreico, antianémico,<br>dolor de cabeza y<br>reumatismo, rituales<br>espirituales. | Valdéz, 1983  |
| <i>S. elegans</i> Vahl.                 | Huasca de<br>Ocampo,<br>Hidalgo   | Insomnio de los niños.<br>Antidepresivo y ansiolítico.                                    | Molina-<br>Mendoza, 2012                              |
| <i>S. hispánica</i> L.                  | La Mesa,<br>Nayarit               | Suplemento alimenticio.   | Cruz-Jiménez,<br>2014; Cahill,<br>2003                |

|                                   |   |  |                             |
|-----------------------------------|---|--|-----------------------------|
| <i>S. lavanduloides</i><br>Kunth. | Tetela del<br>volcán,<br>Morelos            | Dolor de estómago.   | Ortega-Cala,<br>2019        |
| <i>S. leucantha</i> Cav.          | Meseta<br>purépecha,<br>Michoacán           | Cuidado de la piel.  | Esquivel-<br>García, 2018   |
| <i>S. mexicana</i> L.             | Meseta<br>purépecha,<br>Michoacán           | Mordidas de insectos.<br>Erupciones cutáneas.  | Esquivel-<br>García, 2018   |
| <i>S. microphylla</i><br>Cav.     | Huasca de<br>Ocampo,<br>Hidalgo,<br>Hidalgo | Insomnio de los niños,<br>fortalecer los huesos, susto<br>de los niños y empacho de<br>los bebés.  | Molina-<br>Mendoza, 2012    |
| <i>S. microphylla</i><br>Cav.     | Meseta<br>purépecha,<br>Michoacán           | Erupciones cutáneas,<br>hematomas, inflamación de<br>la piel.  | Esquivel-<br>García, 2018   |
| <i>S. microphylla</i><br>Cav.     | Santiago<br>Camotlán,<br>Oaxaca             | Padecimientos del sistema<br>digestivo y genitourinarios.  | Pérez-Nicolás,<br>2017      |
| <i>S. patens</i> Cav.             | Huasca de<br>Ocampo,<br>Hidalgo             | Baños a niños de tres meses<br>en adelante, para calentar<br>las coyunturas y puedan<br>empezar a caminar, así<br>como para heridas<br>infectadas. | Molina-<br>Mendoza, 2012    |
| <i>S. purpurea</i> Cav.           | Santiago<br>Huacilla,<br>Oaxaca             | Dolor de muelas.   | Nambo, 2015                 |
| <i>S. purpurea</i> Cav.           | Chiapas                                     | Diarrea  | Domínguez-<br>Vázquez, 2002 |

|                           |                           |  |                      |
|---------------------------|---------------------------|--|----------------------|
| <i>S. splendens</i> K.    | Oaxaca                    | Efecto antidiabético.  | Castro, 2014         |
| <i>S. tilifolia</i> Vahl. | Huasca de Ocampo, Hidalgo | Abscesos o cuando se tenga una espina enterrada, así como para las heridas infectadas. | Molina-Mendoza, 2012 |

## 5.6. Farmacología del género *Salvia*

Diversos extractos orgánicos y acuosos de salvias han sido evaluados ampliamente. Por ejemplo, *S. miltiorrhiza* y *S. divinorum*, la primera del viejo mundo y la segunda del nuevo mundo. Estudios respaldan el uso de *S. miltiorrhiza* para combatir enfermedades cardiovasculares, la aterogénesis, la hipertensión, la hiperlipidemia, la trombosis, el dolor crónico neuropático, entre otras (Chun-Yan et al., 2015). Por otra parte, los efectos antiinflamatorios, analgésicos y neurotróficos de *S. divinorum* han sido reportados (Coffeen & Pellicer, 2019).

En el cuadro 2 se resumen algunos extractos obtenidos del género *Salvia* que han sido evaluados en modelos de ansiedad y dolor.

Cuadro 2. Farmacología de algunos extractos del género *Salvia*

| <b>Especie</b>         | <b>Extracto/parte usada</b>    | <b>Modelo/efecto</b>     | <b>Dosis/admón./ cepa</b>                     | <b>Referencia</b>   |
|------------------------|--------------------------------|--------------------------|---|---------------------|
| <i>S. miltiorrhiza</i> | Etanólico/raíz                 | Cruz elevada/ansiolítico | 100 mg/kg/i.p./rata Wistar macho              | Lobina et al., 2018 |
|                        | Aceite esencial/aérea          | Cruz elevada/ansiolítico | 100, 200 mg/kg/p.o./rata Sprague Dawley macho | Liu et al., 2015    |
| <i>S. elegans</i>      | Hidroalcohólico/hojas y flores | Cruz elevada y campo     | 125, 1000, 2000                               | Mora et al., 2006   |

|                          |                       |  |  |                           |
|--------------------------|-----------------------|--|--|---------------------------|
|                          |                       | abierto/ansiolítico  | mg/kg/p.o./rata<br>Wistar macho                            |                           |
| <i>S. reuterana</i>      | Hidroalcohólico/aérea | Cruz elevada y campo abierto/ansiolítico                                   | 100 mg/kg/i.p./ratón<br>Syrian macho                       | Rabbani et al., 2005      |
| <i>S. verticillata</i>   | Hidroalcohólico/aérea | Cruz elevada y campo abierto/ansiolítico                                   | 125, 250, 500, 100, 2000, 4000 mg/kg/p.o./ratón NMRI macho | Naderi et al., 2011       |
| <i>S. lerrifolia</i>     | Acuoso/hojas          | Potenciación de la hipnosis con pentobarbital sódico/ efectos sobre el SNC | 1150, 1570 mg/kg/p.o./ratón albino macho                   | Hosseinzadeh et al., 2008 |
| <i>S. aegyptiaca</i>     | Acetona/metanol/aérea | Writhing/formalina/campo abierto/nocicepción/sedación                      | 250, 500, 1200 mg/kg/p.o./ratón albino macho               | Al-Yousuf et al., 2002    |
| <i>S. africana-lutea</i> | Acuoso/hojas          | Writhing   | 200, 400 mg/kg/p.o./ratón albino macho                     | Amabeoku et al., 2001     |
| <i>S. lachnostachys</i>  | Etanólico/hojas       | Formalina/campo abierto/nocicepción/sedación                               | 100 mg/kg/p.o./rata<br>Wistar macho                        | Santos et al., 2017       |

|                       |                             |  |   |                        |
|-----------------------|-----------------------------|--|---|------------------------|
| <i>S. hypoleuca</i>   | Metanólico/acu<br>oso/aérea | Placa<br>caliente/nocice<br>pción      | 190<br>mg/kg/i.p./ratón<br>albino macho           | Karami et al.,<br>2013 |
| <i>S. officinalis</i> | Hidroalcohólic<br>o/hojas   | Writhing/formal<br>ina/nocicepció<br>n | 10,30,100<br>mg/kg/p.o./rató<br>n Swiss<br>hembra | Alves et al.,<br>2012  |

## 5.7. Fitoquímica del género *Salvia*

De las aproximadamente 138 especies de salvias estudiadas se han aislado y caracterizado aproximadamente 760 metabolitos secundarios. El tipo de compuestos que destaca en este género son los terpenos y los polifenoles. Dentro de los terpenoides destacan los diterpenos con más de 500, seguidos de los polifenoles con cerca de 100, los triterpenos con 74, y por último los sesquiterpenos, con 48 estructuras conocidas (Wu, 2012) (Figura 2).

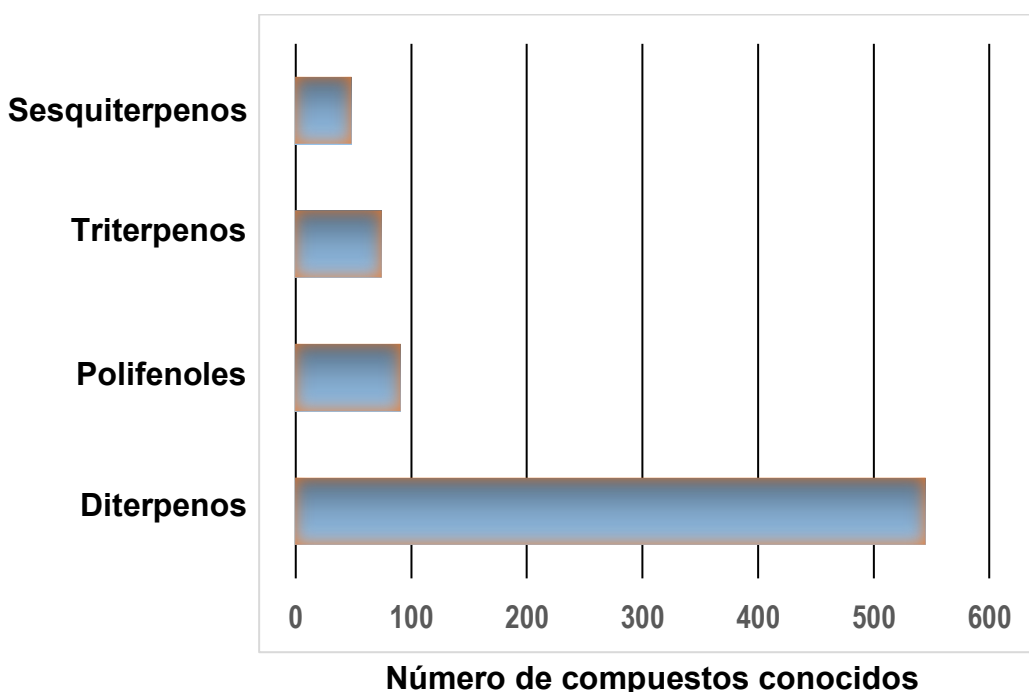


Figura 2. Número de metabolitos secundarios aislados y caracterizados del género *Salvia*.

Los sesquiterpenos son hidrocarburos cíclicos de 15 carbonos que forman parte importante de los aceites esenciales, algunos comunes en el género son el cariofileno y el espatulenol (Figura 3). Los triterpenos se derivan de un precursor de 30 carbonos, el escualeno. La mayoría son cíclicos con 1 a 5 sistemas anulares. Muchos de los triterpenos del género *Salvia* son derivados del esqueleto de ursano, oleanano y lupano (Jash, 2016) (Figura 3).



Sin embargo, los metabolitos secundarios más diversificados y que caracterizan mejor a estas plantas son los compuestos de tipo diterpénico, los cuales se han postulado como marcadores taxonómicos tanto a nivel de subgéneros, como de secciones botánicas (Esquivel, 2017). Dentro de este grupo se han aislado labdanos, clerodanos, abietanos, y pimaranos principalmente (Wu, 2012). El distintivo que caracteriza a las salvias mexicanas es la síntesis mayoritaria de diterpenos derivados del esqueleto neo-clerodano (Esquivel, 2008; Bautista, 2012) (Figura 3).

Los compuestos fenólicos se caracterizan por tener grupos hidroxilo unidos a anillos aromáticos. Estos se clasifican en ácidos fenólicos y flavonoides (Ver figura 4). El ácido cafeico, felúrico, cumárico, rosmarínico, así como la apigenina, luteolina, quercetina, canferol y rutina, son los ácidos fenólicos y los flavonoides, respectivamente, más comunes en el género *Salvia* (Figura 4).

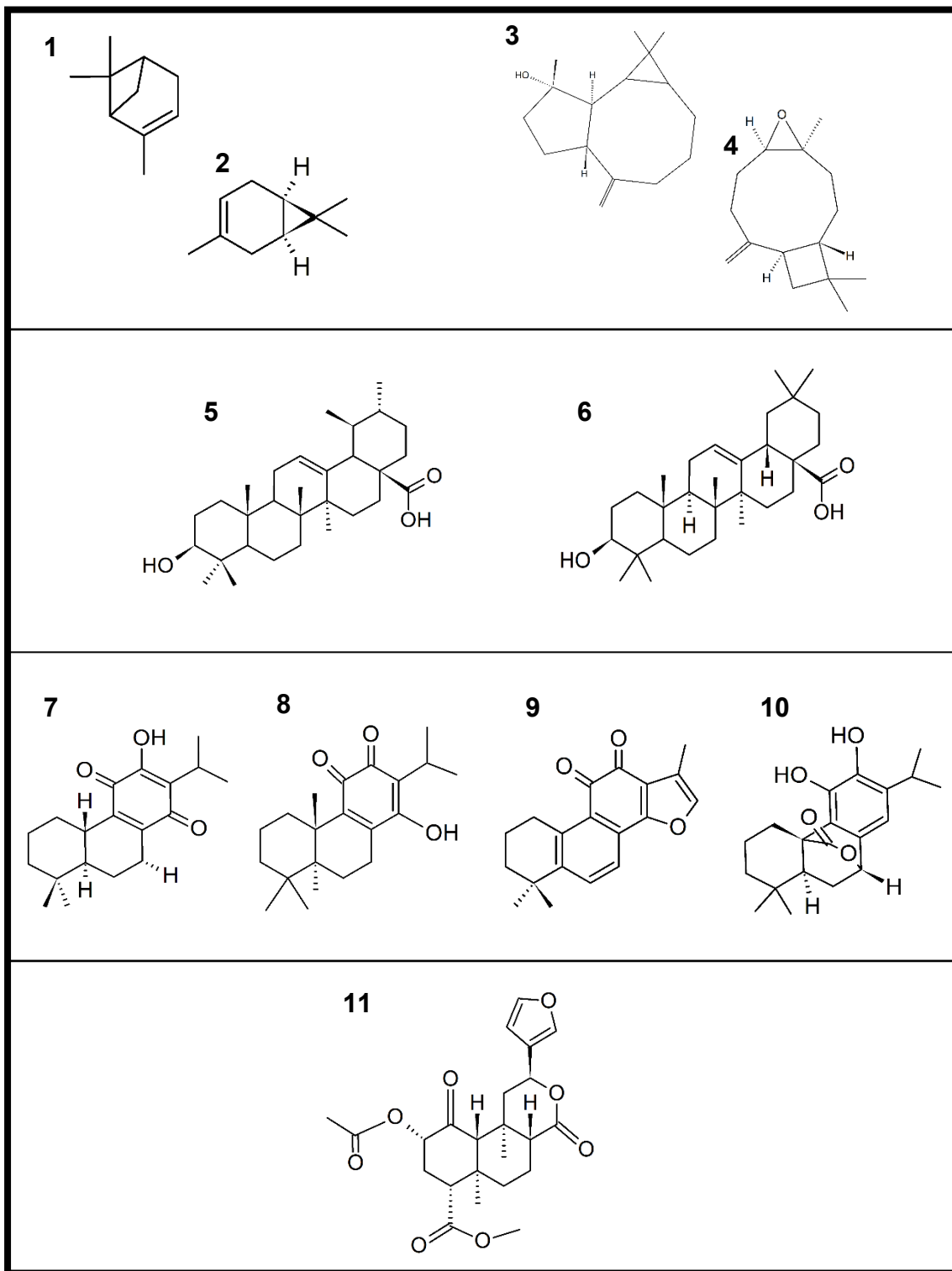


Figura 3. Principales terpenoides sintetizados por el género *Salvia*. Monoterpenos; 1)  $\alpha$ -pineno, 2) 3-careno. Sesquiterpenos; 3) espatulenol, 4) óxido de cariofileno. Triterpenos; ácido ursólico (5) y ácido oleanólico (6). Diterpenos: horminona (7), royleanona (8), tanshinona IIA (9), carnosol (10). E) Neo-Clerodano: salvivorina A.

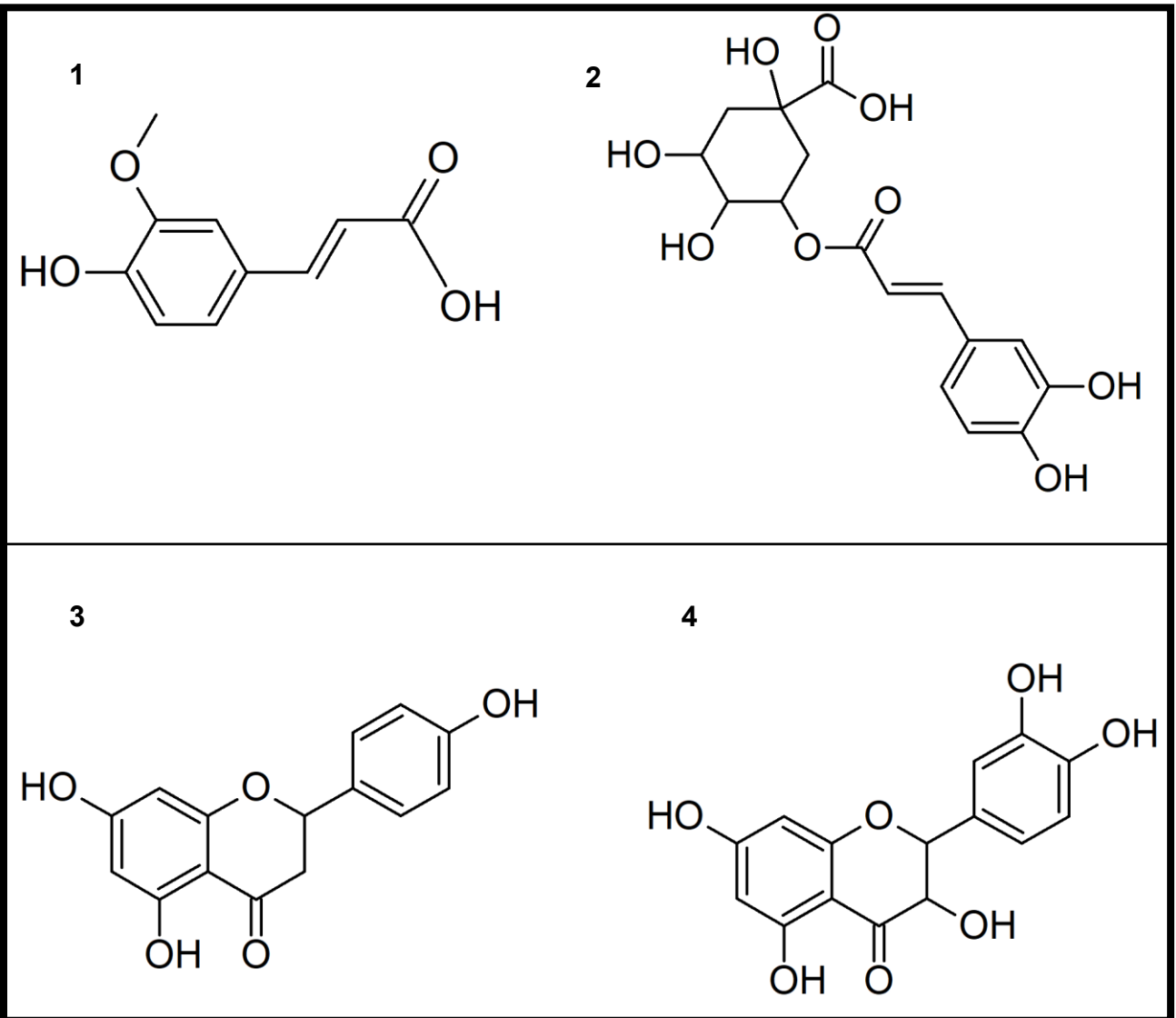


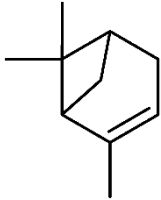
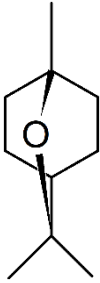
Figura 4. Compuestos fenólicos sintetizados por especies del género *Salvia*. Ácidos fenólicos; ácido felúrico (1), ácido clorogénico (2). Flavonoides; apigenina (3), quercetina (4).

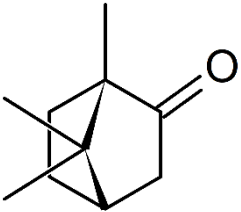
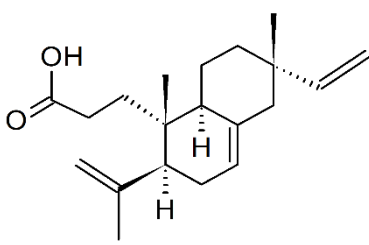
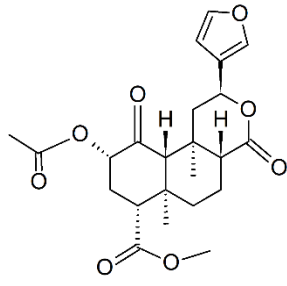
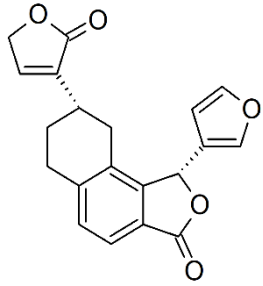
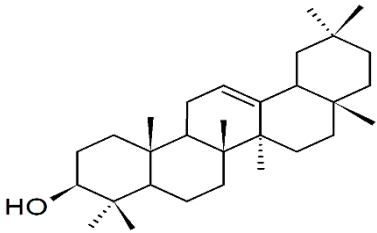
## 5.8. Metabolitos secundarios con actividad sobre el sistema nervioso central

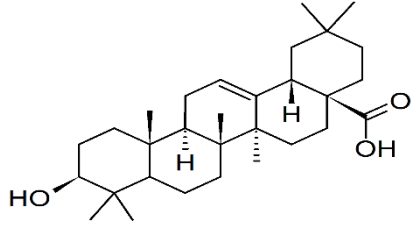
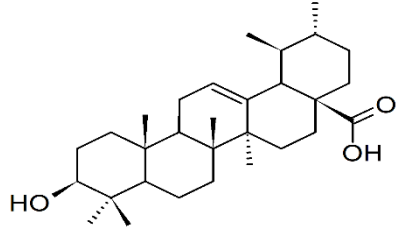
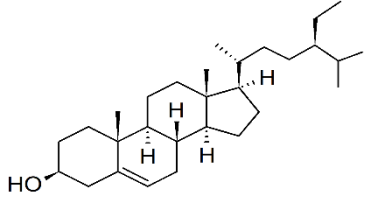
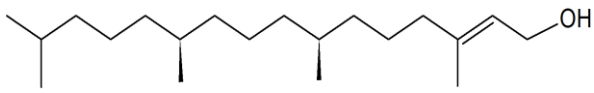
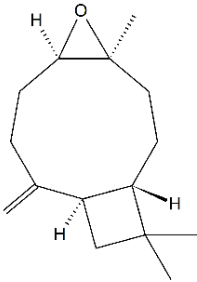
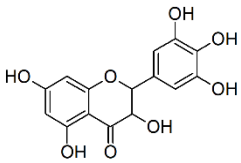
A partir de mediados del siglo XX se comenzó a apreciar la gran diversidad del metabolismo secundario de las plantas y con ello la diversidad de funciones que tienen, no solo biológicas sino también farmacológicas. Se han atribuido muchos efectos a los metabolitos secundarios aislados de especies del género *Salvia*, tales como, antibacterianos, antitumorales, antioxidantes, antimutagénicos, antiinflamatorios, entre otros. Los grupos que presentan tales efectos farmacológicos van desde los terpenos hasta los flavonoides.

En el siguiente cuadro se presentan algunos metabolitos secundarios aislados del género *Salvia* que presentan efectos sobre el sistema nerviosos central.

Cuadro 3. Metabolitos secundarios aislados del género *Salvia* con acción sobre el sistema nervioso central.

| Nombre     | Estructura  | Efecto            | Bibliografía          |
|------------|---|-------------------|-----------------------|
| α-Pineno   |  | Anticolinesterasa | Perry et al.,<br>2000 |
| 1,8-cineol |  |                   |                       |

|                  |   |                               |  |
|------------------|---|-------------------------------|--|
| Alcanfor         |    |                               |  |
| CMP1             |    | Ansiolítico                   | Maione et al., 2009                    |
| Salvinorina      |   | Ansiolítico y antinociceptivo | Braida et al., 2009; John et al., 2006 |
| Tilifodiólida    |  | Antinociceptivo               | González-Chávez et al., 2018           |
| $\beta$ -amirina |  | Antinociceptivo               | Nogueira et al., 2018                  |

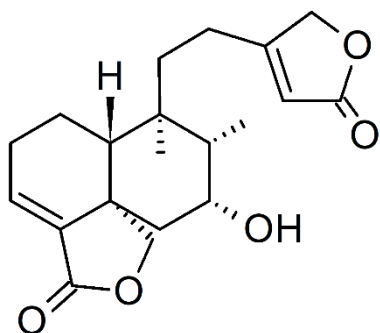
|                      |  |                 |  |
|----------------------|--|-----------------|--|
| Ácido oleanólico     |     | Antinociceptivo | Park et al., 2013                        |
| Ácido ursólico       |     | Antinociceptivo | Pironi et al., 2018                      |
| $\beta$ -sitosterol  |     | Ansiolítico     | Aguirre-Hernández et al., 2007           |
| Fitol                |  | Ansiolítico     | Pereira et al., 2014                     |
| Óxido de cariofileno |   | Antinociceptivo | Fidy et al. 2016;<br>Chavan et al., 2010 |
| Miricetina           |   | Antinociceptivo | Rosas-Martínez, 2019                     |

## 5.9. *Salvia semiatrata* Zucc. (Lamiaceae)

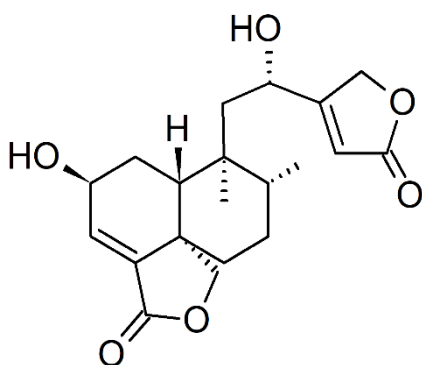
*S. semiatrata* pertenece a la sección *Scorodonia*, en la cual, de acuerdo con Turner (2009) se encuentran hierbas perennes, arbustos y subarbustos, en su mayoría de 1 a 5 m de altura. Hojas ovaladas a deltoides, rara vez cordadas; los pecíolos son en su mayoría cortos, articuladas cerca de la base: las láminas, pubescentes, los márgenes crenados. Inflorescencias diversas, generalmente terminales, interrumpidas o no; brácteas florales de lanceoladas a ampliamente ovadas, deciduas tempranas. Cáliz con el labio superior 5-7 nervado. Corolas, en su mayoría, de púrpura a azules, a veces blancas, raramente amarillas. Los estambres se originan en la garganta de la corola, las anteras incluidas. Las ramas de estilo pilosas, rama superior 2-3 veces más larga que la inferior.

*S. semiatrata* se puede encontrar en Oaxaca, donde es relativamente común en los bosques de pino-encino y en matorrales xerófilos, a una altura entre los 200 y 2500 m; con un periodo de floración entre junio y octubre. Un arbusto muy característico de flores moradas, de 1 a 2 m de altura que tiene en su mayoría hojas cordadas, marcadamente rugosas.

Esquivel (1986) describió por primera vez dos metabolitos de tipo diterpeno neoclerodano, obtenidos a partir de la purificación del extracto de acetona de la parte aérea de *S. semiatrata* (Figura 5). El material vegetal fue recolectado en el mes de diciembre de 1984, al norte de Nochixtlán, Oaxaca.



|                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| <b>Nombre</b>                         | 7α-hidroxi-neoclerodan-3,13-dien-18,19:15,16-diolida |
| <b>Formula mínima</b>                 | C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>       |
| <b>Métodos para la identificación</b> | IR, RMN- <sup>1</sup> H, RMN- <sup>13</sup> C        |
| <b>Punto de fusión</b>                | 186-187 °C   |

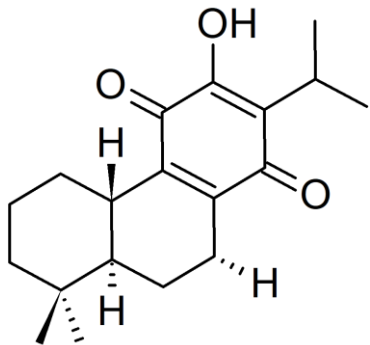


|                                       |   |
|---------------------------------------|---|
| <b>Nombre común</b>                   | Semiatrina  |
| <b>Formula mínima</b>                 | C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub>    |
| <b>Métodos para la identificación</b> | UV, IR, RMN- <sup>1</sup> H, RMN- <sup>13</sup> C |
| <b>Punto de fusión</b>                | 203-204 °C  |

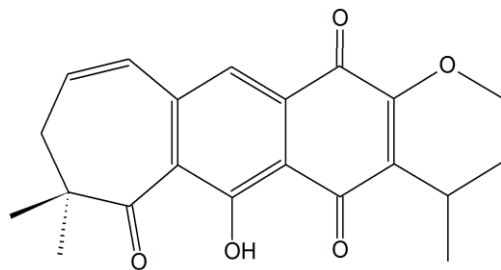
Figura 5. Diterpenos neo-clerodano aislados y caracterizados de *S. semiatrata*.

Otros metabolitos de tipo diterpeno aislados y caracterizados a partir del extracto de acetona, de la raíz de *S. semiatrata* son la horminona, la tilifolidiona y el 20-norinuroyleanol (Figura 6), los cuales tienen propiedades antibacterianas y citotóxicas (Baldomero, et al., 2005; Nicolas, et al., 2013).

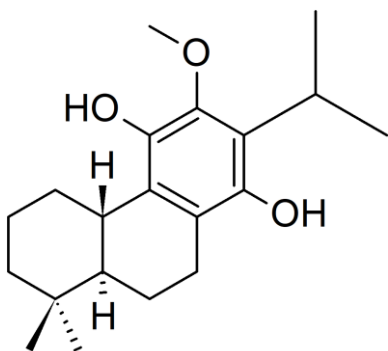




|                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| <b>Nombre</b>                         | Horminona                                    |
| <b>Formula mínima</b>                 | $C_{20}H_{28}O_4$                            |
| <b>Métodos para la identificación</b> | IR, RMN- $^1H$ , RMN- $^{13}C$ , UV, Rayos-X |
| <b>Punto de fusión</b>                | 178 °C                                       |



|                                       |                                     |
|---------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Nombre</b>                         | Tilifolidiona                       |
| <b>Formula mínima</b>                 | $C_{21}H_{22}O_5$                   |
| <b>Métodos para la identificación</b> | IR, RMN- $^1H$ , RMN- $^{13}C$ , UV |
| <b>Punto de fusión</b>                | No reportado                        |



|                                       |                                     |
|---------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Nombre</b>                         | 20-norinuroyleanol                  |
| <b>Formula mínima</b>                 | $C_{20}H_{28}O_4$                   |
| <b>Métodos para la identificación</b> | IR, RMN- $^1H$ , RMN- $^{13}C$ , UV |
| <b>Punto de fusión</b>                | 192-194 °C                          |

Figura 6. Diterpenos aislados y caracterizados de *S. semiatrata* con actividad farmacológica.

Un estudio etnobotánico, realizado en el año 2005 en la localidad de Santiago Huaucilla, Oaxaca, permitió identificar alrededor de 114 especies vegetales útiles en el tratamiento de varios padecimientos, destacando el género *Salvia*, cuyas especies son ampliamente utilizadas como antiinflamatorias, analgésicas, para el dolor de estómago, diarrea, nervios e insomnio. A la especie *S. semiatrata* la conocen comúnmente como mirto morado y se le atribuyen nueve usos medicinales a la parte aérea (Figura 7, Cuadro 4).

Cuadro 4. Usos medicinales de *S. semiatrata* en la localidad de Santiago Huaucilla, Oaxaca.

| <b>Usos</b>                          | <b>Preparación</b>    | <b>Aplicación</b> |
|--------------------------------------|-----------------------|-------------------|
| Cicatrizante                         | Maceración en aceites | Tópica            |
| Desinflamatorio/analgésico en golpes | Decocción             | Oral              |
| Dolor/Inflamación de oído            | Molida en fresco      | Ótica             |
| <b>Dolor/malestar estomacal</b>      | <b>Decocción</b>      | <b>Oral</b>       |
| Baños postparto                      | Decocción             | Tópica            |
| <b>Trastornos/Nervios/Tensión</b>    | <b>Decocción</b>      | <b>Oral</b>       |



Figura 7. Ejemplar fresco de *S. semiatrata*.

## 5.10. La ansiedad y sus trastornos

La ansiedad es una emoción normal, psicobiológica básica, adaptativa ante un desafío o peligro presente o futuro. Su función es la de motivar conductas apropiadas para superar dicha situación y su duración está en relación con la magnitud y a la resolución del problema que la desencadenó. La ansiedad patológica es una respuesta exagerada, no necesariamente ligada a un peligro, situación u objeto externo, puede llegar a resultar incapacitante, al punto de condicionar la conducta de un individuo (Cía, 2002).

La ansiedad puede abarcar desde una respuesta normal frente a una amenaza externa, hasta una incomodidad o sufrimiento prolongado y obsesivo. Los trastornos de ansiedad pueden manifestarse a través de cambios en las cogniciones, en el estado fisiológico, en el comportamiento y en las emociones.

De acuerdo con el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, quinta edición DSM-V (2003), los trastornos de ansiedad se clasifican como se muestra en el cuadro 5.

Cuadro 5. Clasificación de los trastornos de ansiedad de acuerdo con el DSM-V

| <b>Trastorno</b>           | <b>Síntomas</b>  | <b>Medicamento recetado</b>   |
|----------------------------|--|---|
| Por ansiedad de separación | Miedo y ansiedad intensos                                | Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS): paroxetina, fluoxetina |
| Por mutismo selectivo      | Incapacidad persistente de hablar a otros                | ISRS  |
| Pánico                     | Miedo y malestar que inician bruscamente                 | Benzodiazepinas: Diazepam, clonazepam   |
| Agorafobia                 | Miedo a padecer una crisis de pánico en lugares abiertos | ISRS  |

|   |  |  |
|---|--|--|
| Fobia específica                                | Temor excesivo a un objeto o situación   | ISRS                                   |
| Ansiedad social                                 | Temor por mostrarse ridículo ante los demás  | Betabloqueantes: propanolol            |
| Ansiedad generalizada                           | Preocupación excesiva, durante 6 meses como mínimo   | Benzodiazepinas                        |
| Ansiedad inducida por sustancias/medicamentos   | Crisis de angustia y ansiedad por abstinencia  | ISRS                                   |
| Ansiedad atribuible a otras condiciones médicas | Angustia o ansiedad derivada de una consecuencia fisiopatológica   | Antidepresivos tricíclicos: Imipramina |
| Otros trastornos específicos de ansiedad        | Ninguno de los síntomas anteriores, pero se especifica la razón por la cual no se puede clasificar el trastorno. | -                                      |
| Trastorno de ansiedad no especificado           | Ninguno de los síntomas anteriores y no se especifica la razón por la cual no se puede clasificar el trastorno.  | -                                      |

### 5.10.1. Epidemiología de los trastornos de ansiedad

En México, según la última encuesta de epidemiología psiquiátrica (Medina-Mora et al., 2003), aproximadamente uno de cada cuatro adultos de entre 18 y 65 años que viven en áreas urbanas han tenido un trastorno mental en algún momento de sus vidas, siendo la ansiedad y la depresión las más comunes (14.3% y 9.21 %, respectivamente), y la psicosis la más incapacitante. Las tasas de prevalencia en México se ubican en torno a la mediana entre los países que forman parte de las encuestas mundiales de salud

mental. Desafortunadamente, solo el 11% recibe un tratamiento mínimamente adecuado; esta brecha es mayor que la observada en países con un nivel de desarrollo similar. Esto pone de relieve la urgente necesidad de identificar oportunamente los casos que requieren tratamiento, así como alternativas terapéuticas (Medina-Mora et al., 2015).

### 5.10.2. Fisiología de la ansiedad

Muchas regiones del cerebro están involucradas en el reconocimiento y regulación de estímulos emocionales negativos y en la generación de respuestas cognitivas, conductuales o somáticas a estos estímulos.

Un estímulo condicionado proveniente de las vías sensoriales desde el entorno exterior se detiene primero en el tálamo y la corteza y se dirige a la amígdala, accediendo a los circuitos de respuesta emocional. Más adelante, áreas del tronco cerebral, comprendidas en el control de movimientos se activan. Si la información no es enviada al tronco cerebral y en su lugar es enviada de estructuras centrales a estructuras basales de la amígdala, una respuesta pasiva se pasa a una activa, es decir, de una respuesta pasiva de miedo a una estrategia activa de afrontamiento (Cía, 2002).

#### 5.10.2.1. Ansiedad y cerebro

Corteza orbitofrontal (COF): Cuando está lesionada, genera problemas del comportamiento o personalidad. La hipoactividad de la COF ha sido vinculada a la depresión, labilidad del humor, pobre control de los impulsos, y conductas inadecuadas y falta de criterio en las relaciones sociales.

Corteza prefrontal (CPF): Cuando una persona está ansiosa, el flujo que llega a la CPF izquierda se encuentra disminuido. Cuando el flujo de la CPF izquierda se ve disminuido aminora su control sobre las estructuras límbicas, permitiendo que la ansiedad crezca y que las cogniciones se vuelvan más catastróficas.

Ganglios basales (GBs): Integran sistemas que coordinan la conducta con los impulsos y la motivación, regulan el control de los impulsos y la expresión emocional e intermedian en las cogniciones ejecutivas. Tienen abundantes receptores de dopamina. Este

neurotransmisor está asociado a los sentimientos de recompensa, interés y motivación. La correlación de los GBs con los trastornos de ansiedad es múltiple.

**Sistema Límbico (SL):** Cuando el SL se encuentra hiperactivo, el tono emocional se eleva y domina la situación. Los sucesos se vuelven amenazantes, negativos, difíciles o aparentemente irresolubles. Si hay un severo déficit de serotonina se acentúa esta connotación negativa. Cada parte del SL jugará un rol en estos casos, para generar y potenciar distintos estados de ansiedad (Martin, 2013).

- **Amígdala:** Podría ser considerada como un sistema de alarma o de advertencia rápida o inmediata. Alerta de cambios en el entorno, el sentido del olfato es el único procesado directamente por la amígdala, estimula la respuesta al estrés, antes que la CPF pueda ejercer una influencia moderatoria sobre los mismos. La amígdala es fundamental para generar los síntomas de ansiedad conectados con la ansiedad aguda, el estrés, el pánico, y la ansiedad social.
- **Hipocampo:** Tiene un papel crítico en la conservación y evocación de la memoria, sin el tono emocional, de eso se encarga la amígdala.
- **Hipotálamo:** Opera mediante la secreción de neurohormonas o péptidos, los que liberan a su vez las hormonas hipofisarias, que se encargan de coordinar el sistema endócrino. Hipófisis coordina la actividad del sistema endócrino, alerta a las glándulas suprarrenales que liberen adrenalina y cortisol, en respuesta a un factor estresante (Davis, 2001).

### 5.10.3. Neurotransmisores implicados en la modulación de la ansiedad.

La expresión de ansiedad implica una actividad coordinada de numerosas vías cerebrales que involucran diferentes neurotransmisores.

Las neuronas producen y acumulan neurotransmisores y los liberan ante un estímulo. Cada neurona puede conectar en promedio con otras 10,000 neuronas y cada dendrita puede recibir la señal en una red muy compleja. Una neurona tiene un potencial de reposo, esto significa que el interior de la célula está cargado negativamente en relación

con el exterior. El cambio en la polarización de una neurona ocurre cuando los canales iónicos de la membrana se abren o cierran, lo cual altera la capacidad de determinado tipo de iones para entrar o salir de la célula. La apertura y el cierre de estos canales puede depender de la unión de diferentes neurotransmisores. El cambio en la polarización de una neurona genera una carga eléctrica causando un disparo neuronal.

Los neurotransmisores más importantes vinculados a la ansiedad son los siguientes:

- Glutamato: excitatorio, activa los disparos neuronales y está altamente distribuido en el cerebro. Activa el músculo liso.
- Serotonina o 5-HT: Las neuronas serotoninérgicas se conectan con diversas partes del cerebro e influyen ampliamente sobre el sistema límbico. Es el sistema de regulación o modulación de la temperatura corporal, la cognición, la percepción, el control de impulsos y los patrones de sueño. La corteza prefrontal plantea opciones para manejar situaciones negativas y resolver problemas de modo satisfactorio, pero sin la suficiente serotonina no puede hacer este trabajo. Cuando la serotonina es baja se afectan las cogniciones y la actividad impulsiva prevalece.
- Noradrenalina (NA): Activa los sistemas corporales. Estimula la respuesta al estrés.
- Dopamina (DA): Se necesita suficiente dopamina en los ganglios basales para llevar a cabo el control motor fino. Sus funciones en la corteza cerebral son mantener la alerta y la atención. Junto con los ganglios basales se relacionan con el gusto de completar diferentes objetivos y sentir placer al cumplirlos. Al comer un alimento que nos agrada mucho o después de una experiencia sexual, se libera dopamina. Muchas drogas de abuso mimetizan los efectos de la dopamina o activan su secreción.
- GABA: Inhibitorio, necesario para interrumpir los disparos neuronales.
- $\beta$ -endorfinas: Encargados de la disminución de dolor y de la liberación de dopamina. También se ligan al sentido de suficiente o de satisfacción (Kaur, 2017).

#### 5.10.4. Medicamentos con acción ansiolítica

##### Benzodiacepinas

La unión del GABA con el receptor GABA-A promueve la apertura del canal permitiendo la entrada del ion cloruro a la neurona, con la consiguiente reducción de su excitabilidad y potencial de disparos. Las benzodiacepinas son agonistas completos de este receptor y se ligan a un complejo proteico en un sitio denominado receptor BZD, modulando la acción del GABA y produciendo de este modo su efecto ansiolítico, anti-convulsionante y antipánico (Griffin, 2013).

De acuerdo con Cía (2002) las moléculas que pueden actuar en distintos pasos de la transmisión GABAérgica se podrían agrupar como sigue:

- Moduladores alostéricos del receptor GABA-A: barbitúricos, benzodiazepinas.
- Agonistas directos del receptor GABA-A: alcohol, barbitúricos (en altas dosis), hidrato de cloral.
- Incremento de la síntesis del GABA: topiramato, valproato.
- Inhibición del catabolismo del GABA: valproato, vigabatrin.
- Inhibidores de la recaptación: tiagabina
- Análogos del GABA: gabapentin, pregabalina.

Las benzodiacepinas provocan sedación a dosis ansiolíticas. Otras acciones adversas son el aumento de peso, cefalea, irregularidad menstrual, disminución de la actividad sexual, potencial adictivo y abstinencia (Griebel, 2013).

##### **Antidepresivos tricíclicos**

Estos compuestos inhiben la recaptura de 5-HT, de NA o de ambas. Al bloquear la recaptura, las monoaminas permanecen más tiempo disponibles en el espacio sináptico los que puede dar origen a varios fenómenos como son la desensibilización de algunos receptores sinápticos lo que contribuye a explicar las acciones antidepresivas. En ocasiones provocan efectos secundarios graves. El porcentaje de muerte de pacientes hospitalizados por sobredosis de este tipo de fármacos es del 2 al 3%, en su mayor parte al interferir con las funciones miocárdicas. Los efectos colaterales son sequedad en la



boca, midriasis, visión borrosa, convulsiones y coma. Ejemplos de estos fármacos: Imipramina, clorimipramina (Dziukas, 1991).

### **Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina**

Este grupo está representado por la fluoxetina, la fluvoxamina y la paroxetina. Ejercen acciones antidepresivas y ansiolíticas, al parecer por el aumento de las acciones de la 5-HT, dado que actúan selectivamente sobre la recaptura de este neurotransmisor.

### **Inhibidores de la monoamino-oxidasa**

Son inhibidores de la enzima monoamino-oxidasa (MAO), la cual es responsable de la degradación de monoaminas como DA, NA y 5-HT; es por lo que estos fármacos incrementan los niveles disponibles de los tres neurotransmisores en la sinapsis. Provocan efectos adversos como, aumento brusco de la presión arterial. Aumentan los niveles cerebrales de catecolaminas. Aumentan la concentración periférica de tiramina proveniente de los alimentos, produciendo crisis hipertensivas severas (Rodríguez-Landa, 1998).

### **Bloqueadores $\beta$ -adrenérgicos y hormonas esteroidales.**

Estos fármacos son alternativas para el tratamiento de los trastornos de ansiedad. Los bloqueadores betaadrenérgicos son un grupo de fármacos que producen un bloqueo competitivo y reversible de aquellas acciones de las catecolaminas medias a través de la estimulación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Se recomienda su uso junto con las benzodiazepinas. Por otra parte, las hormonas esteroidales ejercen acciones directas sobre los receptores cerebrales GABAérgicos, estas acciones pueden provocar cambios del estado de ánimo o de la respuesta a los efectos terapéuticos de drogas psicoactivas que actúan en los mismos receptores (Baulieu, 1996; Tamargo, 2011).

## 5.11. Dolor

En el dolor interviene un auténtico sistema nociceptivo formado por estructuras nerviosas y varios mecanismos específicos que constituyen una entramada red de neuropéptidos, receptores, canales de iones, transductores intracelulares y modificaciones en las células neuronales, que amplifican extienden y perpetúan la sensación dolorosa, más allá de la lesión. Ya que cada individuo aprende el significado de dolor a través de la experiencia personal, durante mucho tiempo no ha existido unanimidad a la hora de definirlo. Hasta ahora la definición más aceptada es la propuesta por la International Association for the Study of Pain (IASP): El dolor es una experiencia sensorial o emocional desagradable, asociada, a una lesión tisular presente o potencial, o que se describe en términos de dicha lesión.

Las dimensiones del dolor son: fisiológicas, fisiopatológicas, psicológicas, emocionales y afectivas (SED, 2016).

### 5.11.1. Epidemiología del dolor abdominal

De acuerdo con un estudio realizado por el IMSS (Chavarría-Isla, 2010), en su servicio de urgencias la prevalencia del dolor abdominal en México es la siguiente:

De un total de 3, 218 pacientes de un rango de edad de entre 20-59 años atendidos en un lapso de 3 meses, 1, 504 presentó gastroenteritis (47%), seguido en frecuencia por el diagnóstico de coleatititis con 357 pacientes(11%), el dolor pélvico de causa no especificada con 335 pacientes (10%), la hernia inguinal 333 pacientes(10%), otras enfermedades del estómago y duodeno 208 pacientes (7%), trastornos del sistema urinario con 141 pacientes(4%), apendicitis 86 pacientes (3%) y trauma abdominal con 19 pacientes (1%).

### 5.11.2. Bases estructurales y anatomía del dolor

Los nociceptores son un grupo especial de receptores, son fibras aferentes, encargadas de transmitir las señales de dolor frente a estímulos que producen daño o que potencialmente pueden lesionar tejidos. Existen cuatro tipos de nociceptores:

- Mecánicos: Se activan debido a un desplazamiento mecánico considerable, por estrés mecánico secundario a una presión directa o debido a una deformación tisular.
- Térmicos: Se activan por el calor (>45°C) o por el frío (<5 °C).
- Polimodales: Se activan por el calor, frío, presión mecánica o sustancias irritantes.

La dirección natural de la transmisión nociceptiva es del sistema nervioso periférico al sistema nervioso central. Las neuronas aferentes tienen su cuerpo fuera del sistema nervioso central y sus axones inervan los diferentes tejidos, cuya rama central viaja por la raíz dorsal y a lo largo de la médula espinal para establecer sinapsis con las neuronas involucradas en la transmisión del dolor.

La médula espinal constituye la primera estación sináptica y el filtro que permite eliminar los mensajes innecesarios, así como amplificar los importantes. Ahí las neuronas llamadas de segundo orden formarán parte de las vías ascendentes que transmitirán la información a los sistemas supra espinales. El tálamo es la estructura supra espinal que funciona como estación integradora y de relevo de la información, que pasa a todas las áreas de la corteza cerebral, tiene alrededor de 120 núcleos implicados en el procesamiento de la señal nociceptiva. Finalmente, el sistema de modulación endógeno del dolor está conformado por neuronas intermedias dentro de la médula espinal y tractos neurales descendentes: los cual permiten inhibir la señal de dolor (Zegarra, 2007).

### 5.11.3. Neurobiología del dolor

De acuerdo con el manual de medicina del dolor de la Sociedad Española del Dolor (SED) (2016), los nociceptores tienen terminaciones de tipo purinérgico, de sustancia P, de factor de crecimiento nervioso, de serotonina, de GABA, canales de sodio, calcio y potasio, sensibles a la concentración extracelular de protones y al potencial transitorio del

receptor, entre otros. Además de receptores metabotrópicos diversos como los opioides, glutaminérgicos y cannabinoides. En la médula espinal donde la neurona nociceptora realiza la primera sinapsis dentro del SNC, el neurotransmisor principal es el glutamato y adicionalmente puede liberarse sustancias P y calcitonina, los cuales se unirán a sus respectivos receptores provocando despolarización de membrana y el disparo de potenciales de acción que se transmitirán hacia el SNC y se harán conscientes en forma de dolor (SED, 2016).

#### 5.11.3.1. Vías del control nociceptivo

Opioides endógenos y exógenos pueden actuar en los terminales presinápticos de los nociceptores aferentes primarios, a través del receptor  $\mu$  dando como resultado la liberación de neurotransmisores del dolor, por lo tanto, en analgesia.

La activación del sistema neural descendente involucra la liberación de neurotransmisores:  $\beta$ -endorfinas, encefalinas, dinorfinas. Estos péptidos alivian el dolor, incluso en situaciones de estrés.

Las neuronas moduladoras descendentes del dolor liberan neurotransmisores en la médula espinal: serotonina, norepinefrina y activan interneuronas que liberan opioides en el asta dorsal espinal (Besson, 1999).

La liberación de serotonina y norepinefrina origina:

- Inhibición de la liberación de transmisores del dolor en las señales aferentes nociceptivas.
- Inhibición del segundo orden celular en la transmisión del dolor.

La administración de opioides da lugar a:

- Activación de los receptores opioides en el mesencéfalo.
- Activación de los receptores opioides en las células de segundo orden transmisoras de dolor previniendo la transmisión ascendente de la señal del dolor.
- Activación de los receptores opioides en los terminales centrales de la médula espinal previniendo la liberación de neurotransmisores del dolor (Jamison, 2002).

Los procesos de transmisión del dolor agudo, sin componentes inflamatorios ni neuropáticos, son relativamente sencillos. En resumen, la transmisión del dolor comprende: La transducción; es el proceso por el cual el estímulo nociceptivo es convertido en señal eléctrica en los nociceptores. La transmisión es el proceso por el cual los estímulos nociceptivos son referidos al asta dorsal de la médula espinal, donde se liberan los neurotransmisores del dolor: glutamato, sustancia P, péptido relacionado al gen de la calcitonina. Seguidamente el estímulo viaja hasta el tálamo y luego a la corteza cerebral. La modulación; es el proceso por el cual la señal nociceptiva en el asta dorsal de la médula puede ser inhibida y modificada para los centros supra espinales del dolor. Los opioides endógenos y exógenos inhiben la liberación de mediadores del dolor. La activación del sistema neural descendente da lugar a la liberación de  $\beta$ -endorfinas, encefalinas, dinorfinas; que alivian el dolor (Figura 8).

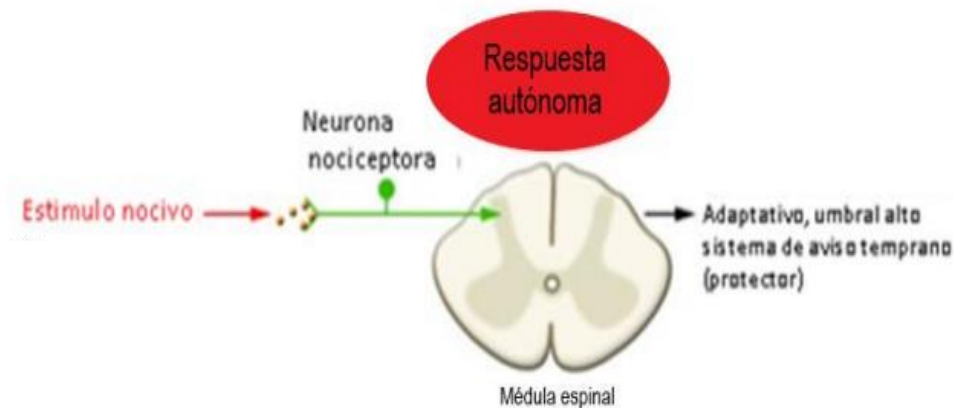


Figura 8. Proceso del dolor. Transducción, transmisión y modulación.

#### 5.11.4. Taxonomía del dolor

Para la clasificación del dolor se deben considerar cinco aspectos:

- 1.- Localización anatómica del dolor.
- 2.- Naturaleza del tipo de dolor.
- 3.- Características temporales del dolor y el patrón de ocurrencia.
- 4.- Patrones de intensidad.
- 5.- Etiología.

De acuerdo con estos cinco ejes, la organización mundial de la salud (OMS, 2005) propone la siguiente clasificación:

Cuadro 6. Clasificación del dolor de acuerdo con la OMS.

| <b>Clasificación OMS</b> |                  |                         |
|--------------------------|------------------|-------------------------|
| <b>I</b>                 | Origen anatómico | Somático                |
|                          |                  | Visceral                |
| <b>II</b>                | Fisiopatológico  | Nociceptivo             |
|                          |                  | Neuropático             |
| <b>III</b>               | Intensidad       | Leve                    |
|                          |                  | Moderado                |
|                          |                  | Intenso                 |
| <b>IV</b>                | Duración         | Agudo                   |
|                          |                  | Crónico                 |
| <b>V</b>                 | Etiología        | Cáncer                  |
|                          |                  | Diabetes                |
|                          |                  | Síndromes inflamatorios |

#### 5.11.5. Dolor nociceptivo

Dolor que surge de un daño real o una amenaza en tejido no neural, y que se debe a la activación de los nociceptores. Este tipo de dolor aparece en todos los individuos como consecuencias de la aplicación de estímulos que producen daño o lesión en órganos somáticos o viscerales. Es la consecuencia de la activación del sistema neurofisiológico, constituido por nociceptores periféricos, vías centrales de la sensación dolorosa y, finalmente corteza cerebral (Nicholson, 2006).

### 5.11.6. Dolor agudo

Es provocado por la estimulación nociceptiva producida por lesión y/o enfermedad de la piel, estructuras somáticas profundas o viscerales, o función anormal de un músculo o vísceras que no producen daño tisular real. El dolor agudo rara vez no se debe principalmente a las influencias ambientales. Al hablar de dolor agudo, generalmente, se refiere al dolor nociceptivo. Por otra parte, el dolor crónico, es aquel que persiste un mes después del curso habitual de una enfermedad aguda y se asocia con un proceso patológico crónico que causa dolor continuo, el cual se repite a intervalos durante meses o años.

### 5.11.7. Dolor visceral

Es el que proviene de órganos internos como el corazón y grandes vasos, los pulmones y vías respiratorias, aparato digestivo, hígado, vesícula biliar, órganos urológicos, como riñones y vías excretoras y el aparato reproductor.

Las vías que conducen el dolor visceral tanto a nivel central como periférico se organizan de manera difusa. El dolor visceral es difuso, mal localizado y referido. Entre estos dolores se encuentran la distensión de los órganos cavitarios, la tracción del mesenterio, la isquemia y los estímulos químicos endógenos, asociados, generalmente a inflamación. Todas las vísceras del abdomen y tórax poseen inervación aferente vinculada a nervios simpáticos y parasimpáticos, por lo que el dolor visceral está asociado a respuestas del SNA. Muchas vísceras están inervadas por terminales que no generan percepciones conscientes. Existen tres tipos de nociceptivos viscerales: Alto umbral, bajo umbral (estímulos mecánicos). El tercer tipo se denomina silente y responde a daño visceral o proceso inflamatorio. Los estímulos más adecuados para producir la sensación de dolor visceral son la tracción del mesenterio, la distensión de las capas de músculo liso de las vísceras huecas, la isquemia e inflamación, situaciones que pueden indicar un compromiso de la víscera (Plaghki, 2017).

### 5.11.8. Fármacos para tratar el dolor

Los analgésicos, son medicamentos que tienen la propiedad de atenuar o abolir la sensación de dolor, sin provocar pérdida de conciencia. Estos fármacos para aliviar el dolor se clasifican principalmente en antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y opioides (SED, 2016).

#### Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

El mecanismo de acción de los AINEs se basa fundamentalmente en su capacidad de inhibir la síntesis de prostaglandinas (PG). A partir del ácido araquidónico y en presencia de las enzimas llamadas ciclooxigenasas (COX) se sintetizan las PGs. Las PGs no son estimuladoras directas de ningún nociceptor, por lo que no causan dolor *per se*, pero sensibilizan a otras sustancias estimuladoras, como bradicinina, histamina, serotonina, etc.

Existen dos tipos de COX, la COX-1 y la COX-2. Aunque ambas ciclooxigenasas tienen similar afinidad por el ácido araquidónico y son homólogas en un 90%, Éstas presentan diferente afinidad por el sustrato y se encuentran en distintos lugares dentro de la célula. La COX-1 desempeña un papel importante en la síntesis de los prostanoides para propósitos fisiológicos y regula funciones como la protección gastrointestinal, la homeostasis vascular, la hemodinámica renal y la función plaquetaria. La COX-2 no se encuentra presente normalmente en la célula, pero aparece rápidamente tras la exposición de la célula a agentes como lipopolisacáridos o citocinas proinflamatorias, y regula la producción de las prostaglandinas que participan en la inflamación y en otros procesos no inflamatorios, tanto fisiológicos como patológicos (García, 2000).

Los AINE se clasifican de acuerdo con su acción sobre las COX en:

- Ibuprofeno, naproxeno, piroxicam y ácido mefenámico: Compiten con el ácido araquidónico por el sitio activo de las COX.
- Diclofenaco, flurbiprofeno e indometacina: Inhibidores no covalentes de alta afinidad, lentamente reversibles tanto de COX-1 como de la COX-2.



- Ácido acetilsalicílico y sus derivados acetilados: Inhibidores irreversibles por unión covalente a COX-1 como a la COX-2.

Los AINEs tienen un efecto analgésico techo y son el primer escalón de la escalera analgésica de la OMS. En asociación con opioides y coadyuvantes forman parte del segundo y tercer escalón. Sin embargo, los AINEs tienen factores de riesgo cardiovasculares, renales, gastrointestinales y hematológicos (Mendoza, 2008).

### Analgésicos opioides

Los efectos analgésicos de los opioides son debidos a la activación del sistema opioide endógeno (SOE), que es el principal mecanismo inhibitorio que modula de forma fisiológica la transmisión nociceptiva en mamíferos. El SOE es un sistema neuroquímico compuesto por receptores y sustancias transmisoras que están ampliamente distribuidas en el SNC Y SNP.

Existen tres receptores opioides en el ser humano: *Mu*, *Delta* y *Kappa*, presentan gran similitud estructural y son receptores de membrana acoplados a proteínas G. Cada receptor está involucrado en regular distintas funciones:

- Receptor *mu*: analgesia supraespinal, miosis, depresión respiratoria, dependencia física y euforia.
- Receptor *kappa*: analgesia espinal, ligera depresión respiratoria, miosis y sedación.
- Receptor *delta*: analgesia supra espinal y actividad sobre el músculo liso gastrointestinal.

Algunos ejemplos de opioides utilizados en la clínica para aliviar el dolor son la morfina, oxicodona, fentanilo, hidromorfona, metadona, buprenorfina, codeína, tramadol, tapentadol, sufentanilo. Estos analgésicos producen somnolencia, sedación, náuseas, vómitos, estreñimiento, prurito, retención urinaria, euforia, depresión respiratoria, tolerancia, dependencia física, incluso neurotoxicidad (Trescot, 2008).

## Antidepresivos y anticonvulsivos

Se utilizan algunos antidepresivos y anticonvulsivos para tratar el dolor, sobre todo los que son moduladores de la noradrenalina y la serotonina, neurotransmisores que tienen un papel importante en la vía descendente reguladora de la sensación nociceptiva. Los anticonvulsivos que regulan los canales de calcio son prescritos en dolores neuropáticos. El mecanismo de acción primario de la mayor parte de los antidepresivos se puede resumir en la capacidad que tienen de bloquear los transportadores de monoaminas encargados de recaptarlas desde la hendidura sináptica para reintroducirlas en la terminal presináptica (Maizels, 2005).

### 5.12. Alternativas para el tratamiento de los trastornos de ansiedad y dolor

La medicina complementaria y alternativa es un conjunto de diversos sistemas, prácticas y productos médicos y de atención de la salud que en general no se consideran parte de la medicina convencional. La medicina complementaria y alternativa se utiliza en forma adicional a la medicina convencional, en algunos casos, como reemplazo. Ciertas terapias de medicina complementaria y alternativa están comenzando a usarse en el tratamiento de diversos padecimientos (NIH, 2011).

La clasificación de las terapias alternativas de acuerdo con el Centro Nacional de Medicina Complementaria y Alternativa por sus siglas en inglés, son:

Cuadro 7. Clasificación de la medicina complementaria por el NCCAM, 2011.

| <b>Modalidad</b>                                  | <b>Definición</b>  |
|---|--|
| <b>Terapia de masaje</b>                          | Manipulaciones sistemáticas y científicas de los tejidos corporales utilizando preferentemente las manos para activar el sistema nervioso, muscular y la circulación en general. |
| <b>Mente-cuerpo, otras técnicas de relajación</b> | Métodos que fortalecen las interacciones entre la mente y el cuerpo con los beneficios previstos que incluye la relajación y el bienestar emocional.                             |

|                            |   |
|----------------------------|---|
| <b>Terapia con música</b>  | El uso de la música para ayudar a tratar trastornos neurológicos, mentales y del comportamiento.  |
| <b>Acupuntura</b>          | Tratamiento de los síntomas que implican la inserción de agujas a lo largo de vías específicas. La colocación varía según el problema. Algunas veces se usa en combinación con calor, moxibustión, acupresión o estimulación eléctrica. |
| <b>Productos naturales</b> | Uso de diversos medicamentos de hierbas: vitaminas, minerales y otros productos naturales. También incluye a los probióticos, microorganismos vivos.  |

Se estima que aproximadamente el 57% de pacientes con trastornos de ansiedad y/o dolor recurren a una de estas terapias alternativas, siendo el empleo de las plantas medicinales el más utilizado: debido entre otras cosas al bajo costo para poder acceder a ellas (Aguilar, 1994; Taddei-Bringas, 1999; Deng, 2019).

### 5.13. Modelos animales para la evaluación de los trastornos de ansiedad y la nocicepción

Los modelos animales de enfermedades humanas han sido utilizados desde hace muchos años en distintas áreas de la investigación, constituyendo uno de los pasos fundamentales en la biomedicina. Se requieren tanto para proyectos de investigación como en pruebas diagnósticas y terapéuticas y en los controles de productos farmacológicos. En investigación, se han desarrollado modelos de animales para evaluar enfermedades humanas y producir drogas o vacunas, y como fuente donante de células y órganos, así como proteínas sanguíneas o anticuerpos (Rodríguez, 2007).

El animal de laboratorio tiene las siguientes características: Es engendrado y producido en condiciones controladas; es mantenido en un entorno controlado; posee claros antecedentes genéticos y microbiológicos y existe una comprobación sistemática de estos antecedentes. Uno de los principales animales utilizados en experimentación son

los ratones (*Mus musculus*) debido a que su genoma tiene más del 95% de coincidencia con el del humano (Fuentes et al., 2008).

### 5.13.1. Modelos para el estudio de la ansiedad

Se estima que la investigación preclínica en el área de la ansiedad utiliza cerca de 30 modelos animales que permiten observar y cuantificar conductas de diversa índole. Estas conductas responden de una manera específica al tratamiento con compuestos ansiolíticos o ansiogénicos. Existen modelos de respuesta condicionada y no condicionada. Incluyen el estudio de patrones de actividad exploratoria espontánea en individuos expuestos a ambientes desconocidos que, invariablemente, incluyen áreas de seguridad. Como ejemplos de este tipo de paradigmas se puede citar el campo abierto, tablero con orificios, las transiciones luz-oscuridad y el laberinto elevado en cruz. La medida dependiente en estos modelos se relaciona con la evitación de un peligro ambiental potencial. Debido a que en estos modelos el peligro no es fácilmente localizable, se observan niveles altos de tigmotaxis, que es una conducta que se relaciona con la identificación de la dirección en la que puede materializarse cualquier peligro (Gómez, 2002; Polanco, 2011).

#### 5.13.1.1. Campo abierto

Es una prueba de exploración utilizada para evaluar la actividad ambulatoria ante un ambiente novedoso. Fue creada por Hall (1932), quien la utilizó para evaluar la emocionalidad en ratas midiendo la defecación y la orina, al igual que la actividad en el campo en un área circular iluminada aproximadamente 1.2 m de diámetro cerrado por un muro de 0.45 m de altura. Posteriormente, diversidad de versiones se han creado de estos instrumentos, los cuales han diferido en la forma del medio ambiente, iluminación, la presencia de objetos dentro del campo, el tamaño del campo, el número de subdivisiones, altura de paredes, textura del piso, olores dentro del campo, sonidos adicionados, entre otras. Actualmente, la prueba consiste en la medición de conductas que se producen al colocar un sujeto en un espacio abierto nuevo, en donde escapar está impedido por un muro que lo rodea. El animal se coloca en el centro del campo y se observa de 2 a 20 minutos (Walsh & Cummins, 1976; Lister, 1990).

El comportamiento de ansiedad que se provoca está dado por dos factores: la prueba individual (el animal se separa de su grupo social) y la agorafobia. El argumento es esencialmente que un animal típicamente se congelará cuando se exponga a un estímulo extraño o nocivo. Los tratamientos ansiolíticos disminuyen el estrés provocado por el estímulo extraño, teniendo como consecuencia una mayor exploración (Prut & Belzung, 2003).

#### 5.13.1.2. Tablero con orificios

El tablero con orificios es un instrumento que consiste en varios agujeros en el piso a través de los cuales un animal puede introducir su cabeza. La prueba evalúa la exploración dirigida de un animal y su actividad locomotora. Es importante tener en cuenta que los efectos de un fármaco en el comportamiento de un animal en la prueba de tablero con orificios, como en la prueba de campo abierto, pueden depender de manera crítica de la familiaridad del animal con el entorno de la prueba. Por ejemplo, en ratones que no se han familiarizado con el aparato de prueba, las benzodiazepinas ejercen un efecto bifásico en la inmersión de la cabeza, aumentan a dosis bajas y disminuyen a dosis altas. También se debe tener en cuenta que el aumento en la exploración observada después del tratamiento con benzodiazepinas se observa con mayor facilidad durante los primeros minutos de exposición, y se pueden encontrar disminuciones en la exploración a medida que aumenta la duración de la prueba. En ratones, las dosis bajas de benzodiazepinas, de etanol o de barbitúricos aumentarán con frecuencia la conducta de exploración. Un aumento o una disminución en contraste con el grupo que recibe el vehículo y similar al fármaco testigo en el número de inmersiones de la cabeza durante la exploración sugiere una acción ansiolítica en los animales (Takeda et al., 1998; Brown & Nemes, 2008).

#### 5.13.1.3. Laberinto elevado en cruz

Es una de las pruebas más utilizadas en investigación preclínica sobre ansiedad. Sus inicios están en las investigaciones de Montgomery (1955), quien demostró que las ratas Wistar muestran miedo en callejones abiertos y que los estímulos novedosos provocan comportamientos de evitación, aunque este disminuye con el tiempo.

El instrumento que se utiliza hoy en día está compuesto por dos brazos abiertos, dos brazos cerrados y un área central en forma de cruz que se encuentra elevado por encima del suelo. El sujeto es colocado en el centro del aparato y se le permite la exploración por un periodo de tiempo determinado. Las conductas utilizadas para los índices de ansiedad son: el número de entradas en los brazos, expresado en porcentaje o proporción de entradas en todos los brazos, tiempo de permanencia en los mismos, expresados en porcentaje o relación de tiempo total (Griebel, 1995).

El permanecer más en los brazos cerrados que el explorar los brazos abiertos ha sido un determinante de ansiedad. Entonces un fármaco ansiolítico ocasionará una mayor exploración en los brazos abiertos (Polanco, 2011).

Los modelos antes descritos se utilizan en conjunto para poder determinar la posible acción ansiolítica de un tratamiento: Si un tratamiento aumenta la preferencia de un animal por los brazos abiertos sin alterar la actividad locomotora en el tablero con orificios o campo abierto, proporciona evidencia de la acción ansiolítica (Harro, 2018).

### 5.13.2. Potenciación de la hipnosis inducida con pentobarbital sódico (PS)

El PS es uno de los anestésicos más utilizados en la práctica clínica veterinaria. La duración de la anestesia varía ampliamente, se considera que el efecto promedio tiene una duración de 30 minutos. El efecto se debe a la unión al receptor GABA-A presente en diferentes estructuras como la corteza, el putamen y el núcleo caudado del sistema nervioso central. El PS aumenta la duración de la apertura de los canales de cloro controlados por GABA, inhibiendo las acciones de los neurotransmisores excitadores y ejerciendo efectos no sinápticos en la membrana (Parra, 2003).

La prueba de potenciación de la hipnosis inducida con PS en modelos murinos consiste en administrar la sustancia de prueba seguida de una dosis de PS para inducir la hipnosis. El murino se coloca inmediatamente en una caja de acrílico translucido para observar la aparición de movimientos incoordinados (sedación) y la pérdida del reflejo de enderezamiento (hipnosis). El tiempo entre la pérdida y la recuperación del reflejo de

enderezamiento se registra como el tiempo de sueño o duración de la hipnosis (Ariza et al., 2007; Voguel, 2008; Aguirre-Hernández, 2016).

Cuando una sustancia hipnótica se administra junto con el PS tienden a prolongar el periodo de sueño.

### 5.13.3. Modelos para el estudio del dolor

Se debe tener en cuenta que el dolor se describe en humanos como una experiencia compleja. En la actualidad, no se pueden conocer las sensaciones de un animal, ya que no las puede comunicar, sólo se pueden estudiar las reacciones de éstos ante estímulos nocivos de muy diversa naturaleza. Es por lo que La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor, por sus siglas en inglés, IASP adaptó la definición de dolor para ser aplicada a los animales. Así, el dolor en animales sería: “una experiencia sensorial aversiva causada por una lesión real o potencial que produce reacciones motoras y vegetativas progresivas desencadena un comportamiento aprendido de evitación y puede modificar comportamientos específicos de la especie, incluyendo los sociales”.

En este sentido, hablar de modelos de nocicepción es más correcto que considerar el término dolor. Un modelo de nocicepción es el procedimiento por el cual se valora la reacción de un animal ante un estímulo nocivo de naturaleza variada o situación patológica inducida que puede ser utilizado en circunstancias fisiológicas o patológicas.

Entre los modelos que evalúan la nocicepción de forma aguda se encuentran fundamentalmente aquellos que utilizan un estímulo físico o químico y tienen como objetivo determinar una latencia de respuesta por parte del animal ante dicho estímulo y tienen un desarrollo temporal breve (Ortega, 2002).

### 5.13.3.1. Prueba de “Writhing”

La estimulación química implica la administración de agentes algogénicos que representan una forma de estimulación lenta y progresiva, tienen una mayor duración que otro tipo de estímulos y tiene un carácter ineludible.

La administración intraperitoneal de agentes que irritan las membranas serosas provoca un comportamiento muy estereotipado en el ratón y en la rata, que se caracteriza por contracciones abdominales, movimientos del cuerpo en general (especialmente de las patas traseras), torceduras de los músculos dorso-abdominales y reducción e incoordinación en la actividad motora (Le Bars, 2000). En general, las mediciones que se realizan son la aparición por unidad de tiempo de estiramientos abdominales resultantes de la inyección del agente algogénico. Estos comportamientos se consideran reflejos y evidencia de dolor visceral (Vyklícky, 1979) y la frecuencia de los calambres disminuye espontáneamente con el tiempo hasta tal punto que es imposible evaluar la duración de la acción de un analgésico en un solo animal. Además, el número de calambres está sujeto a una gran variabilidad.

Este modelo tiene la ventaja de permitir obtener evidencia de los efectos producidos por analgésicos débiles. Por otro lado, carece de especificidad. De hecho, estas pruebas funcionan no solo para todos los analgésicos mayores y menores, sino también para muchas otras sustancias, incluidas algunas que no tienen acción analgésica, por ejemplo, bloqueadores adrenérgicos, antihistamínicos, relajantes musculares, inhibidores de la monoaminoxidasa y neurolépticos. (Hendershot y Forsaith, 1959; Chernov et al., 1967; Loux et al., 1978). Así, un resultado positivo con esta prueba no significa necesariamente que haya actividad analgésica. Sin embargo, como todos los analgésicos inhiben los estiramientos abdominales, este método es útil para probar moléculas cuyas propiedades farmacodinámicas son desconocidas.



## 6. MÉTODO

### 6.1. Colecta de *S. semiatrata*

La parte aérea de *S. semiatrata* se colectó en el poblado de Santiago Huaucilla, Oaxaca en julio de 2017. Esta localidad se localiza en los paralelos 17°25' y 17°34' de latitud norte y los meridianos 96°56' y 97°08' longitud oeste y a una altitud entre 1200 y 2700 m. La identificación taxonómica de la especie fue realizada por la Dra. Martha Juana Martínez Gordillo del herbario de la Facultad de Ciencias, UNAM. El ejemplar de herbario se depositó en el Herbario de Plantas Medicinales del Centro Médico del IMSS con el número de registro 16362.

### 6.2. Obtención de los extractos

#### Extractos orgánicos

El material vegetal se secó a la sombra a temperatura ambiente y se molió finamente. La planta seca y molida se transfirió a recipientes para proceder con las extracciones. La obtención de los extractos se realizó mediante la técnica de maceración utilizando disolventes de polaridad creciente; hexano, acetato de etilo, una mezcla de acetona/metanol 1:1 y metanol. Cada extracción se dejó reposar durante 72 horas para posteriormente separar el extracto crudo del disolvente con la ayuda de un rotavapor. Para obtener la mayor cantidad posible de extracto, cada extracción se llevó a cabo por triplicado (Figura 9).

## Extracto acuoso

Se pesaron 86 g de material vegetal seco y molido, se añadieron 750 mL de agua, se procedió a realizar una decocción durante 10 minutos. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente, se filtró y se transfirió a matraces para su posterior liofilización.

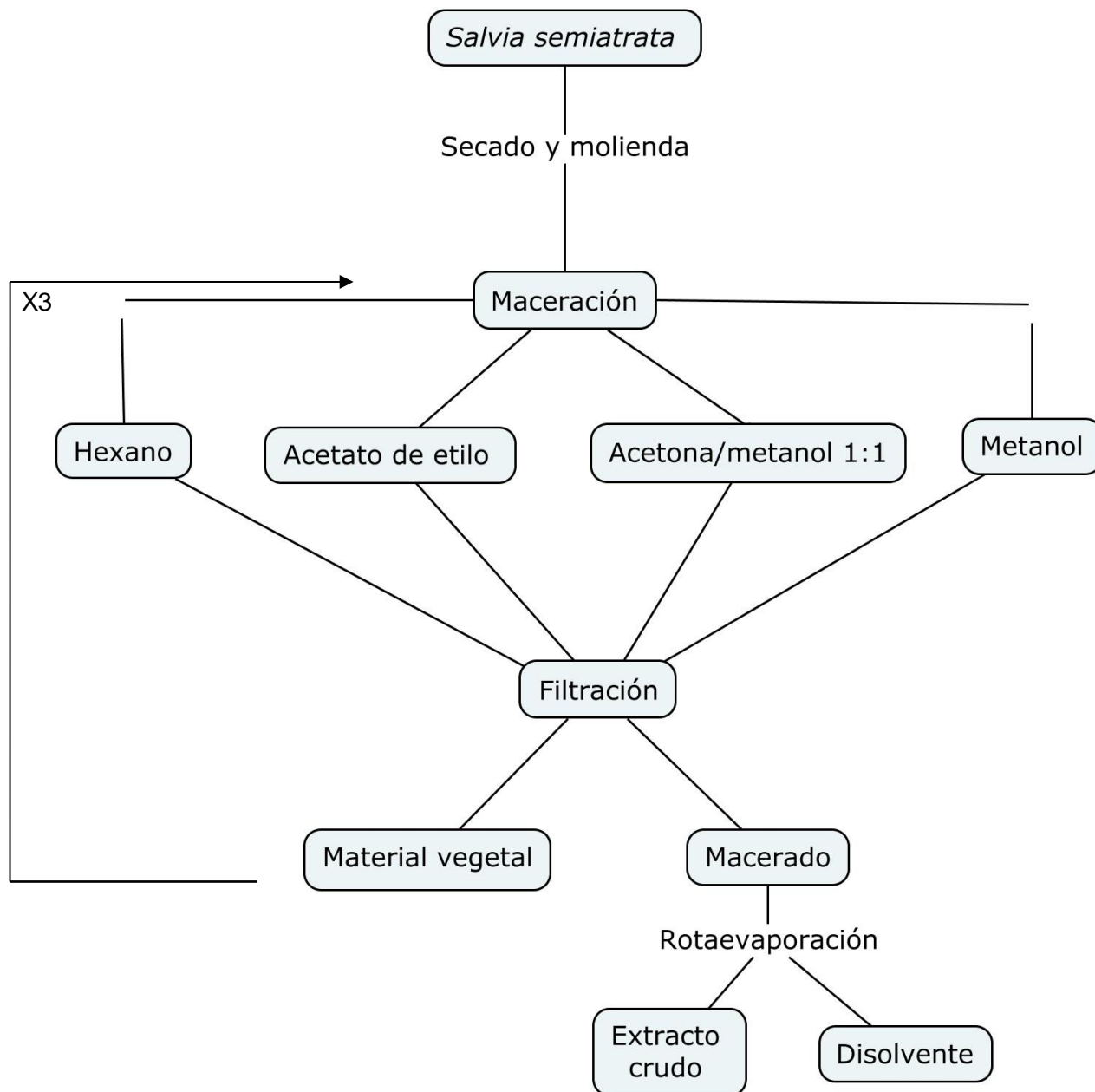


Figura 9. Obtención de los extractos orgánicos de *S. semiatrata*

### **6.3. Sujetos experimentales**

Ratones machos de la cepa CD1 proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM, con un peso de 25-30 g. Se resguardaron en el bioterio de la Facultad de Ciencias en cajas de acrílico en grupos de seis, con agua y alimento sin restricción. Mantenedos a una temperatura controlada de 22°C y con ciclo de luz/oscuridad de 12 h. Los ratones recibieron un manejo adecuado mediante el seguimiento de los lineamientos éticos establecido en la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

### **6.4. Preparación de extractos y fármacos**

Los extractos de hexano, acetato de etilo, acetona-metanol y el compuesto identificado fueron suspendidos con Tween 80 al 0.5% y solución salina (s.s al 0.9%). Los extractos de metanol y acuoso, así como los fármacos Ketorolaco (SupraDOL®, Liomont), Clonazepam (Gabalotec®, Tecnofarma), Pentobarbital Sódico (Pisabental®, Pisa) y el ácido acético (Merck) se disolvieron en s.s. Todos los tratamientos fueron administrados vía esofágica (p.o.), a excepción del ácido acético y el pentobarbital sódico, los cuales fueron inyectados vía intraperitoneal (i.p.) en un volumen de 10 mL/kg. Los animales del grupo testigo fueron administrados vía esofágica únicamente con s.s. Todos los tratamientos fueron preparados el mismo día de la evaluación farmacológica.

### **6.5. Determinación de la toxicidad oral aguda**

La determinación de la toxicidad oral aguda se realizó con base en el protocolo de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE, 2001). Este método consiste en administrar una dosis máxima de 2000 mg/kg a tres ratones para determinar si se produce muerte (toxicidad aguda). Si no hay muerte entonces la sustancia se considera no tóxica. Después de administrados los ratones con los extractos, se registraron los efectos tóxicos como: pérdida de la locomoción, convulsiones, ataxia, paro respiratorio o muerte durante 30 min y cada 2 h el primer día y diariamente hasta completar 14 días. Se registró el peso durante este lapso. Al término los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se realizó una exploración macroscópica en tres principales órganos depuradores: estomago, bazo, hígado y riñón.

## 6.6. Evaluación del efecto ansiolítico

Se evaluó el efecto ansiolítico de los cinco extractos mediante las pruebas de campo abierto, tablero con orificios y cruz elevada. Asimismo, también se realizó la prueba de potenciación de la hipnosis con Pentobarbital Sódico. Cada grupo de seis animales fueron administrados con el vehículo, fármaco de referencia: clonazepam (0.5 mg/kg), extractos orgánicos y acuoso a una dosis de 300 mg/kg, la evaluación de la curva dosis respuesta de los extractos más activos (hexano y acetato de etilo) se evaluaron a una dosis de 3,30 mg/kg y 3, 30 y 100 mg/kg, respectivamente. Finalmente el compuesto a 0.1, 1 y 10 mg/kg.

**Prueba de campo abierto.** La prueba consiste en colocar a los ratones individualmente en una caja de acrílico con 12 divisiones (cuadrados de 6 x 6 cm) y registrar durante 2 minutos el número de cuadros explorados por cada ratón (Prut y Belzung, 2003).

**Tablero con orificios** “hole-board”. Esta prueba consiste en una caja de acrílico con un piso de madera con orificios distribuidos uniformemente. Los ratones son colocados sobre el tablero y se cuentan el número de veces que los animales introducen su cabeza en los orificios en un periodo de tres minutos. Una disminución en el número de exploraciones será indicativa del efecto ansiolítico (Clark et al., 1997).

**Cruz elevada “plus-maze”.** Este instrumento esta hecho de madera y consta de una cruz elevada con dos brazos abiertos de 30 x 5 cm y dos brazos cerrados de 30 x 5 x 15 cm. Dichos brazos se extienden a partir de una plataforma central de 5 x 5 y se encuentran elevados a 50 cm del suelo. Los ratones se colocan en la parte central y se cuenta el tiempo que los animales permanecen en los brazos abiertos o cerrados durante 5 minutos. La exploración incrementada en los brazos abiertos es indicativa del efecto ansiolítico (Lister, 1987).

## 6.7. Potenciación de la hipnosis inducida por Pentobarbital Sódico (PS).

Dicha prueba farmacológica es utilizada para evaluar el efecto depresor de los extractos y el compuesto aislado. Los ratones fueron administrados con cada uno de los tratamientos y 45 minutos después se inyectaron con una dosis de 42 mg/kg, i.p. de PS para enseguida registrar la latencia a la sedación, latencia a la hipnosis y la duración de la hipnosis. Sustancias hipnóticas incrementarán la duración de la hipnosis producida por PS (González-Trujano et al., 1998).

Los modelos antes descritos fueron evaluados consecutivamente, iniciando con el modelo de campo abierto y terminando con la prueba de potenciación de la hipnosis inducida por PS (Figura 10).

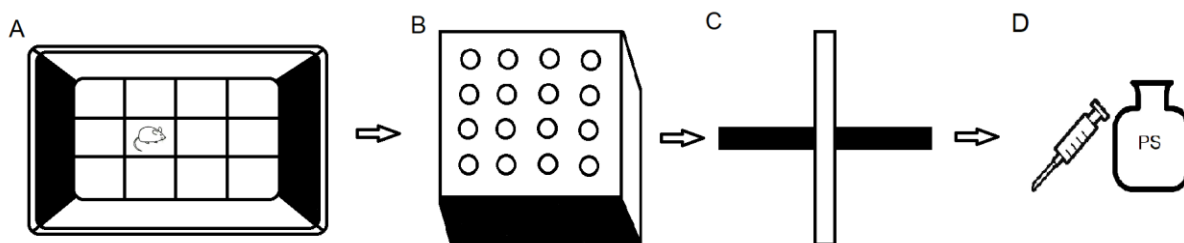


Figura 10. Evaluación del efecto ansiolítico. A) Campo abierto, B) tablero con orificios, C) cruz elevada, D) Potenciación de la hipnosis inducida con PS.

## 6.8. Evaluación de la actividad antinociceptiva

La evaluación del efecto antinociceptivo se realizó mediante el modelo de estiramiento abdominal "Writhing". Para la construcción de las curvas dosis-respuesta, los extractos activos y el compuesto puro aislado fueron probados en grupos independientes constituidos de seis ratones cada uno. Los extractos fueron evaluados a una dosis de 300 mg/kg, los extractos más activos (hexano, acetato de etilo y acetona/metanol) a dosis de 10, 100 y 600 mg/kg y el compuesto a 0.1, 1 y 10 mg/kg. El fármaco de referencia ketorolaco fue administrado a 10 mg/kg. La actividad antinociceptiva se evaluó 30 minutos después de la administración de cada tratamiento.

**Modelo de estiramiento abdominal “Writhing”.** Esta prueba consistió en la administración vía intraperitoneal (i.p.) de ácido acético al 1%, provocando irritabilidad en la cavidad peritoneal, que a su vez ocasiona una conducta estereotipada donde son característicos los estiramientos de los miembros posteriores y las contracciones abdominales (Collier et al., 1968). El número de estiramientos se contó cada 5 minutos durante un período total de 30 minutos después de la inyección del agente nociceptivo (Viana et al., 2003).

### **6.9. Identificación de los compuestos presentes en los extractos de mediante cromatografía en capa fina (CCF).**

Los metabolitos secundarios presentes en los extractos se identificaron por medio de CCF. Se utilizaron placas de sílica gel (Merck). Las muestras de cada extracto, así como estándares reportados en la literatura se aplicaron en las placas cromatográficas. En la primera placa se realizó la identificación de los terpenos: ácido ursólico, estigmasterol,  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, ácido oleanólico,  $\beta$ -sitosterol en los extractos de baja y mediana polaridad que son los extractos de hexano, acetato de etilo y la mezcla de acetona/metanol. El eluyente fue una mezcla de hexano/acetato de etilo 7:3 y la placa se reveló con anisaldehído.

En la segunda placa se realizó la identificación de los flavonoides libres: quercetina, canferol, apigenina y luteolina en los extractos de mediana y alta polaridad que son los extractos de acetato de etilo, acetona/metanol 1:1 y metanol. El eluyente fue una mezcla de cloroformo/acetona/ácido fórmico 12:3:2 y la placa se reveló con *Natural Products* (2-aminoetil difenilborinato) y se visualizó bajo luz UV a una longitud de onda de 365 nm.

En la tercera placa se realizó la identificación de los flavonoides glicosilados: rutina y naringina en los extractos de alta polaridad que son los extractos de acetato de etilo acetona/metanol y metanol. El eluyente fue una mezcla de acetato de etilo/ácido fórmico/ácido acético/acetona/agua 12:1:1:6:1 y la placa se reveló con *Natural Products* y se visualizó bajo luz UV a una longitud de onda de 365 nm.

## 6.10. Análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) de los extractos

La identificación y concentración de los compuestos de tipo terpeno, ácidos fenólicos y flavonoides presentes en los cinco extractos de *S. semiatrata* se realizó en un cromatógrafo marca Agilent serie 1100 equipado con un detector de arreglo de diodos.

El extracto de hexano se preparó a una concentración de 12.5 mg/500 µL de disolvente grado CLAR y los extractos de acetato de etilo, acetona/metanol, metanol y acuoso a una concentración de 25 mg/500 µL de disolvente grado CLAR. Se eliminaron impurezas mediante acrodiscos con membrana de nylon con una apertura de poro de 0.45µm. Se inyectaron 10 µL de extracto de hexano y 20 µL de los extractos restantes.

### 6.10.1. Elaboración de las curvas patrón

Para la cuantificación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de *S. semiatrata* se elaboraron curvas de calibración para cada uno de los estándares, se inyectaron cinco puntos desde 0.048 µg hasta 0.4 µg de cada compuesto. Las interpolaciones se hicieron con el programa ChemStation de Agilent Co. La variación del área en unidades de absorbancia de cada inyección fue utilizada para construir el modelo matemático de regresión lineal con la fórmula  $Y=mX+b$ , la cual se comparó posteriormente con los extractos y de esta manera se determinó la concentración de cada compuesto.

### Identificación de terpenos

Para la identificación y cuantificación de terpenos se utilizó una columna Zorbax Eclipse XDB-C8(125 x 4.0 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula). La fase móvil fue de acetonitrilo-agua (80:20), el flujo fue de 1 mL/min y una temperatura de 40 °C. El equipo se calibró a una longitud de onda de 215 y 220 nm, el tiempo de análisis fue de 30 minutos.

## Identificación de ácidos fenólicos

La identificación y cuantificación de ácidos fenólicos fue realizada con una Columna Nucleosil 100 A (125 x 4.0 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula). El flujo de la fase móvil fue de 1 mL/min, se utilizó agua a un valor de pH= 2.5 y acetonitrilo. El tiempo de análisis fue de 30 minutos.

## Identificación de flavonoides

La identificación y cuantificación de flavonoides se llevó a cabo con una columna C18 Hypersil ODS (125 mm x 4 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula). El flujo de la fase móvil se mantuvo a 1 mL/min y consistió en un gradiente de agua a pH=2.5 y acetonitrilo (85:15). La temperatura fue de 30 °C. El tiempo de análisis para este método fue de 30 minutos.

### **6.11. Separación y análisis de los componentes de los extractos activos**

La separación de los compuestos de los extractos de hexano y acetato de etilo se llevó a cabo por cromatografía en columna convencional sobre gel de sílice. Se emplearon 180 y 150 gramos de gel de sílice para separar 40 y 6.8 gramos del extracto de acetato de etilo y de hexano, respectivamente. La elución consistió en la utilización de hexano 100%, posteriormente, mezclas de hexano-acetato de etilo de polaridad creciente, hasta eluir con acetato de etilo (100%) y, finalmente con metano al 100%. Se colectaron fracciones de 100 mL en matraces y se concentraron en un rotavapor. Por cromatografía en capa fina se analizó cada fracción y se reunieron por similitud.

Las fracciones que presentaron menos componentes en CCF se purificaron mediante las técnicas de cristalización, recristalización, sistema de disolventes inmiscibles y columna cromatográfica. Los compuestos fueron identificados mediante la determinación del punto de fusión con un aparato Fisher-Jonhs. Los espectros de RMN-<sup>1</sup>H fueron registrados en un Espectrómetro Avance DPX400 (Bruker) a 400 MHz. El análisis cristalográfico se realizó en un Difractómetro marca Bruker modelo Smart Apex bajo los estándares del Instituto de Química de la UNAM.



Para la identificación y cuantificación de las fracciones mediante CG-EM se utilizó una columna HP-5MS (30m x 0.25mm x0.25µm). El gas acarreador fue helio a un flujo constante de 1 mL/min. La inyección de la muestra fue de 1µL, en un inyector de tipo Splitless a 250° C. La temperatura del horno fue 40°C por 1 min, 10°C/min hasta 250°C durante 5 min, 10°C/min hasta 285 °C durante 20 min. Los resultados reportados se dan con referencia a la biblioteca NIST versión 1.7<sup>a</sup>. El análisis se realizó bajo la metodología del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

### **6.12. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se hizo mediante análisis de varianza (ANADEVA) seguido de la prueba post hoc de Dunnett en la comparación de los tratamientos contra el control. Se utilizó el programa GraphPad versión 6.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Rendimiento de los extractos

El rendimiento de los extractos fue calculado con base en el peso del material vegetal seco que fue 1466.3 g. Como se observa en el cuadro 8, los extractos con mayor rendimiento fueron el acuoso y el de acetato de etilo.

Cuadro 8. Rendimientos de los extractos orgánicos y acuoso de *S. semiatrata*.

| <b>Material vegetal</b> | <b>Disolvente</b> | <b>Peso extracto</b> | <b>Rendimiento</b> |
|-------------------------|-------------------|----------------------|--------------------|
| Parte aérea (1466 g)    | Hexano            | 16.3 g               | 1.11 %             |
|                         | Acetato de etilo  | 81.0 g               | 5.52%              |
|                         | Acetona/metanol   | 34.0 g               | 2.31%              |
|                         | Metanol           | 31.3 g               | 2.13 %             |
| Parte aérea (86 g)      | Agua              | 5.0 g                | 5.81%              |

## 7.2. Determinación de la toxicidad oral aguda de los extractos

La evaluación de la toxicidad aguda de los extractos no produjo mortalidad ni efectos tóxicos en los ratones, tales como temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma. Asimismo, no se observó ningún daño macroscópico o pérdida de peso después de 14 días de la administración de los tratamientos (Figura 11). Por lo que de acuerdo con el sistema Global Armonizado (GSH) se clasifican en categoría 5, lo que significa que el valor aproximado de la  $DL_{50}$  se encuentra por encima de los 2000 mg/kg y se considera de toxicidad mínima.

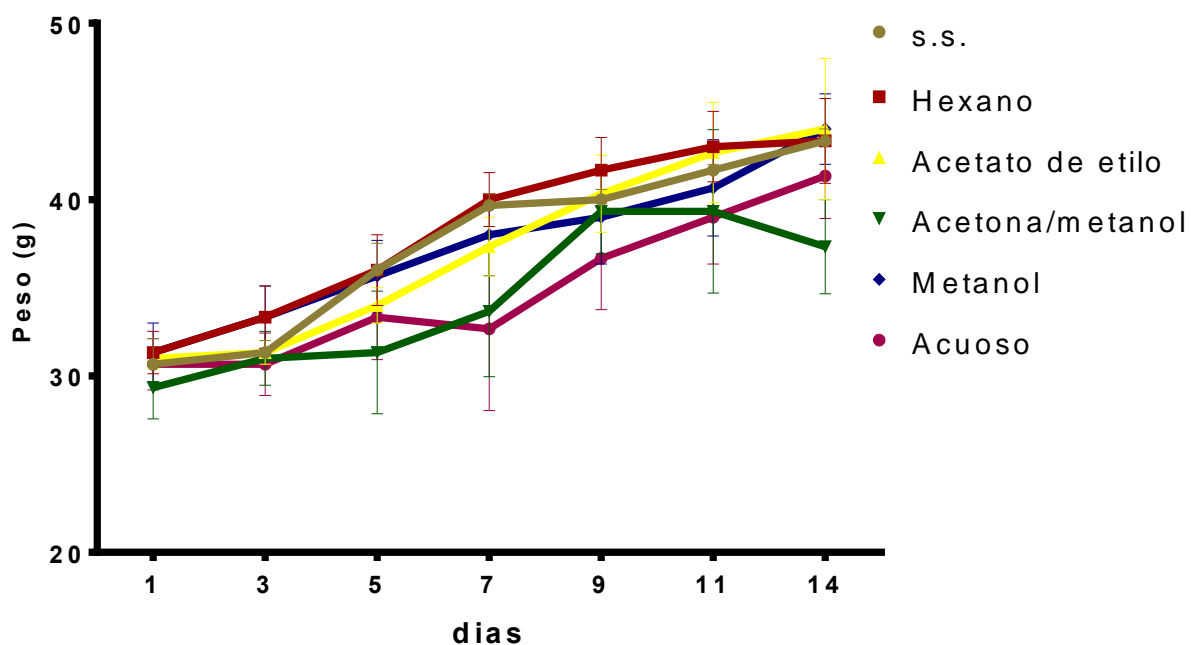


Figura 11. Registro del peso de los ratones durante 14 días en la evaluación de la toxicidad oral aguda de los extractos de *S. semiatrata*. Las líneas representan el promedio de tres animales ANADEVA de dos vías seguida de una prueba de Dunnett.

### 7.3. Efecto ansiolítico de los extractos

En el modelo de cruz elevada (Figura 12 C), los cinco extractos evaluados produjeron un incremento en la exploración en brazos abiertos a las dosis de 300 mg/kg; sin embargo, solamente los extractos de hexano y acetato de etilo presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control (s.s.). En relación con los otros modelos, campo abierto (Figura 12 A) y tablero con orificios (Figura 12 B) solamente el extracto de acetona/metanol disminuye la conducta de exploración respecto al grupo control.

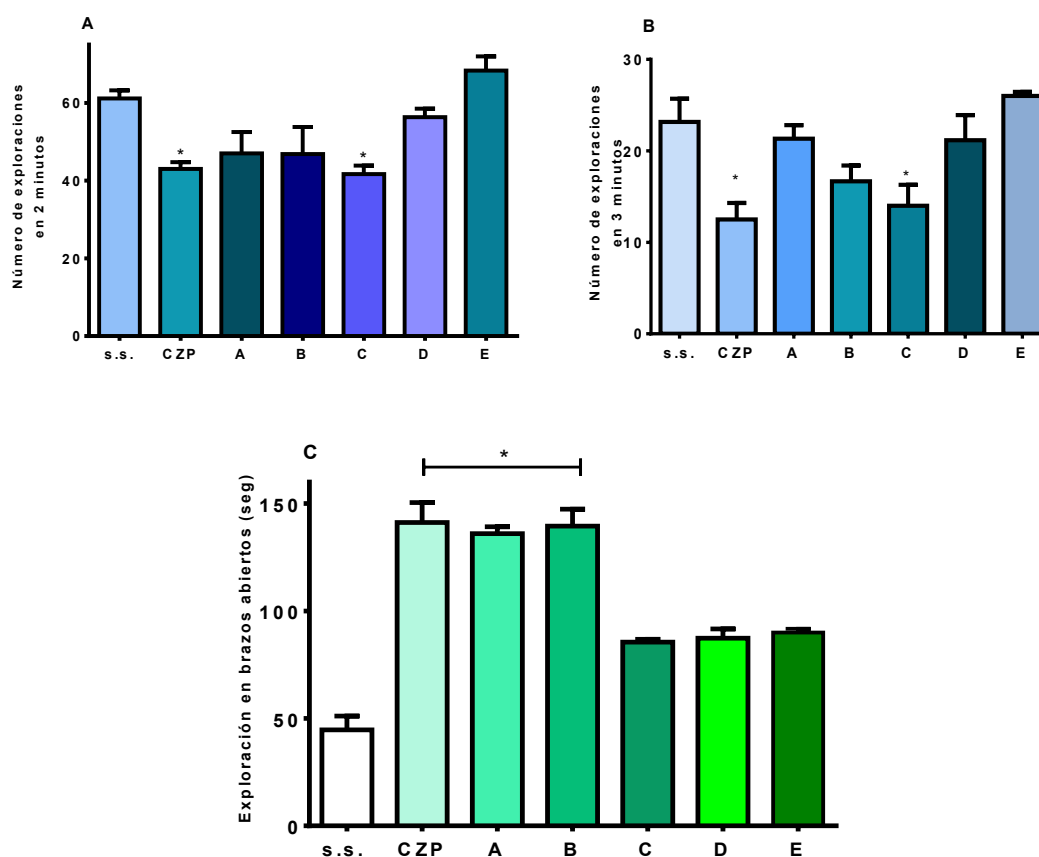


Figura 12. Evaluación del efecto ansiolítico de los extractos de *S. semiatrata*. Modelo de campo abierto (A), tablero con orificios (B) y cruz elevada (C). Solución salina (s.s.), clonazepam (CZP), extracto de hexano (A), extracto de acetato de etilo (B), extracto de acetona/metanol (C), Extracto de metanol (D), extracto acuoso (E). Las barras representan el promedio  $\pm$  E.E.M. de seis animales. \*  $p < 0.05$ , ANADEVIA seguida de la prueba de Dunnett.

## 7.4. Potenciación de la hipnosis inducida por PS

Ninguno de los extractos de *S. semiatrata* a una dosis de 300 mg/kg administrados por vía esofágica produjeron efecto significativo en latencia a la sedación (Figura 13 A), latencia a la hipnosis (Figura 13 B) y duración de la hipnosis (Figura 13 C).

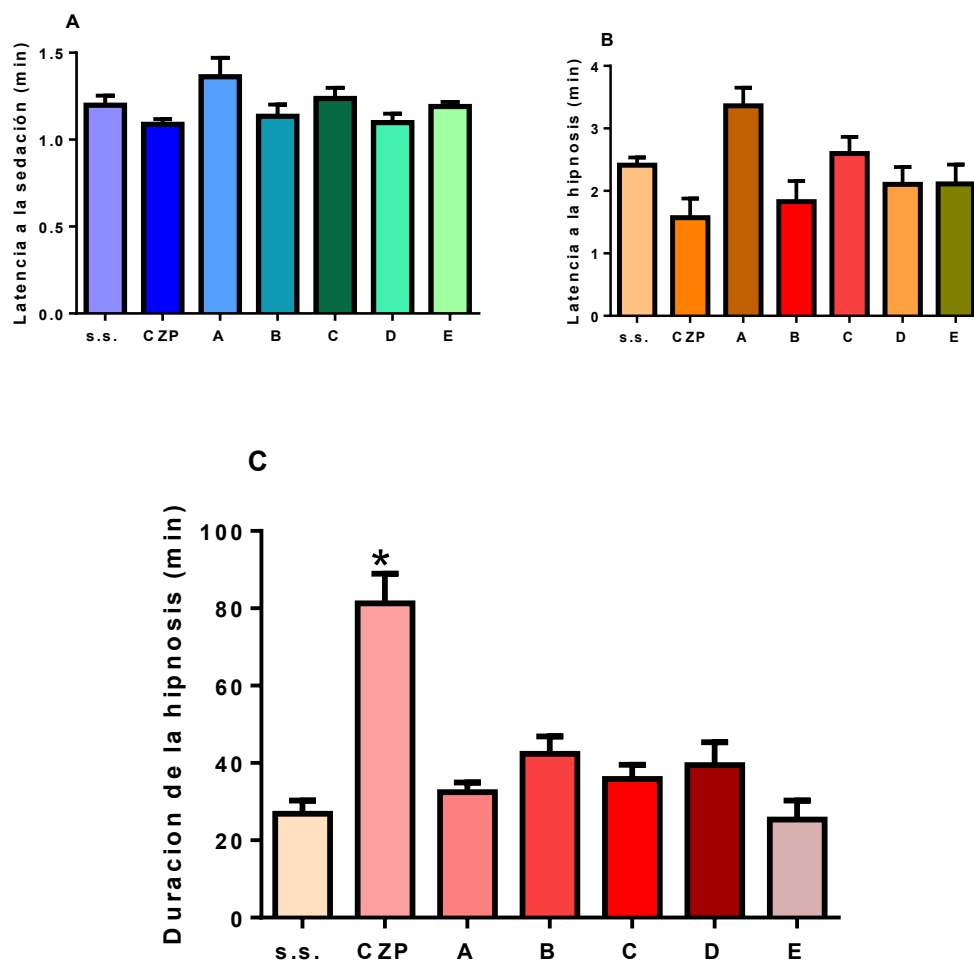


Figura 13. Evaluación de la duración de la potenciación de la hipnosis de los extractos de *S. semiatrata*. Solución salina (s.s.), clonazepam (CZP), extracto de hexano (A), extracto de acetato de etilo (B), extracto de acetona/metanol (C), Extracto de metanol (D), extracto acuoso (E). Las barras representan el promedio  $\pm$  E.E.M. de seis animales. \*  $p < 0.05$ , ANADEVa seguida de la prueba de Dunnett.

## 7.5. Efecto antinociceptivo de los extractos

Los extractos orgánicos y acuoso evaluadas a la dosis de 300 mg/kg, p.o. en comparación con el grupo control son mostradas mediante cursos temporales (Figura 14 A). Se observa que los extractos disminuyeron el número de estiramientos, se realizó la gráfica de estiramientos totales, donde se aprecia que todos los tratamientos reducen la nocicepción respecto al grupo control; sin embargo, solo los extractos de hexano, acetato de etilo y acetona/metanol mostraron una diferencia significativa respecto al control (Figura 14 B).

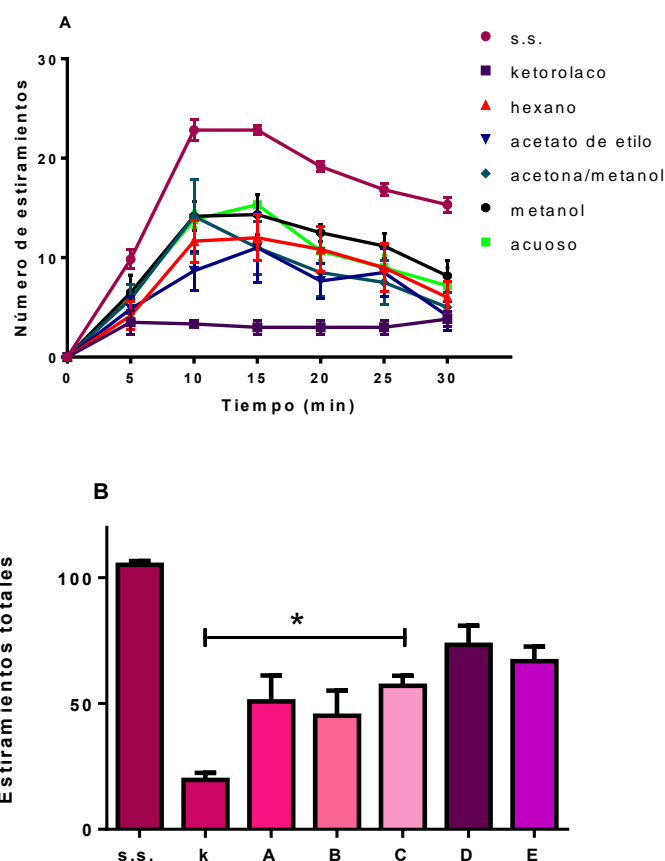


Figura 14. Efecto antinociceptivo de los extractos de *S. semiatrata*: Curso temporal (A), estiramientos totales (B). Solución salina (s.s.), ketorolaco (k), extracto de hexano (A), extracto de acetato de etilo (B), extracto acetona/metanol (C), extracto de metanol (D), extracto acuoso(E). Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar de seis animales. Los asteriscos indican diferencias significativas \*P < 0.05 con respecto al vehículo, ANADEVa seguida de la prueba de Dunnett.

## 7.6. Evaluación de las curvas dosis-respuestas de los extractos activos

### 7.6.1. Evaluación del efecto ansiolítico del extracto de hexano

El extracto de hexano evaluado a la dosis de 3, 30 y 300 mg/kg mostró un aumento en la exploración en brazo abiertos y una disminución en la exploración en el modelo de campo abierto significativo respecto al control y similar al fármaco de referencia CZP (Figura 15).

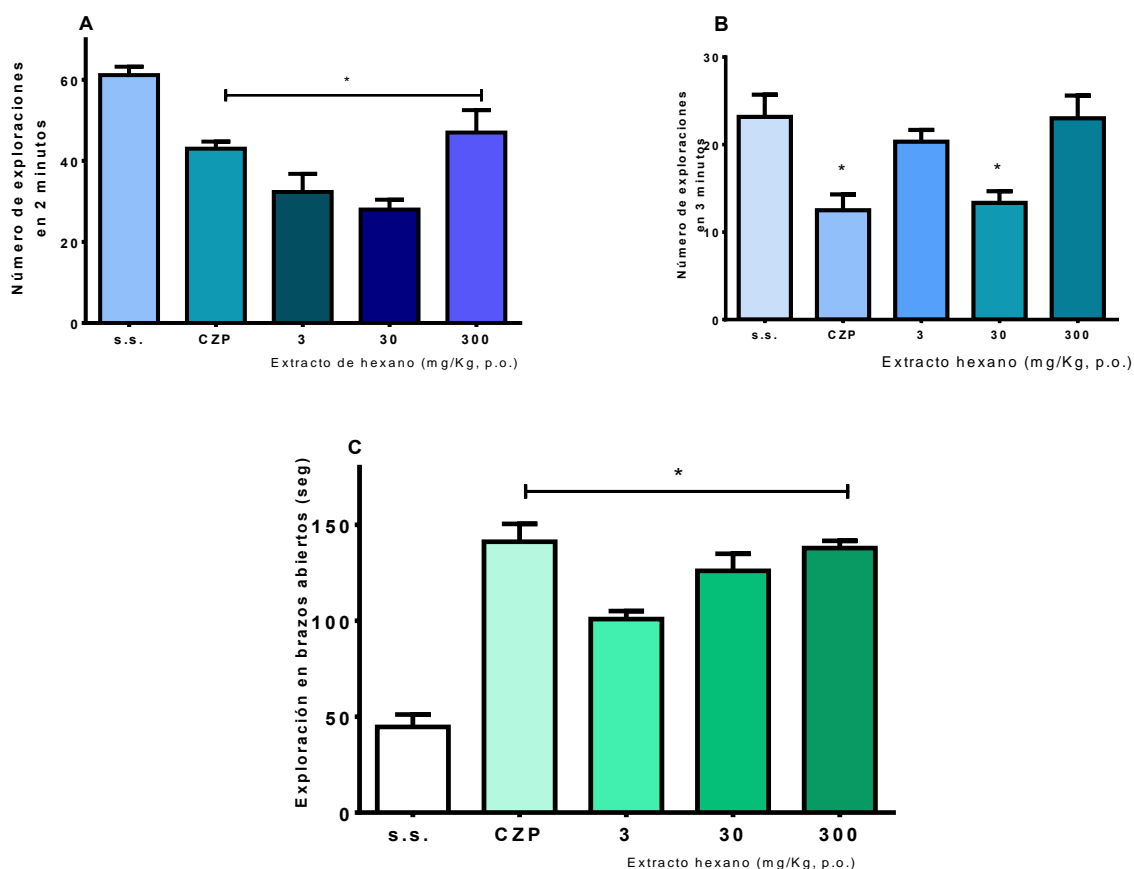


Figura 15. Evaluación del efecto ansiolítico del extracto de hexano de *S. semiatrata*. Modelo de campo abierto (A), tablero con orificios (B) y cruz elevada (C). Solución salina (s.s.), clonazepam (CZP). Las barras representan el promedio  $\pm$  E.E.M. de seis animales. \*  $p < 0.05$ , ANADEVa seguida de la prueba de Dunnett.

### 7.6.2. Potenciación de la hipnosis inducida con PS del extracto de hexano

El extracto de hexano mostró un incremento en la duración de la hipnosis a las dosis de 3 y 30 mg/kg (Figura 16).

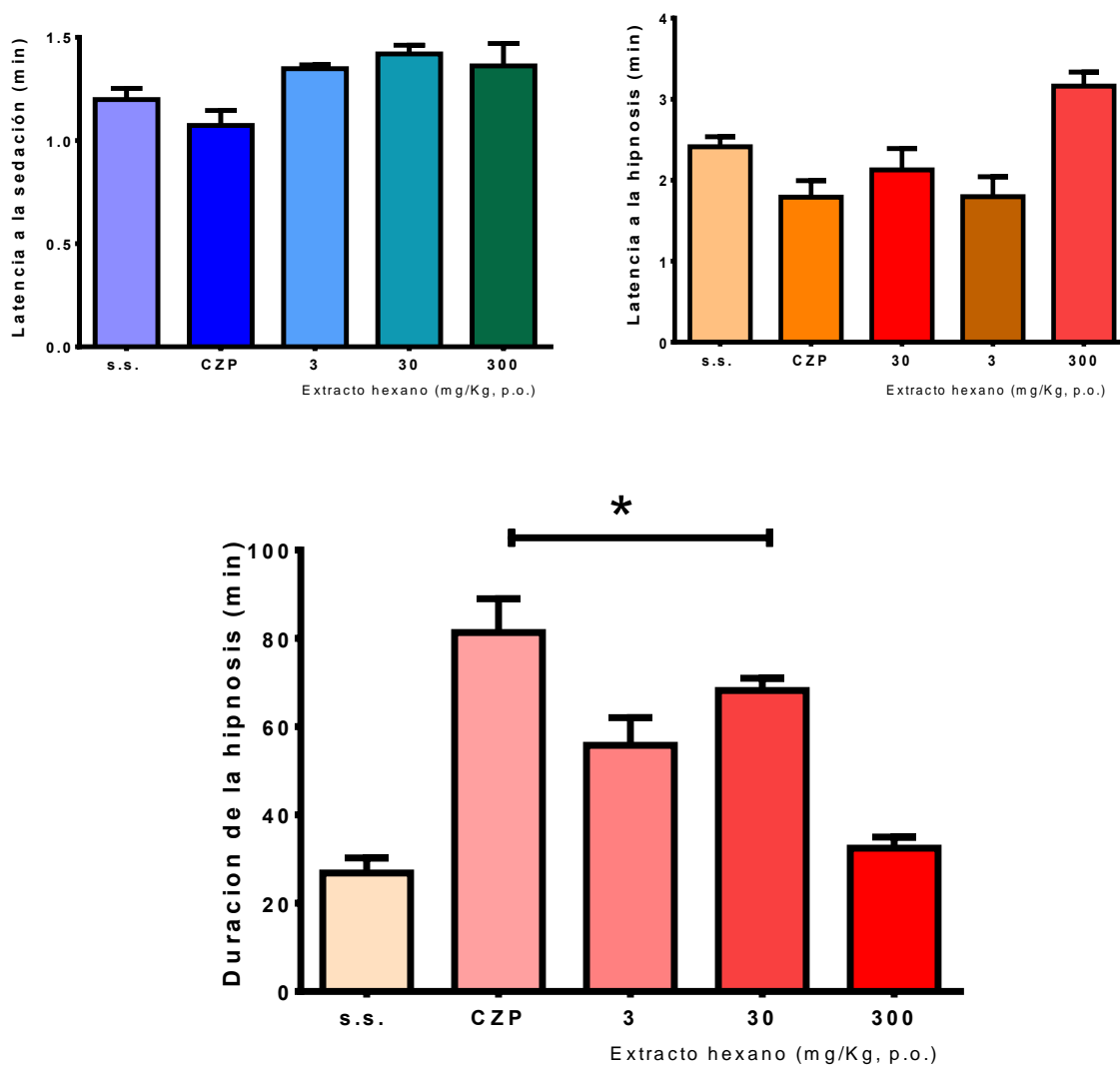


Figura 16. Evaluación de la potenciación de la hipnosis inducida con PS del extracto de hexano de *S. semiatrata*. Solución salina (s.s.), clonazepam (CZP). Las barras representan el promedio  $\pm$  E.E.M. de seis animales. \*  $p < 0.05$ , ANADEVa seguida de la prueba de Dunnett.



### 7.6.3. Evaluación del efecto ansiolítico del extracto de acetato de etilo

Con respecto al extracto de acetato de etilo se observó un efecto ansiolítico a la dosis de 100 y 300 mg/kg similar al CZP y no se observó diferencia significativa en los modelos de campo abierto y tablero con orificios (Figura 17).

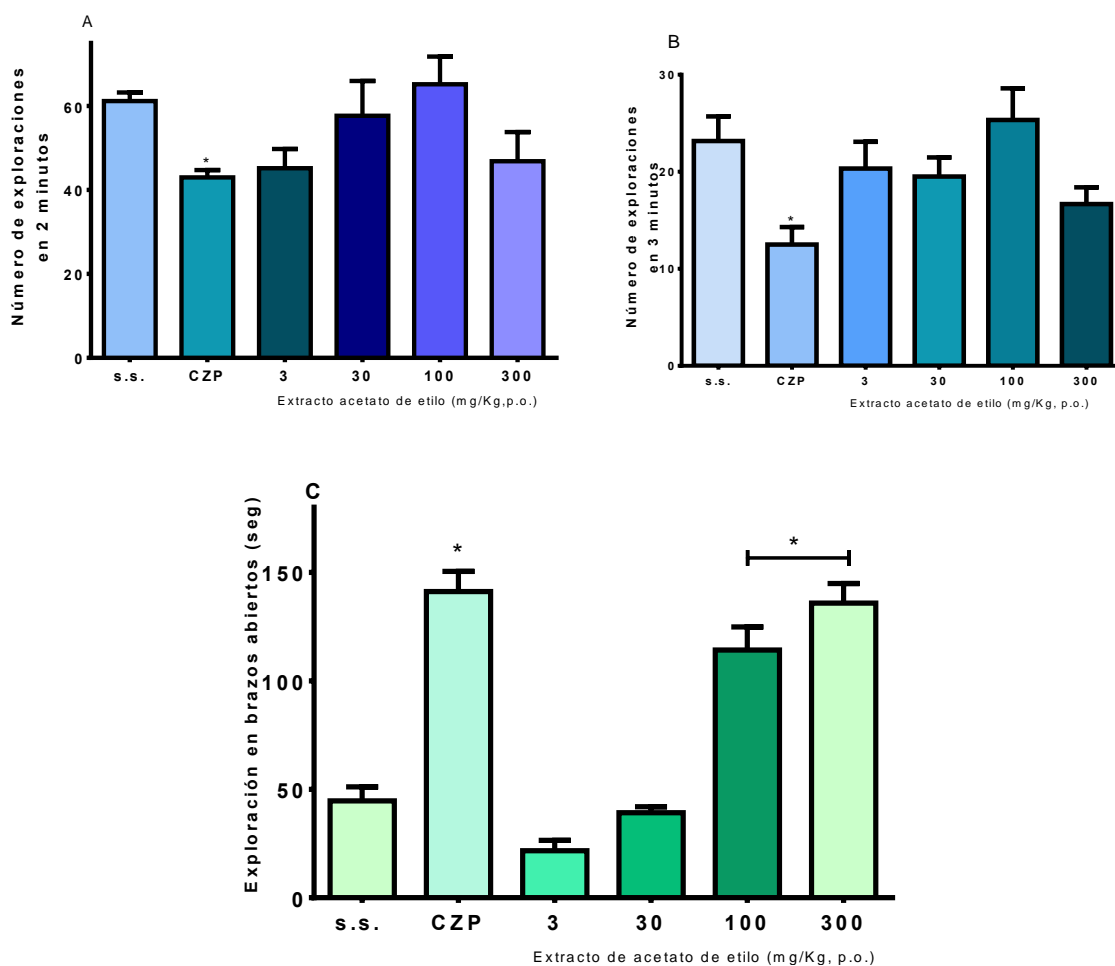


Figura 17. Evaluación del efecto ansiolítico del extracto de acetato de etilo de *S.semiatrata*. Modelo de campo abierto (A), tablero con orificios (B) y cruz elevada (C). Solución salina (s.s.), clonazepam (CZP). Las barras representan el promedio  $\pm$  E.E.M. de seis animales. \*  $p < 0.05$ , ANADEVa seguida de la prueba de Dunnett.

#### 7.6.4. Potenciación de la hipnosis inducida con PS del extracto de acetato de etilo de etilo

El extracto de acetato de etilo no mostró diferencias significativas con respecto al control en la latencia a la sedación, a la hipnosis y duración de la hipnosis en ninguna de las dosis evaluadas (Figura 18).

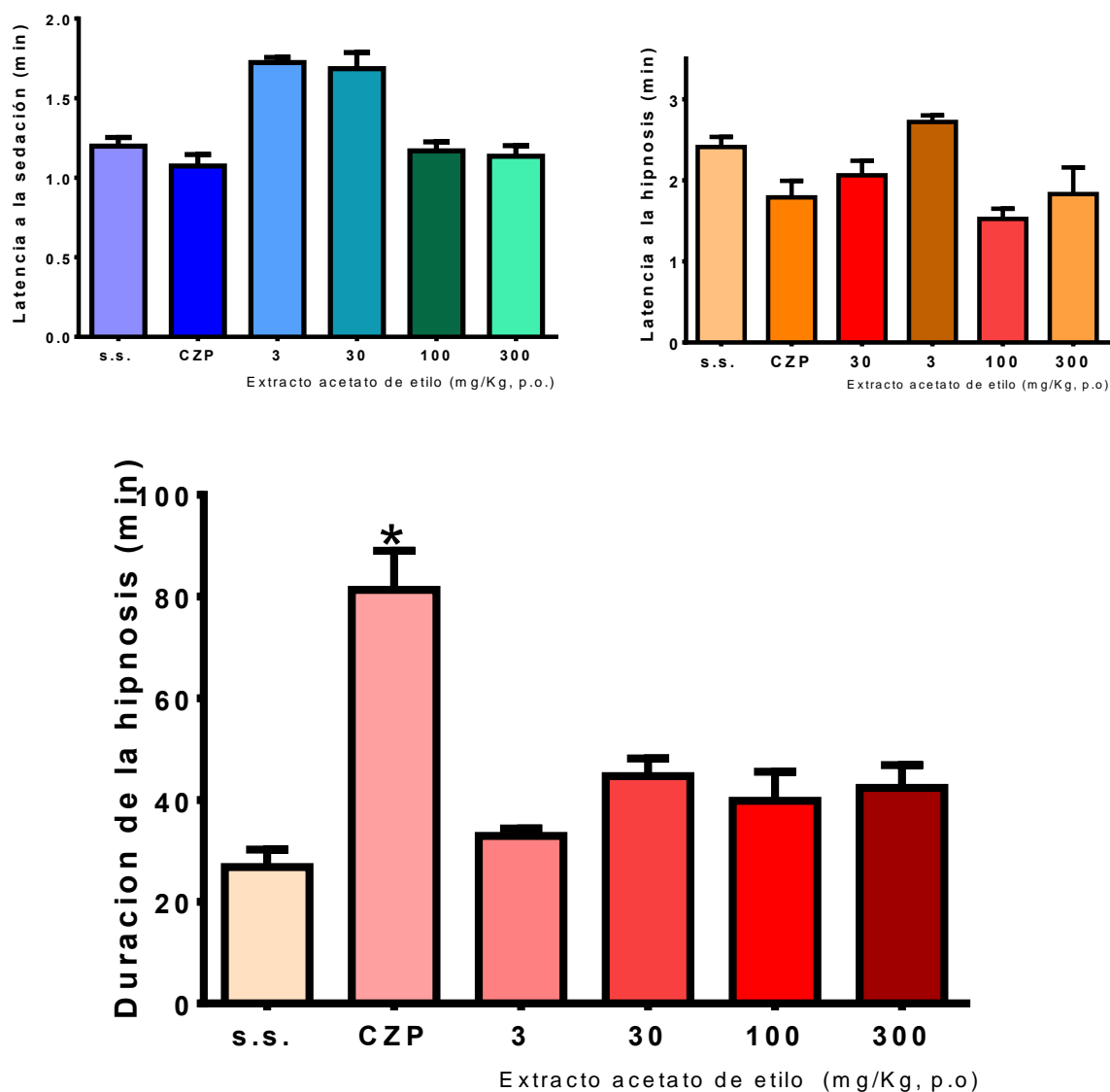
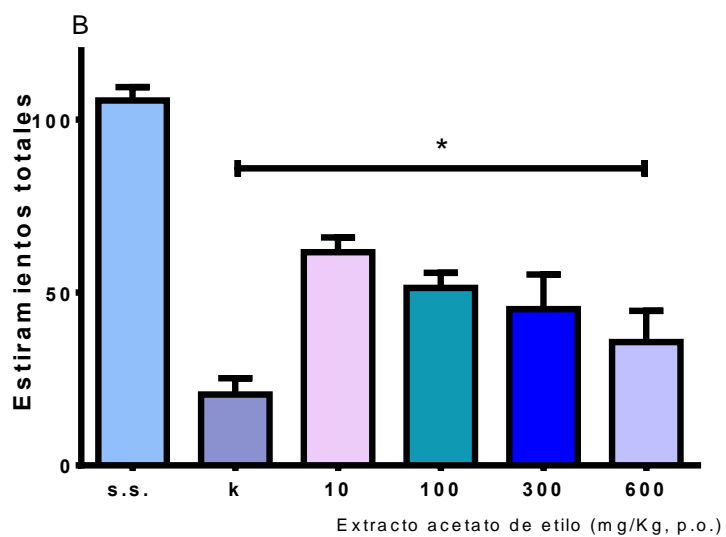
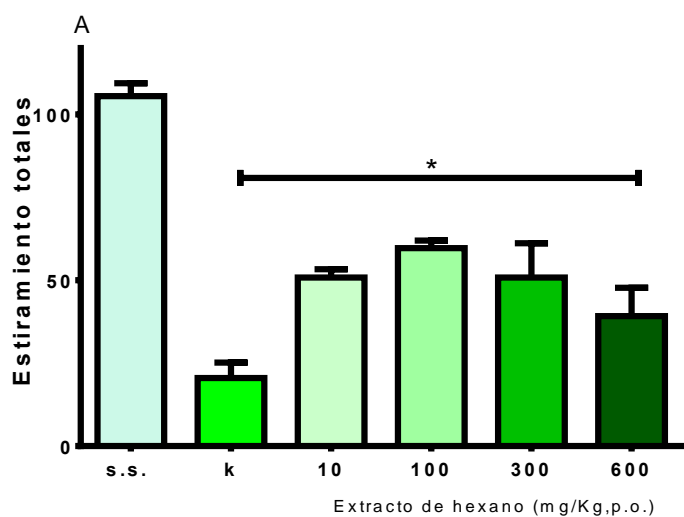


Figura 18. Evaluación de la potenciación de la hipnosis inducida con PS del extracto de acetato de etilo de *S. semiatrata*. Solución salina (s.s.), clonazepam (CZP). Las barras representan el promedio  $\pm$  E.E.M. de seis animales. \*  $p < 0.05$ , ANADEVa seguida de la prueba de Dunnett.

### 7.6.5. Evaluación del efecto antinociceptivo de los extractos de hexano, acetato de etilo y acetona/metanol.

Los tres extractos redujeron significativamente con respecto al control el número de estiramientos de manera independiente de la dosis (Figura 19 A, B y C).



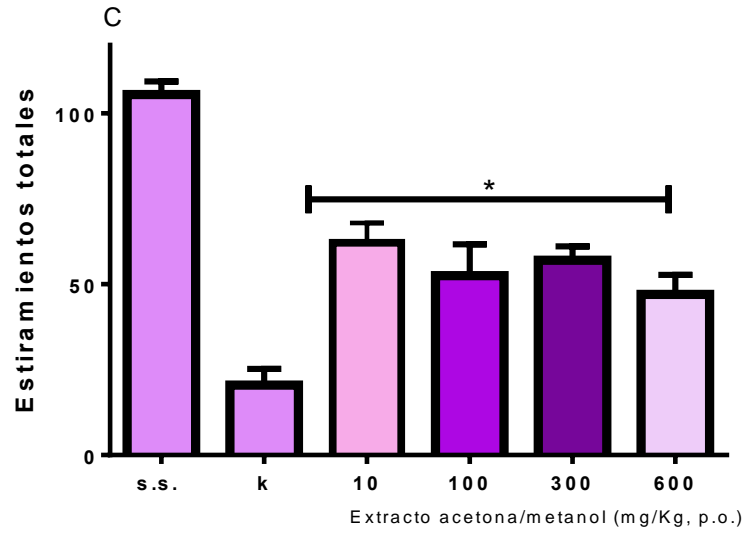


Figura 19. Curvas dosis-respuesta del efecto antinociceptivo de *S. semiatrata*. (A) Extracto de hexano, (B) extracto de acetato de etilo y (C) extracto de acetona/MeOH. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar de seis animales. Los asteriscos indican diferencias significativas  $*P < 0.05$  con respecto al vehículo, ANADEVa seguida de la prueba de Dunnett.

## 7.7. Identificación de los compuestos presentes en los extractos orgánicos mediante CCF.

En la literatura se han reportado estudios fitoquímicos demostrando que las salvias sintetizan terpenos como ácido ursólico, estigmasterol,  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, ácido oleanólico,  $\beta$ -sitosterol, flavonoides libres como la apigenina, canferol, luteolina, quercetina y flavonoides glucosilados como la rutina y naringina (Imanshahidi & Hosseinzadeh, 2006), por lo cual, se realizó una CCF de los extractos orgánicos de *S. semiatrata* para identificar de manera preliminar estos metabolitos.

El análisis cromatográfico de los extractos permitió identificar la presencia de cuatro terpenos: ácido ursólico, ácido oleanólico,  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -sitosterol (Figura 20A), dos flavonoides libres: apigenina y quercetina (Figura 20B) y un flavonoide glucosilado: rutina (Figura 20C). En el extracto de hexano se identificaron  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -sitosterol, en el extracto de acetato de etilo ácido ursólico, ácido oleanólico,  $\beta$ -sitosterol, apigenina y quercetina, en el extracto de acetona/metanol ácido ursólico, ácido oleanólico, apigenina, quercetina y rutina y en el extracto de metanol apigenina y quercetina.

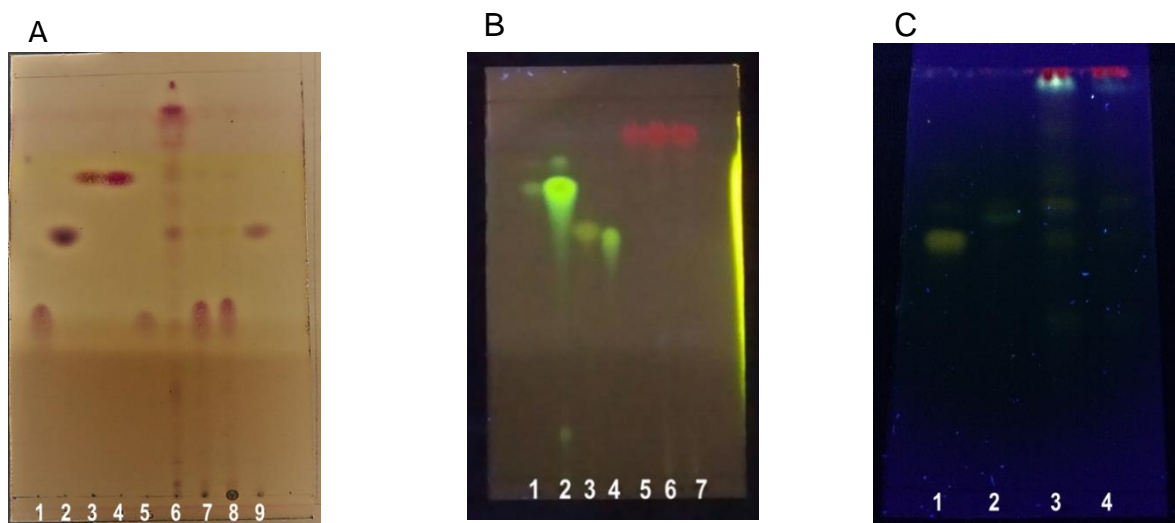


Figura 20. Identificación de terpenoides y flavonoides en los extractos de *S. semiatrata*. (A) Terpenos, ácido ursólico (1), estigmasterol (2),  $\alpha$ -amirina (3),  $\beta$ -amirina (4), ácido oleanólico (5),  $\beta$ -sitosterol (9), extracto de hexano (6), extracto acetato de etilo (7), extracto acetona/metanol (8). (B) Flavonoides libres, apigenina (1), canferol (2), luteolina (3), quercetina (4), extracto acetato de etilo (5), extracto acetona/metanol (6), extracto metanol (7). (C) Flavonoides glucosilados, rutina (1), naringina (2), extracto acetona/metanol (3), extracto metanol (4).

## 7.8. Análisis por CLAR de los extractos orgánicos y acuoso de *S. semiatrata*

### Análisis de terpenos

El análisis mostró la presencia de seis terpenos en los extractos de baja y mediana polaridad, en donde los mayoritarios son el ácido oleanólico y la  $\alpha$ -amirina. En el extracto de hexano el compuesto mayoritario es el ácido oleanólico (59.72  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), mientras que la  $\alpha$ -amirina es el componente más abundante en los extractos orgánicos de mayor polaridad.

### Análisis de ácidos fenólicos

En los extractos se identificaron ocho ácidos fenólicos, el más abundante de ellos es el ácido felúrico y el ácido gálico. En el extracto acuoso el ácido gálico se encuentra a una concentración de 0.68  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , siendo este el mayoritario. En los extractos de menor polaridad el ácido felúrico es el componente en mayor proporción.

### Análisis de flavonoides

En los resultados se visualizó la presencia de siete flavonoides. En donde la quercetina al ser el metabolito más abundante se encuentra a una concentración de 45.01 y 34.05  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , en los extractos de acetona/metanol y metanol, respectivamente.

Cuadro 9. Identificación y cuantificación de metabolitos secundarios mediante CLAR. El número representa la concentración en  $\mu\text{g}$  de compuesto/mg de extracto.

N.I.: no identificado

|                  | Compuesto           | Extracto hexano | Extracto acetato de etilo | Extracto acetona/metanol | Extracto metanol | Extracto acuoso |
|------------------|---------------------|-----------------|---------------------------|--------------------------|------------------|-----------------|
| Terpenos         | Estigmasterol       | 14.12           | 6                         | 0.64                     | 1.84             | N.I.            |
|                  | Á. oleanólico       | <b>59.72</b>    | 7.15                      | N.I.                     | 2.06             | N.I.            |
|                  | Carnosol            | N.I.            | 0.35                      | N.I.                     | N.I.             | N.I.            |
|                  | Á. ursólico         | 39.23           | 6.09                      | 1.49                     | 3.53             | N.I.            |
|                  | $\alpha$ -amirina   | 54.28           | <b>60.91</b>              | <b>42.11</b>             | <b>29.09</b>     | N.I.            |
|                  | $\beta$ -sitosterol | 3.05            | 0.5                       | 10.1                     | 7.2              | N.I.            |
| Ácidos fenólicos | Á. gálico           | N.I.            | 0.02                      | 0.58                     | 0.62             | <b>0.68</b>     |
|                  | Á. clorogénico      | N.I.            | 0.31                      | 0.55                     | 0.62             | 0.45            |
|                  | Á. siringico        | N.I.            | N.I.                      | 0.16                     | 0.23             | 0.18            |
|                  | Á. vainillínico     | N.I.            | 0.26                      | 0.07                     | 0.06             | 0.1             |
|                  | Á. p-hidrobenzoico  | N.I.            | N.I.                      | 0.1                      | 0.06             | 0.1             |
|                  | Á. cafeico          | N.I.            | 0.005                     | 0.02                     | 0.06             | 0.02            |
|                  | Á. felúrico         | N.I.            | <b>0.56</b>               | <b>1</b>                 | <b>1.36</b>      | 0.46            |
| Á. p-cumárico    | N.I.                | N.I.            | N.I.                      | N.I.                     | 0.22             |                 |
| Flavonoides      | Rutina              | N.I.            | N.I.                      | 3.01                     | 1                | N.I.            |
|                  | Florizidina         | N.I.            | N.I.                      | N.I.                     | 9.38             | 0.49            |
|                  | Mirecetina          | N.I.            | N.I.                      | 0.65                     | N.I.             | N.I.            |
|                  | Quercetina          | N.I.            | N.I.                      | <b>45.01</b>             | <b>34.05</b>     | 13.36           |
|                  | Naringenina         | N.I.            | N.I.                      | 6.64                     | 6.76             | <b>19.27</b>    |
|                  | Floretina           | N.I.            | 2.11                      | N.I.                     | N.I.             | N.I.            |
|                  | Galangina           | N.I.            | <b>2.89</b>               | 0.99                     | 1.06             | 0.33            |

## 7.9. Separación y análisis de los componentes de los extractos activos

### 7.9.1. Análisis del extracto de hexano de *S. semiatrata*

Del fraccionamiento del extracto de hexano (6.8 g) por cromatografía en columna se colectaron 53 fracciones de 100 mL cada una y por su similitud en CCF, éstas fueron reunidas en 21 fracciones (Cuadro 10). De las fracciones 15-24 se aisló una mezcla (precipitado blanco, 28.8 mg) que de acuerdo con el análisis de CG-EM se identificaron ocho compuestos: campesterol,  $\beta$ -estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, fucostanol, fucosterol, sitostenona, estigmaste-3,5-dieno y ácido acetilursólico. El componente en mayor proporción es el  $\beta$ -sitosterol (72.78%) (Cuadro 11).

Cuadro 10. Fracciones colectadas de la separación del extracto de hexano de *S. semiatrata*

| # de fracción | Fracción | Peso(g) | Sistema de elución |
|---------------|----------|---------|--------------------|
| <b>1</b>      | 1        | 0.2855  |                    |
| <b>2</b>      | 2        | 0.8338  |                    |
| <b>3</b>      | 3-4      | 0.1435  | hexano             |
| <b>4</b>      | 5-6      | 0.0462  |                    |
| <b>5</b>      | 7-8      | 0.0040  |                    |
| <b>6</b>      | 9-12     | 0.0288  | hexano/acetato de  |
| <b>7</b>      | 13-16    | 0.0092  | etilo 9:1          |
| <b>8</b>      | 17-18    | 0.1045  |                    |
| <b>9</b>      | 19-22    | 0.0745  | hexano/acetato de  |
| <b>10</b>     | 23-30    | 1.2341  | etilo 8:2          |
| <b>11</b>     | 31       | 0.2484  | hexano/acetato de  |
| <b>12</b>     | 32-33    | 1.7049  | etilo 7:3          |
| <b>13</b>     | 34-35    | 0.1765  |                    |
| <b>14</b>     | 36-37    | 0.0729  | hexano/acetato de  |
| <b>15</b>     | 38       | 0.1140  | etilo 6:4          |
| <b>16</b>     | 39       | 0.4060  |                    |
| <b>17</b>     | 40-42    | 0.0050  |                    |



|           |       |        |                             |
|-----------|-------|--------|-----------------------------|
| <b>18</b> | 43-44 | 0.0890 | hexano/acetato de etilo 1:1 |
| <b>19</b> | 45-47 | 0.1091 | hexano/acetato de etilo 3:7 |
| <b>20</b> | 48-50 | 0.1812 | metanol                     |
| <b>21</b> | 51-53 | 0.3974 |                             |

Cuadro 11. Análisis por CG-EM de las fracciones 10-24 obtenida del extracto de hexano de *S. semiatrata*

| <b>Tiempo de retención</b> | <b>Compuesto</b>       | <b>Abundancia relativa%</b> |
|----------------------------|------------------------|-----------------------------|
| 34.71                      | Campesterol            | 1.38                        |
| 35.29                      | $\beta$ -estigmasterol | 0.74                        |
| 36.75                      | $\beta$ -sitosterol    | 72.78                       |
| 36.84                      | Fucostanol             | 8.16                        |
| 36.98                      | Fucoesterol            | 12.57                       |
| 39.41                      | Sitostenona            | 2.32                        |
| 42.46                      | Estigmaste-3,5-dieno   | 0.75                        |
| 42.94                      | Ácido acetilursólico   | 1.30                        |

### 7.9.2. Análisis del extracto de acetato de etilo

Al disolver el extracto de acetato de etilo crudo para hacer la columna cromatográfica se obtuvo un sólido blanco (17.9833 g), éste se filtró y secó para su análisis por CG-EM. En este precipitado se identificaron 12 compuestos, siendo el mayoritario el tritriacontano (33.56%) (Cuadro 12).

Cuadro 12. Componentes del precipitado del extracto de acetato de etilo de *S. semiatrata* determinadas mediante CG-EM

| Tiempo de retención | Compuesto                 | Abundancia relativa % |
|---------------------|---------------------------|-----------------------|
| 17.70               | Hexadecanal               | 10.78                 |
| 18.79               | Ácido palmítico           | 15.20                 |
| 20.41               | Ácido linoleico           | 2.25                  |
| 20.48               | Ácido $\alpha$ -linoleico | 7.01                  |
| 22.48               | Ácido araquídico          | 3.40                  |
| 24.69               | Ácido behénico            | 3.85                  |
| 30.17               | Nonacosano                | 4.56                  |
| 32.59               | Hentriacontano            | 11.22                 |
| 35.90               | Tritriacontano            | 33.56                 |
| 36.36               | $\beta$ -sitosterol       | 4.91                  |
| 41.51               | Ácido oleanólico          | 1.20                  |
| 42.33               | Ácido ursólico            | 1.98                  |

La parte soluble del extracto de acetato de etilo (40.0 g) se separó mediante columna cromatográfica, obteniendo 214 fracciones de 100 mL cada una y de acuerdo con su similitud por CCF fueron reunidas en 42 fracciones (Cuadro 13). De la reunión de las fracciones 15-24 se obtuvo un aceite rojo (1.4790 mg) el cual fue analizado por CG-EM, identificándose 27 compuestos, de los cuales, los mayoritarios fueron espatulenol (14.63%), fitol (12.41%) y óxido de cariofileno (11.39%) (Cuadro 14).

Cuadro 13. Fracciones colectadas de la separación del extracto de acetato de etilo de *S. semiatrata*

| # de fracción | Fracción | Peso (g) | Sistema de elución          |
|---------------|----------|----------|-----------------------------|
| <b>1</b>      | 1-3      | 0.1070   | hexano                      |
| <b>2</b>      | 4        | 0.0131   |                             |
| <b>3</b>      | 5        | 0.0060   |                             |
| <b>4</b>      | 6        | 0.0046   |                             |
| <b>5</b>      | 7        | 0.0022   |                             |
| <b>6</b>      | 8        | 0.0022   | hexano/acetato de etilo 9:1 |
| <b>7</b>      | 9        | 0.0019   |                             |
| <b>8</b>      | 10-11    | 0.0024   |                             |
| <b>9</b>      | 12-14    | 0.0030   |                             |

|           |         |         |                             |
|-----------|---------|---------|-----------------------------|
| <b>10</b> | 15-24   | 1.4790  |                             |
| <b>11</b> | 25      | 0.0542  |                             |
| <b>12</b> | 26-29   | 0.4529  | hexano/acetato de etilo 8:2 |
| <b>13</b> | 30-32   | 2.1963  |                             |
| <b>14</b> | 33-43   | 1.1798  |                             |
| <b>15</b> | 49-522  | 0.9509  |                             |
| <b>16</b> | 53-61   | 0.5445  |                             |
| <b>17</b> | 62-70   | 0.4926  | hexano/acetato de etilo 7:3 |
| <b>18</b> | 71-97   | 2.3859  |                             |
| <b>19</b> | 98-106  | 0.4886  | hexano/acetato de etilo 6:4 |
| <b>20</b> | 107-115 | 0.6740  | hexano/acetato de etilo 1:1 |
| <b>21</b> | 116-119 | 0.5323  | hexano/acetato de etilo 4:6 |
| <b>22</b> | 120-124 | 0.1820  |                             |
| <b>23</b> | 125-128 | 0.1024  | hexano/acetato de etilo 3:7 |
| <b>24</b> | 129-131 | 0.2304  |                             |
| <b>25</b> | 132-134 | 0.2764  | hexano/acetato de etilo 2:8 |
| <b>26</b> | 135-140 | 0.9013  |                             |
| <b>27</b> | 141-144 | 1.8904  |                             |
| <b>28</b> | 145-146 | 10.4831 |                             |
| <b>29</b> | 147-160 | 8.7266  |                             |
| <b>30</b> | 161-162 | 1.625   |                             |
| <b>31</b> | 163-164 | 0.1952  | hexano/acetato de etilo 1:9 |
| <b>32</b> | 165-167 | 0.2982  |                             |
| <b>33</b> | 168-169 | 0.2337  |                             |
| <b>34</b> | 170-171 | 0.1422  |                             |
| <b>35</b> | 172-176 | 0.1922  |                             |
| <b>36</b> | 177-181 | 0.4109  |                             |
| <b>37</b> | 182-185 | 0.1201  | hexano/acetato de etilo     |
| <b>38</b> | 186-190 | 0.6764  | 0.5:9.5                     |
| <b>39</b> | 191-193 | 0.2631  |                             |

|           |         |         |                              |
|-----------|---------|---------|------------------------------|
| <b>40</b> | 194-201 | 0.0488  | acetato de etilo/metanol 7:3 |
| <b>41</b> | 202-208 | 0.7424  |                              |
| <b>42</b> | 209-214 | 17.9833 | metanol                      |

Cuadro 14. Componentes del extracto de acetato de etilo de *S. semiatrata* determinadas mediante CG-EM

| <b>Tiempo de retención</b> | <b>Compuesto</b>               | <b>Abundancia relativa %</b> |
|----------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| <b>9.21</b>                | Pinocarveol                    | 0.07                         |
| <b>9.28</b>                | Alcanfor                       | 0.08                         |
| <b>11.32</b>               | Acetato de bornilo             | 0.09                         |
| <b>11.50</b>               | Acetato de terpineno           | 0.07                         |
| <b>14.87</b>               | Oxido de cariofileno           | 11.39                        |
| <b>15.23</b>               | Espatuleno                     | 14.63                        |
| <b>15.57</b>               | Epoxido de humuleno II         | 3.41                         |
| <b>16.25</b>               | Epoxido de isoaromadendreno    | 2.04                         |
| <b>17.59</b>               | $\alpha$ -cadineno             | 0.85                         |
| <b>18.78</b>               | Ácido palmítico                | 6.47                         |
| <b>19.20</b>               | Ftalato de dibutilo            | 3.92                         |
| <b>19.44</b>               | Etil estér de ácido palmítico  | 5.43                         |
| <b>20.42</b>               | Ácido linoleico                | 1.38                         |
| <b>20.49</b>               | Ácido linolénico               | 3.73                         |
| <b>20.59</b>               | Fitol                          | 12.41                        |
| <b>21.02</b>               | Etil ester de ácido linoleico  | 1.39                         |
| <b>21.09</b>               | Etil ester de ácido linolénico | 4.89                         |
| <b>22.47</b>               | Ácido araquídico               | 0.44                         |
| <b>22.68</b>               | Totarol                        | 0.54                         |
| <b>29.37</b>               | Escualeno                      | 3.35                         |
| <b>32.07</b>               | $\delta$ -tocoferol            | 0.63                         |
| <b>33.23</b>               | $\alpha$ -tocoferol            | 5.37                         |
| <b>36.38</b>               | $\beta$ -sitosterol            | 0.82                         |
| <b>36.74</b>               | Cipereno                       | 2.69                         |
| <b>37.05</b>               | $\beta$ -amirina               | 2.03                         |
| <b>38.03</b>               | Lupeol                         | 3.88                         |
| <b>39.41</b>               | Estigmaste-3,5-dieno           | 6.91                         |

### 7.9.3. Aislamiento y caracterización del 7-ceto-neoclerodan-3,13-dien-18,19:15,16-diólida

La reunión de las fracciones 30-32 (1.55), permitió obtener por cristalización con hexano-metanol un sólido blanco (1.06 g) el cual fue recristalizado con acetona hasta obtener cristales de color blanco. A este compuesto se le determinó su p.f. (205-206° c) y fue analizado por cristalografía. Con los datos obtenidos por difracción de rayos X se determinó la estructura de este compuesto como 7-ceto-neoclerodan-3,13-dien-18,19:15,16-diólida.

La Figura 21 muestra una perspectiva de la estructura molecular del neo-clerodano. El compuesto cristaliza en un sistema monoclinico con el grupo especial P21. Los anillos de ciclohexano y ciclohexanona se transfunden y adoptan conformaciones de bote y silla giratoria respectivamente. La  $\gamma$ -lactona tiene una conformación de envoltura y el anillo 13 es prácticamente plano. La estereoquímica absoluta en C5, C8, C9 y C10 se determinó como S, S, R, y R. El sustituyente metilo C17 es axial y el grupo metilo C20 ocupa la posición ecuatorial más favorecida estéricamente.

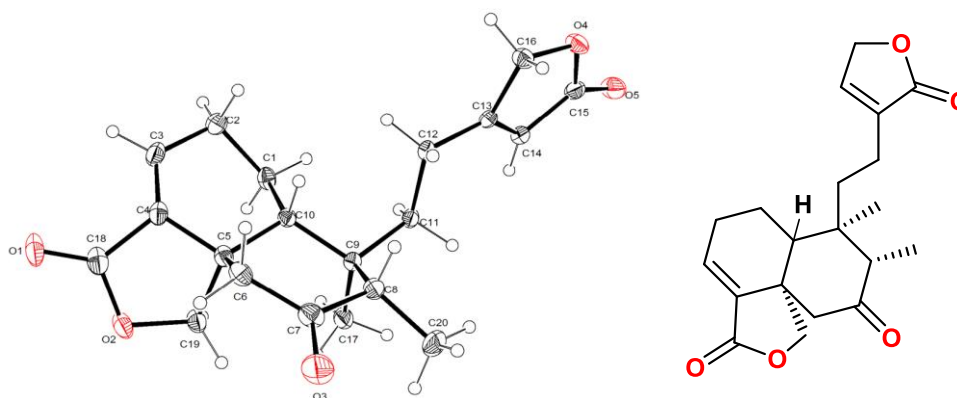


Figura 21. Estructura molecular de 7-ceto-neoclerodan-3,13-dien-18,19:15,16-diólida

## 7.10. Efecto ansiolítico y potenciación de la hipnosis inducida con pentobarbital sódico del 7-ceto-neoclerodan-3,13-dien-18,19:15,16-diólida

### 7.10.1. Efecto ansiolítico

El terpeno neo-clerodano en las dosis evaluadas mostró una disminución significativa en la exploración en el modelo de campo abierto (Figura 23 A), no así en el tablero con orificios (Figura 23 B). Por otra parte, dicho compuesto presenta un efecto ansiolítico significativo en el modelo de cruz elevada al incrementar la exploración de los brazos abiertos en las dosis evaluadas (Figura 23C).

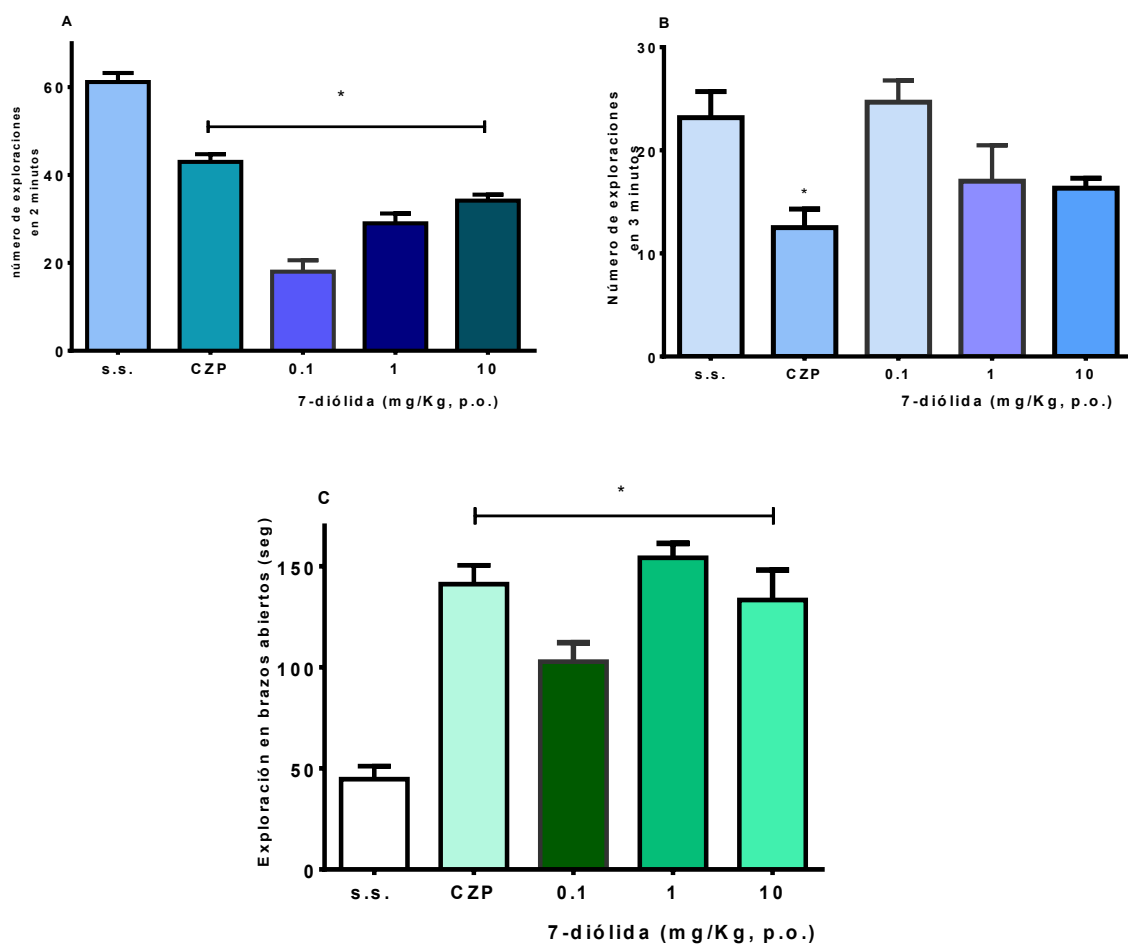


Figura 22. Evaluación del efecto ansiolítico del 7-ceto-neoclerodan-3,13-dien-18,19:15,16-diólida. Modelo de campo abierto (A), tablero con orificios (B) y cruz elevada (C). Solución salina (s.s.), clonazepam (CZP). Las barras representan el promedio  $\pm$  E.E.M. de seis animales. \*  $p < 0.05$ , ANADEVa seguida de la prueba de Dunnett.

### 7.10.2. Potenciación de la hipnosis inducida con PS

Se observó un efecto significativo del diterpeno neo-clerodano en la duración de la hipnosis a las dosis de 0.1 y 10 mg/kg.

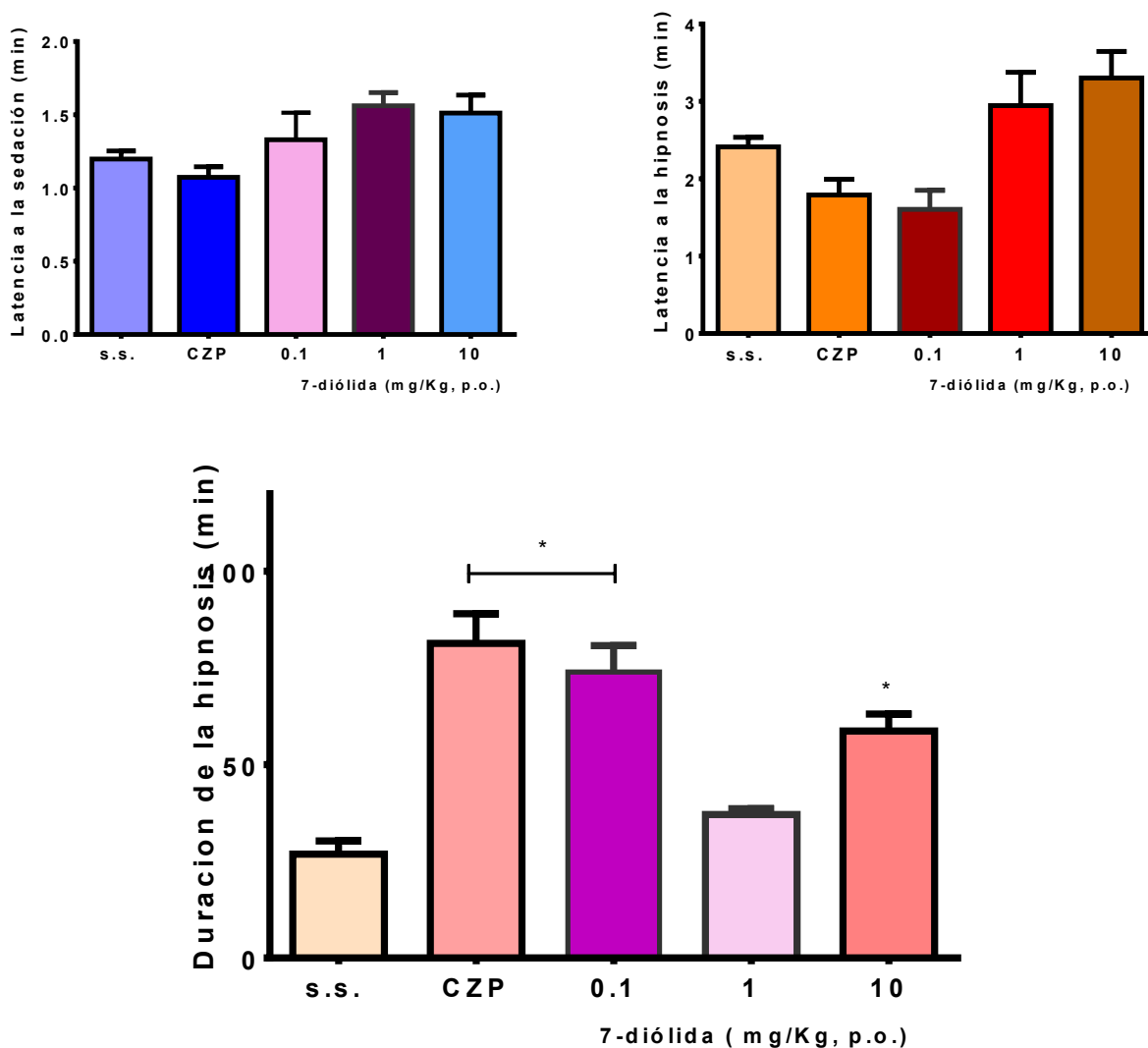


Figura 23. Evaluación de la potenciación de la hipnosis inducida con PS del 7-ceto-neoclerodan-3,13-dien-18,19:15,16-diólida. Solución salina (s.s.), clonazepam (CZP). Las barras representan el promedio  $\pm$  E.E.M. de seis animales. \*  $p < 0.05$ , ANADEVa seguida de la prueba de Dunnett.

### 7.11. Evaluación del efecto antinociceptivo del 7-ceto-neoclerodan-3,13-dien-18,19:15,16-diólida

El compuesto evaluado a las dosis de 0.1, 1 y 10 mg/kg mostró una disminución significativa con respecto al control en la conducta nociceptiva, observándose una mayor reducción a la dosis de 10 mg/kg similar al fármaco de referencia (Figura 25).

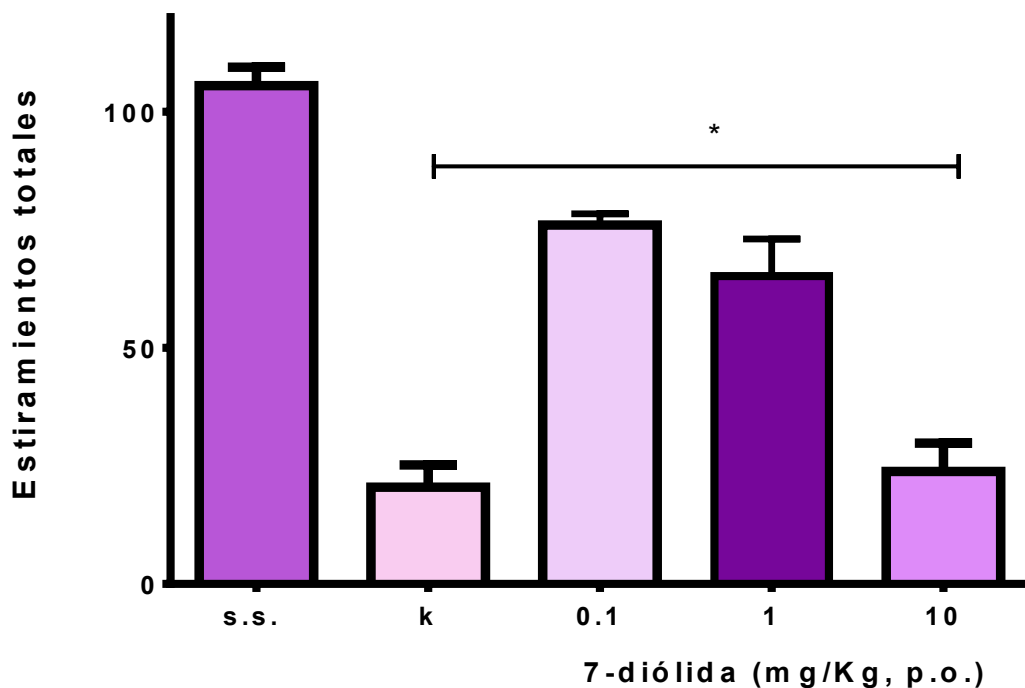


Figura 24. Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo del 7-ceto-neoclerodan-3,13-dien-18,19:15,16-diólida. Solución salina (s.s.), Ketorolaco (k). Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar de seis animales. Los asteriscos indican diferencias significativas  $*P < 0.05$  con respecto al vehículo, ANADEVa seguida de la prueba de Dunnett.



## 8. DISCUSIÓN

La administración oral de los extractos orgánicos y acuoso a la dosis de 2000 mg/kg no provocó en ninguno de los sujetos experimentales daños macroscópicos en los principales órganos irrigados (riñón, bazo, hígado, estómago), signos de toxicidad o mortalidad, además de que no se mostraron diferencias significativas en la ganancia de peso en comparación con el control. De acuerdo con la OCDE, los extractos evaluados en este estudio se clasifican en categoría 5 o toxicidad mínima.

Otros trabajos de tesis han evaluado la toxicidad oral de los extractos de *S. circinata* (Moreno-Pérez, 2019) y *S. purpurea* (Cuevas-Morales, 2018), reportando su clasificación en categoría cinco. Es importante destacar que las tres salvias pertenecen al subgénero *Calosphace*; sin embargo, *S. purpurea* pertenece a la sección *Purpureae* a diferencia de *S. semiatrata* y *S. circinata* que pertenecen a la sección *Scorodonia* y *Uricae*, respectivamente.

La evaluación del efecto ansiolítico de todos los extractos produjo una mayor exploración en brazos abiertos en el modelo de cruz elevada, pero solamente los extractos de hexano y acetato de etilo produjeron respuesta significativa equivalente a la del fármaco de referencia, clonazepam (0.5 mg/kg, p.o.). Ninguno de los extractos produjo un incremento en la potenciación de la hipnosis con pentobarbital sódico.

Estudios han confirmado el efecto ansiolítico de los extractos de baja, mediana y alta polaridad de diferentes especies del género *Salvia*. Por ejemplo, los extractos de baja polaridad de *S. miltiorrhiza* administrados en ratas macho adultos Sprague Dawley y evaluados en el modelo de cruz elevada a las dosis de 100 y 200 mg/kg, p.o. presentan

efecto ansiolítico (Liu et al., 2015). Por otra parte, los extractos de hexano, acetato de etilo y metanol de *S. divinorum* (10, 30 y 100 mg/kg, i.p) administrados en ratones albinos Swiss y evaluados en los modelos de campo abierto, tablero con orificios y potenciación de la hipnosis con pentobarbital sódico demuestran el efecto sedante de todos los extractos a las dosis administradas, pero un mayor efecto con la administración del extracto de acetato de etilo.

Respecto a la evaluación del efecto antinociceptivo en el modelo de estiramiento abdominal, todos los extractos crudos disminuyeron la conducta nociceptiva en comparación con los ratones que recibieron el vehículo. Sin embargo, solo los extractos de hexano, acetato de etilo, y acetona/metanol tuvieron una diferencia significativa. Otros estudios han demostrado que los extractos de mediana y alta polaridad de *S. aegyptiaca* presentan un efecto antinociceptivo a las dosis de 250, 500, 1000 y 2000 mg/Kg, administrados p.o. en ratones macho en el modelo de estiramiento abdominal “Writhing” (Al-Yousuf et al, 2002), siendo el extracto de mediana polaridad el que presentó mejor efecto. De igual manera *S. divinorum* produce efectos de tipo antinociceptivo en diferentes modelos experimentales debido a la presencia de la Salvinorina A (Tlacomulco et al., 2019).

En el caso del efecto ansiolítico del extracto de hexano no se observó un efecto dependiente de la dosis en el modelo de cruz elevada; sin embargo, a las dosis de 3 y 30 mg/kg se observa un efecto sedante en el modelo de campo abierto, así como un incremento en la duración de la hipnosis. En el caso del extracto de acetato de etilo se observa un comportamiento dependiente de la dosis, donde el efecto ansiolítico se pierde

a la dosis de 30 mg/Kg. En el caso del efecto antinociceptivo se presenta un efecto techo en un rango de dosis de 10 mg/kg - 600 mg/kg.

Los resultados de CLAR revelan que los metabolitos de tipo terpeno comparado con los ácidos fenólicos y los flavonoides, se encuentran en una mayor concentración. Un ejemplo es la  $\beta$ -amirina que comparado con el ácido felúrico se encuentra 100 veces más concentrado en el extracto de acetato de etilo. Otros metabolitos que se encuentran en concentración mayor son el ácido oleanólico, el ácido ursólico y el  $\beta$ -sitosterol. Estos metabolitos cuentan con estudios que respaldan sus propiedades como analgésicos y ansiolíticos. La  $\beta$ -amirina cuenta con propiedades analgésicas y ansiolíticas (Jiménez-Ferrer et al., 2017; Nogueira et al., 2018;), estudios reportan que el posible mecanismo de acción es GABAérgico, pues sus efectos se revierten en presencia de flumazenil, antagonista de benzodiazepinas (Aragão et al., 2006). Por otra parte, se ha demostrado el efecto ansiolítico del  $\beta$ -sitosterol y sus posibles implicaciones en la activación de los sistemas GABAérgicos (Aguire-Hernández et al., 2007).

Asimismo, se ha propuesto que el ácido ursólico inhibe la expresión de la COX-2 (Lu et al., 2010), además de inhibir el efecto de los receptores 5-HT (Verano et al., 2013), generando un efecto antinociceptivo y posiblemente un efecto ansiolítico, debido a que un neurotransmisor implicado en la modulación tanto de los trastornos de ansiedad y dolor es la serotonina, cuyo receptor es el 5-HT (SED, 2016).

El extracto que produce mejores resultados en las evaluaciones farmacológicas es el de acetato de etilo. El fraccionamiento de este extracto permitió la identificación de ácidos grasos y di-, tri- sesquiterpenoides, principalmente. Tales como el ácido palmítico, fitol, espatulenol, óxido de cariofileno y  $\beta$ -sitosterol, a los cuales se les atribuyen propiedades

como ansiolíticos y analgésicos (Aguirre-Hernández et al., 2007; Chavan et al., 2010; Pereira et al., 2014; Fidy et al., 2016). Asimismo, de este extracto, se obtuvo un compuesto en forma de cristal, caracterizado con base en análisis cristalográfico como un diterpeno tipo neo-clerodano, el 7-ceto-neoclerodan-3,13-dien-18,19:15,16-diólida. El neo-clerodano fue aislado en cantidad abundante del extracto de acetato de etilo. Los neo-clerodanos pertenecen a la familia de los terpenos y tienen como característica que son metabolitos secundarios no nitrogenados con una alta afinidad y eficacia por los receptores opioides (Nagase, 2011).

El efecto ansiolítico del neo-clerodano se presentó incluso a la dosis evaluada más baja (0.1 mg/Kg), con un comportamiento no dependiente de la dosis. Esta conducta se observa en un estudio realizado con la salvinorina A, obtenida de *S. divinorum*. Este compuesto administrado en ratas macho adultas Sprague-Dawley a dosis de 0.1-160 µg/kg vía subcutánea y evaluadas en el modelo de campo abierto y cruz elevada demostraron que no tienen efecto en la actividad locomotora respecto al control, pero si una mayor exploración en brazos abiertos, conducta que indica el efecto ansiolítico. La actividad se evalúa a las dosis de 0.05, 0.1, 10, 40, 80 y 160 µg/kg y no se observa un comportamiento dependiente de la dosis (Braidá et al., 2009). Dicho neoclerodano, en la prueba de estiramiento abdominal mostró una reducción de la nocicepción. Este comportamiento se observa en la tilifodiólida aislada y caracterizada a partir de *S. tilifolia*. La tilifodiólida administrada en ratones Balb/c a dosis de 1-100 mg/kg p.o. demostraron un efecto antinociceptivo dependiente de la dosis en el modelo de estiramiento abdominal (González-Chávez, 2018).

La investigación actual sobre neo-clerodanos está dirigida a sus propiedades como anti alimentarios, neurotróficos y citotóxicos sobre líneas celulares de tumores humanos como LoVo, MCF-7, SMMC-7721, y HCT-116 (cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de hepatoma y cáncer de colon, respectivamente) (Bozov & Georgieva, 2017; Lai-Wei et al., 2018; Wang, 2018).

## **9. CONCLUSIONES**

El presente estudio muestra evidencia por primera vez de los efectos sobre el sistema nervioso central de los extractos de *S. semiatrata* y de un diterpeno neo-clerodano como metabolito activo dilucidado como 7-ceto-neoclerodan-3,13-dien-18,19:15,16-diólida. Estos resultados refuerzan el uso tradicional en Santiago Huaucuililla, Oaxaca de esta especie como tranquilizante y para el alivio del dolor.

## 10. REFERENCIAS

Aguilar, A., Camacho, J.R., Chino, S., Jáckez, P., López, M.E. 1994. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica. Instituto Mexicano del Seguro Social. México. 600 pp.

Aguirre-Hernández, E., González-Trujano, M.E., Terrazas, T., Herrera, S. J., Guevara-Fefer, P.G. 2016. Anxiolytic and sedative-like effects of flavonoids from *Tilia americana* var. Mexicana: GABAergic and serotonergic participation. *Salud mental*: 39: 37-46.

Aguirre-Hernández, E., Rosas-Acevedo, H., Soto-Hernández, M., Martínez, A., Moreno, J., González-Trujano, M. 2007. Bioactivity-guided isolation of beta-sitosterol and some fatty acids as active compounds in the anxiolytic and sedative effects of *Tilia americana* var. Mexicana. *Planta Medica* 73: 1148-1155.

Amabeoku, G., Eagles, P., Scott, G., Mayeng, I., Springfield, E. 2001. Analgesic and antipyretic effects of *Dodonaea angustifolia* and *Salvia africana-lutea*. *Journal of Ethnopharmacology* 2 (3): 117-124.

Al-Yousuf, M., Bashir, A., Ali, B., Tanira, M., Blunden, G. 2002. Some effects of *Salvia aegyptiaca* L. on the central nervous system in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 1: 121-127.

Alves, R., Sales, K., Machado, N., Francielle, S., Horst, H., Geraldo, P., Soares, S., Hatsuko, B., Paula, W. 2012. Antinociceptive and anti-inflammatory potential of extract and isolated compounds from leaves of *Salvia officinalis* in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 139: 519-526.

Aragão, G.F., Carneiro, L., Junior, A., Vieira, L., Bandeira, P., Lemos, T., Viana, G. 2006. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-

amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. Pharmacology, Biochemistry and Behaviour 85: 827-834.

Argueta, A., Cano, L., Rodarte, M. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Instituto Nacional Indigenista, México, D.F. 1193.

Ariza, Y.S., Rueda, D.C., Rincón, V.J., Linares, L.,E., Guerrero, M.F. 2007. Efectos farmacológicos sobre el sistema nervioso central inducidos por cumarina, aislada de *Hygrophila tytttha* Leonard. Revista de la facultad de Química Farmacéutica 14: 51-58.

Baulieu, E., Schumacer, M., Koenig, H., Jungtestas, I., Akwa, Y. 1996. Progesterone as a neurosteroid: actions within the nervous system. Cellular and Molecular Neurobiology 16: 143-154.

Bautista, F. 2012. Elucidación estructural y evaluación de la actividad biológica de diterpenos tipo neo-clerodano de *Salvia herbácea*, *S. shannoni* y *S. microphylla*. Tesis de doctorado. Ciencias Químicas, UNAM. México, D.F. pp 162.

Besson, J.M. 1999. The neurobiology of pain. The lancet 353: 1610-1615.

Bermúdez, A., Oliveira-Miranda, M., Velázquez D. 2005. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. Interciencia 30: 453-459.

Bozoc P., Georgieva, Y. 2017. Antifeedant activity of neo-clerodane diterpenoids from *Scutellaria altissima* against Colorado potato beetle larvae. Natural Products Communications; 12: 327-328.

Braida, D., Capurro, V., Zani, A., Rubino, T., Vigano, D., Parolaro, D., Sala, M. 2009. Potential anxiolytic and antidepressant-like effects of salvinorin A, the main active ingredient of *Salvia divinorum*, in rodents. British Journal of Pharmacology 157: 844-853.

Brown, G., Nemes, C. 2007. El comportamiento exploratorio de las ratas en el aparato de tablero de agujeros: ¿Es una medida válida de neofilia sumergir la cabeza? Elsevier 78: 442-448.

Cahill, J. 2003. Ethnobotany of chia *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae). Economic Botany 57: 604-618.

Castro, C., Villa, N., Ramírez, S., Mosso, C. 2014. Uso medicinal de plantas antidiabéticas en el legado etnobotánico oaxaqueño. Revista Cubana de Plantas Medicinales 19: 101-120.

Chavariás-Isla, I.A., Estévez, A. S., Castellanos, L.J., Méndez, P. A. 2005. Epidemiología del dolor abdominal en la consulta de un Servicio de Urgencias. Archivos de Medicina de Urgencia de México 2 (3): 87-91.

Clark, G., Koster, A.G., Person, D.W. 1997. Exploratory behaviour in chronic disulfotan poisoning in mice. Psychopharmacology (Berl.) 20:169-171.

Cornejo-Tenorio, G., Ibarra-Manríquez, G. 2011. Diversidad y distribución del género *Salvia* (Lamiaceae) en Michoacán, México. Revista Mexicana de Biodiversidad 82: 1279-1296.

Chavan, M., Wakte, P., Shinde, D. 2010. Analgesic and anti-inflammatory activity of caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. Phytomedicine 17: 149-151.

Chavariás-Isla, G. A., Guevara, L.U., Gutiérrez, S.C., Betancourt, S.J. 2010. Epidemiología del dolor crónico en México. Revista Mexicana de Anestesiología 33: 207-213.

Chernov, H., Wilson, D., Fowler, W., Plummer, A. 1967. Non-especificity of the mouse Writhing test. Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie 167: 171-178.



Chun-Yan, S., Qian-Liang, M., Khalid, R., Ting, H., Lu-Ping, Q. 2015. *Salvia miltiorrhiza*: Traditional medicinal uses, Chemistry, and pharmacology. Chinese Journal Medicines 13: 163-182.

Cía, H. 2002. La ansiedad y sus trastornos. Argentina: Polemos. pp 496.

Coffeen, U., Pellicer, F. 2019. *Salvia divinorum*: from recreational hallucinogenic use to analgesic and anti-inflammatory action. Journal of Pain Research 12: 1069-1076.

Cruz-Jiménez, L., Guzmán-Lucio, M., Viveros-Valdez, E. 2014. Traditional medicinal plants used for the treatment of gastrointestinal diseases in Chiapas, México. World Applied Sciences Journal 31: 508-515.

Cuevas-Morales, C. 2018. Química y evaluación del efecto antinociceptivo de *Salvia purpurea* Cav. (Lamiaceae). Tesis de licenciatura. UNAM. Facultad de Ciencias. México, Ciudad de México. 94 pp.

Deng, G., Barniem R. Integrative Oncology: Complementary therapies for pain, anxiety and mood disturbance. Cancer Journal for Clinicians 55: 109-166

Dell'osso, B. y Lader, M. 2013. Do benzodiazepines still deserve a major role in the treatment of psychiatric disorder? A critical reappraisal. European Psychiatry 28:7-20.

Domínguez-Vázquez, G., Castro-Ramírez, A. 2002. Usos medicinales de la familia Labiatae en Chiapas, México. Etnobiología 2: 19-31.

Dziukas, L., Vohra, J. 1991. Tricyclic antidepressant poisoning. The Medical Journal of Australia 154: <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1991.tb112889.x>.

Espejo, S. A., Ramamoorthy, T.P. 1993. Revisión taxonómica de *Salvia* Sección Sigmoidae (Lamiaceae). Acta Botánica Mexicana 23: 65-102.

Esquivel, B., Hernández, M., Ramamoorthy, J., Cardenas, J. Rodríguez-Hahn, L. 1986. Semiatriin, a neo-clerodane diterpenoid from *Salvia semiatrata*. Phytochemistry 25: 1484-1486.

Esquivel, B. 2008. Rearranged clerodane and abietane derived diterpenoids from American *salvia* species. *Natural Product Communications* 3: 989-1002.

Esquivel, B. 2005. Abietane diterpenoids from the roots of some Mexican *Salvia* species (Labiatae): chemical diversity, phytogeographical significance, and cytotoxic activity. *Chemical & Biodiversity* 2: 738- 747.

Esquivel, B. 2017. Contribución al estudio químico sistemático del género *Salvia* (Lamiaceae) en México. Tesis de Doctorado. UNAM. Instituto de Química. México, D.F., 138 pp.

Esquivel-García, R., Pérez-Calix, E., Ochoa-Zarzosa, A., García-Pérez, M. 2018. Ethnomedicinal plants used for the treatment of dermatological affections on the Purépecha Plateau, Michoacán, México. *Acta Botanica Mexicana* 125: 95-132.

Fidyt, K., Fiedorowicz, A., Strzadala, L., Szumny, A. 2016.  $\beta$ -caryophyllene and  $\beta$ -caryophyllene oxide-natural compounds of anticancer and analgesic properties. *Cancer Medicine* 5 (10): <https://doi.org/10.1002/cam4.816>.

Fuentes, P., Mendoza, Y., Rosales, F., Cisneros, T. 2008. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón. Ministerio de Salud: Instituto Nacional de Salud, Perú, Lima.

García, M., Gómez-Reino, C. 2000. Fisiopatología de la ciclooxigenasa-1 y ciclooxigenasa-2. *Revista Española de Reumatología* 27: 33-35

Gispert, C. M., Coutiño, B. B., Rodríguez, G. H., Díaz, R. A. 2008. La etnobotánica y su vinculación intrínseca con los grupos étnicos integrados a su medio natural. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

Gómez, C., Saldívar-González, A., Rodríguez, R. 2002. Modelos animales para el estudio de la ansiedad: una aproximación crítica. *Salud Mental* 25: 14-24.

González-Chávez, M., Alonso-Castro, A., Zapata-Morales, J., Arana-Argáez. V., Torres-Romero, J., Medina-Rivera, Y., Sánchez-Mendoza, E., Pérez-Gutiérrez, S. 2018.

Anti-Inflammatory and antinociceptive effects of tilifodiolide isolates from *Salvia tilifolia* Vahl (Lamiaceae). Drug Development Research 79: 165-172.

González-Trujano, M.E., Navarrete, A., Reyes, B., Hong, E. 1998. Some pharmacological effects of the ethanol extract of leaves of *Annona diversifolia* on the central nervous system in mice. Phytotherapy Research 12:600-602.

Griebel, G. 1995. 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. Pharmacology & Therapeutics 65: 319-395.

Griebel, G., Holmes A. 2013. 50 years of hurdles and hope in anxiolytic drug Discovery. Nature Reviews Drug Discovery 12: 667-687.

Griffin, C., Kaye, A., Rivera, F., Kaye, A. 2013. Benzodiazepine pharmacology and central nervous system-mediated effects. The Ochsner Journal 13: 214-223.

Harro, J. 2018. Animals, anxiety, and anxiety disorders: How to measure anxiety in rodents and why. Behavioural Brain Research 352: 81-93.

Hernández T. F. 1942-1946. Historia de las plantas de la Nueva España. Versión electrónica. UNAM, Instituto de Biología. Disponible en: <http://www.ibiologia.unam.mx/plantasnuevaespana/prologo.html>.

Hernández-Agero T., Carretero A., Villar del Fresno, A. 2002. *Salvia*: Fitoquímica, farmacología y terapéutica. Fitofarmacia 16: 60- 63.

Hosseinzadeh, H., Danaee, A., Ziaee, T. 2008. Anti-anxiety effect of aqueous and ethanolic extracts of *Salvia lerrifolia* Benth. Leaves in mice using elevated plus maze. Journal of Medicinal Plants 3: 25-36

Hall, C., & Ballechey, E. 1932. A study of the rat's behaviour in a field: A contribution to method in comparative psychology. University of California Publications in Psychology 6: 1-12.

Harley, R. & Pastore, B. 2012. A generic revision and new combinations in the Hyptidinae (Lamiaceae), based on molecular and morphological evidence. *Phytotaxa* 58: 1-55.

Hendershot, L. & Forsaith, J. 1959. Antagonism of the frequency of phenylquinone-induced Writhing in the mouse by weak analgesics and nonanalgesics. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 125: 237-240.

Hersch, M. 1999. De hierbas y herbolarios en el México actual. *Arqueología Mexicana* 39: 60-65.

INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). 2015. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Santiago Huaucilla, Oaxaca. México.

Imanshahidi, M. y Hosseinzadeh, H. 2006. The pharmacological effects of *Salvia* species on the central nervous system. *Phytotherapy Research* 20: 427-437.

Jamison, R. 2002. Clinical pharmacology of opioids for pain. *The Clinical Journal of Pain* 18: 3-13.

Jash, S., Gorai, D., Roy, R. 2016. *Salvia* genus and triterpenoids. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 7: 4710-4732.

Jenks, A., Walker J., Kim S. 2013. Phylogeny of New World *Salvia* subgenus *Calosphace* (Lamiaceae) based on cpDNA (psbA-trnH) and nrDNA (ITS) sequence data. *Journal of Plant Research* 126: 483-496.

Jenks, A.A., Seung-Chul, K. 2013. Medicinal plant complexes of *Salvia* subgenus *Calosphace*: An ethnobotanical study of new world sages. *Journal of Ethnopharmacology* 146: 214-224.

Jimenez-Ferrer, E., Santillan-Urquiza, A., Alegría-Herrera, E., Zamilpa, A., Nogueron-Merino, C., Tortoriello, J., Navarro-García, V., Avilés-Flores, M., Fuentes-Mata., Herrera-Ruiz, M. 2017. Anxiolytic effect of fatty acids and terpenes fraction from *Aloysia triphylla*: Serotonergic, GABAergic and glutamatergic implications. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 96: 320-327.

Jiménez, L., Debesa G., Bastanzuri V., Pérez J., Ávila P. 2003. Comportamiento de las reacciones adversas a los analgésicos y antiinflamatorios no esteroideos. *Revista Cubana de Farmacia* 37: 3.

John, T., French, L., Erlichman, J. 2006. The antinociceptive effect of salvinorin A in mice. *European Journal of Pharmacology* 545: 129-133.

Kaur, S. & Singh, R. 2017. Role of different neurotransmitters in anxiety: a systematic review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 8: 411-421.

Kantati, YT, Rodjo, KM, Dogbeavou, K.S., Vaudry, D. Leprince, J., Gbeassor, M. 2016. Ethnopharmacological survey of plant species used in folk medicine against central nervous system disorders in Togo. *Journal of Ethnopharmacology* 181: 214-220.

Karami, M., Shamerani, M., Aley S., Gohari, A., Ehsani, V. 2013. Comparison antinociceptive activity of the aqueous methanolic extracts of *Salvia hypoleuca* and *Phytolacca americana* in mice. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 17: 2755-2759.

Kintzios, E. S. 2005. *Sage: The genus Salvia*. Singapore: Harwood Academic Published.

Lai-Wei L, Yan-Yan Q, Shi-Xi L, Xing-De W, Qin-Shi Z. Neo-clerodane and abietane diterpenoids with neurotrophic activities form the aerial parts of *Salvia leucantha* Cav. *Fitoterapia*, 2018; 127: 367-374.

Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S. 2001. Animal model of nociception. *Pharmacological Reviews* 53: 597-652.

Lister, R.G. 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 92:180-185.

Lister, R.G. 1990. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology & Therapeutics* 46: 321-340.

Liu, A., Cai, G., Wei, Y., Yu, J., Chen, J., Yang, J., Wang, X., Che, Y., Chen J., Wu, S. 2015. Anxiolytic effect of essential oils of *Salvia miltiorrhiza* in rats. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8: 756-764.

Lobina, C., Colombo, C., Gessa G., Carai M., Allegrini P., Morazzoni P., Riva A. 2018. Anxiolytic effect of an extract of *Salvia miltiorrhiza* in rats. *Journal of the Chinese Medical Association* 81: 390-397.

López-Rubalcava, C., Estrada, C. E. 2016. Mexican medicinal plants with anxiolytic or antidepressant activity: Focus on preclinical research. *Journal of Ethnopharmacology* 186: 377-391.

Loux, J., Smith, S., Salem, H. 1978. Comparative analgesic testing of various compounds in mice using Writhing techniques. *Arzneimittel Forschung* 28: 1644-1647

Lozoya, X. 1999. Un paraíso de plantas medicinales. *Arqueología Mexicana* 39: 14-21.

Lu, J., Wu, D., Zheng, Y., Hu, B., Zhang, Z., Ye, Q., Liu, C., Shan, Q., Wang, Y. 2010. Ursolic acid attenuates D-galactose-induced inflammatory response in mouse prefrontal cortex through inhibiting AGEs/RAGE/NF- $\kappa$ B pathway activation. *Cerebral Cortex* 20: 2540-2548.

Maione, F., Bonito, C., Colucci, M., Cozzolino, V., Bisio, A., Romussi, G., Cicala, C., Pieretti, S., Macolo, N. 2009. First evidence for an anxiolytic effect of a diterpenoid from *Salvia cinnabarina*. *Natural Products Communications* 4: 469-472.

Maizels, M. 2005. Antidepressants and antiepileptic drugs for chronic non-cancer pain. *American Family Physician* 1: 483-490.

Magallanes, M., Carillo, C., Ponce B. 2013. Herbolaria: alternativa terapéutica en diabetes mellitus, usos y costumbres. UAC Ciencia Cierta 34.

Martin, E. I., Ressler, K. J., Binder, E., & Nemeroff, C. B. 2009. The neurobiology of anxiety disorders: brain imaging, genetics, and psychoneuroendocrinology. *The Psychiatric clinics of North America*, 32(3), 549–575.

Martínez-Gordillo, M., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M.R., Montiel, O. 2013. Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84:30-86.

Martínez-Gordillo, M., Bedolla-García, B., Cornejo-Tenorio, G., Fragoso-Martínez I., García-Peña, R., González-Gallegos, G., Lara-Cabrera, S., Zamudio, S. 2017. Lamiaceae de México. *Botanical Sciences* 95: 780-806.

Medina-Mora, E., Borges, G., Muñoz, C., Benjet, C., Blanco, J., Bautista, C., Villatoro, J., Rojas, G., Zambrano, J., Casanova, L., Aguilar-Gaxiola, S. 2003. Prevalencia de trastornos mentales y uso de servicios: Resultados de la encuesta nacional de epidemiología psiquiátrica en México. *Salud Mental* 26: 1- 16.

Medina-Mora E., Sarti, G, Real, Q. 2015. La depresión y otros trastornos psiquiátricos. Intersistemas S.A de C.V. México, D.F. pp. 410.

Mendoza, P.N. 2008. Farmacología médica. México, Editorial Médica Panamericana.

Molina-Mendoza J., Galván-Villanueva R., Patiño-Siliciano, A., Fernández-Nava, R. 2012. Plantas medicinales y listado florístico preliminar del municipio de Huasca de Ocampo, Hidalgo, México. *Polibotánica* 34: 239-271.

Montgomery, K. 1955. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 48: 254-260.

Mora, S., Millán, R., Lungenstrass, H., Díaz-Véliz, G., Moran J., Herrera-Ruiz, M., Tortorriello, J. 2006. The hydroalcoholic extract of *Salvia elegans* induces anxiolytic and antidepressant-like effects in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 106: 76-81.

Moreno-Pérez, G., Gonzalez-Trujano, M.E., Martínez-Gordillo, M.J., Miguel-Chávez, R., Basurto-Peña, F.A., Dorazco-González, A., Aguirre-Hernández, E. 2019. Amarisolide A and pedalitin as bioactive compounds in the antinociceptive effects of *Salvia circinata* (Lamiaceae). *Botanical Sciences* 97: 355-365.

2017. Evaluación química y actividad antinociceptiva de *Salvia circinata*. Tesis de maestría. UNAM. Posgrado en Ciencias Biológicas. México, Ciudad de México, 76 pp.

Naderi, N., Akhavan, N., Ahari, A., Zamani, N., Kamalinejad, M., Shokrzadeh, M., Ahangar, N., Motamedi, F. 2011. Effects of hydroalcoholic extract from *Salvia verticillata* on pharmacological models of seizure, anxiety and depression in mice. *Iran Journal of Pharmaceutical Research* 10: 535-545.

Nagase, H. 2011. *Chemistry of Opioids*. London: Springer.

Nambo, C.A. 2015. *Etnobotánica de Santiago Huaucilla, Oaxaca y evaluación farmacológica de Zinnia peruviana*. Tesis de Licenciatura. UNAM. Facultad de Ciencias. México, D.F., 119 pp.

National Institutes of health. 2011. ¿Qué es la medicina alternativa y complementaria? Biblioteca Nacional de Medicina de los NIH. Disponible en: <https://nccih.nih.gov/sites/nccam.nih.gov/files/informaciongeneral.pdf>.



Nicolas, I., Vilchis, M., Aragon, N., Miranda, R., Hojer, G., Castro, M. 2003. Theoretical study of the structure and antimicrobial activity of hormimone. *International Journal of Quantum Chemistry* 93: 411-421.

Nicholson, B. 2006. Diffencial diagnosis: nociceptive and neuropathic pain. *The American Journal of Managed Care* 12: 256-262.

Nogueira, A., Oliveira, Y., Adjafre, B., De Moraes, M., Aragao, G. 2018. Pharmacological effects of the isomeric mixture of alpha and beta amyryn from *Protium heptaphyllum* a literatura review. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 22: 1-22.

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Diario oficial de la federación, México, Distrito Federal, 22 de agosto de 2001.

OCDE. 2001. Gideline for testing of chemicals acute oral toxicity – Acute toxic class method, adoptado 17 de diciembre de 2011, [fecha de consulta 13 de mayo 2017] disponible en: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948378.pdf>.

Ocegueda, S., Moreno, E., & Koleff, P. 2005. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. *CONABIO Biodiversitas* 60: 12-15.

Olvera-Mendoza, E, Bedolla-García, B. & Lara, S. 2017. Revisión taxonómica de *Salvia* subgénero *Calosphace* sección *Scorodoniae* (Lamiaceae), endémica de México. *Acta Botánica Mexicana* 188: 7-39.

Ortega, A., Roca, A., Micó, J. 2002. Modelos animales de dolor: Una visión crítica. *Revista de la Sociedad Española de Dolor* 9:447-453.

Ortega-Cala, L., Monroy-Ortíz, C., Monroy-Martínez, R., Colín-Bahena, H., Flores-Franco, G., Luna-Cavazos, M., Monroy-Ortiz, R. 2019. Plantas medicinales utilizadas para enfermedades del sistema digestivo en Tetela del Volcán, Estado de Morelos, México. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 18: 106-129.

Park, S., Sim, Y., Kang, Y., Kim, S., Kim, C., Suh, H. 2013. Mechanisms involved in the antinociceptive effects of orally administered oleanolic acid in the mouse. *Archives Pharmaceutic Reviews* 36: 68-81.

Parra, M., García, J., Mejenez, R. 2013. Efecto de la administración de pentobarbital y propofol por vía intraperitoneal para cirugía estereotáxica en ratas adultas. *Mediagraphic: Investigación en Discapacidad* 2: 12-17.

Pereira, C., Antonio, O., Amanda, A., Torequ, I., Pergentino, S., Mendes, F. 2014. Anxiolytic-like effects of phytol: Possible involvement of GABAergic transmission. *Brain Research* 1547: 34-42.

Pérez, M.M. 2003. Dónde y cómo se produce la ansiedad: sus bases biológicas. *Ciencia* 2: 16-28.

Pérez-Nicolas, M., Vibrans, H., Romero-Manzanares, A., Saynes-Vasquez, A., Luna-Cavazos, M., Flores-Cruz, M., Lira-Saade R. 2017. Patterns of Knowledge and use of medicinal plants in Santiago Camotlán, Oaxaca, México. *Economic Botany* 71: 209-223.

Perry, N., Houghton, P., Theobald, A., Perry, E. 2000. In vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 52: 895-902.

Pironi, A., De Araujo, P., Fernández, M., Salgado, H., Chorilli, M. 2018. Characteristics, biological properties and analytical methods of ursolic acid: A review. *Analytical Chemistry* 48: 86-93.

Plaghki, L., Mourauz, A., Le Bars, D. 2018. Fisiología del dolor. *EMC-Kinesiterapia-Medicina Física* 29: 1-22.

Polanco, A., Vargas-Irwin, C., Góngora, E. 2011. Modelos animales: una revisión desde tres pruebas utilizadas en ansiedad. *Suma Psicologica* 18: 141-148

Prut, L., Belzung, C. 2003. The open field as a paradigm to measure of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology* 463:3-33.

Rabbani, M., Sajjadi, S., Jafarian, A., Vasegui G. 2005. Anxiolytic effects of *Salvia reuterana* Boiss. On the elevated plus-maze model of anxiety in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 1: 101-103.

Ramamoorthy, T. & Elliot M. 1998. Lamiaceae en México; diversidad, distribución, endemismo y evolución. In *diversidad biológica de México; orígenes y distribución*. México, Instituto de Biología, UNAM. p 501-525.

Rodríguez-Landa, J., Contreras, C. 1998. Algunos datos recientes sobre la fisiopatología de los trastornos por ansiedad. *Revista Biomédica* 9: 181-191.

Rodríguez, Y. 2007. Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas. *Acta Bioética* 13: 25-40.

Rosas-Martínez, M., Gutiérrez-Venegas, G. 2019. Myrecetin inhibition of peptidoglycan-induced COX-2 Expression in H9c2 cardiomyocytes. *Preventive Nutrition and Food Science* 24: 202-209.

Santos, J., Piccinelli, A., Formagio, M., Oliveira, C., Santos, E., Stefanello, M., Junior, U., Oliveira, R., Sugizaki, M., Kasuuya, C. 2017. Antidepressive and antinociceptive effects of ethanolic extract and fructicoline A from *Salvia lachnostachys* Benth leaves on rodents. *Plos One* 12(2): e0172151. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172151>.

Sociedad Española del Dolor. 2016. *Manual de Medicina del Dolor: Fundamentos, evaluación y tratamiento*. España: Editorial Medica Panamericana.

Takeda, H., Tsuji, M., Matsumiya, T. 1998. Changes in head-dipping behaviour in the hole-board test reflect the anxiogenic and/ or anxiolytic state in mice. *European Journal of Pharmacology* 350: 21-29.

Tamargo, M., Delpón, M. 2011. Farmacología de los bloqueantes de los receptores beta-adrenérgicos. Curso Beta 2011. Disponible en: <https://www.cardioteca.com/centro-de-recursos-clinicos-bisoprolol/644-farmacologia-clinica-de-los-betabloqueantes.html>.

Taddei-Bringas, G.A., Santillana-Macedo, M.A., Romero-Cancio, J.A., Romero-Téllez, M.B. 1999. Acceptance and use of therapeutic medical plants in family medical care. *Salud Pública* 41:216-220.

Tlacomulco-Flores, L.L., Déciga-Campos, M., González-Trujano, M.E., Carballo-Villalobos, A.I., Pellicer, P. 2019. Antinociceptive effects of *Salvia divinorum* and bioactive salvinorins in experimental models in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. Doi.org/10.1016/j.jep.2019.112276.

Trescot, A.M., Datta, S., Lee, M., Hansen, H. 2008. Opioid pharmacology. *Pain Physician* 11: 133-153.

Turner, B. 2009. Recension of the Mexican species of *Salvia* (Lamiaceae), section *Scorodonia*. *Phytologia* 92: 256-269.

Valdéz, L., Díaz, J., Paul, A. 1983. Ethnopharmacology of ska María Pastora (*Salvia divinorum*, Epling and Jativa-M.). *Journal of Ethnopharmacology* 7: 287-312.

Velasco L. 1999. Representación de algunas plantas medicinales en la arqueología. *Arqueología Mexicana* 39: 24-29.

Verano, J., Gonzalez-Trujano, M.E., Décima-Campos, M., Ventura-Martínez, R., Pellicer, F. 2013. Ursolic acid from *Agastache mexicana* aerial parts produces antinociceptive activity involving TRPV1 receptors, cGMP and a serotonergic synergism. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour* 110, 255-264.

Viana, G.S.B., Bandeira, M.A.M., Matos, F.J.A. 2003. Analgesic and anti-inflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. *Phytomedicine* 10: 189-195.

Voguel, H. 2008. Drug discovery and evaluation: Pharmacological Assays. Berlin, Alemania, Springer.

Vyklicky, L. 1979. Techniques for the study of pain in animals. *Advance in Pain Research and Therapy*. Raven Press, New York, pp. 745.

Walsh, R., Cummind, R. 1976. The open-Field Test: A critical review. *Psychological Bulletin* 83: 482-504.

Wang, M., Ma, C., Chen, Y., Li, X., Chen, J. Cytotoxic Neo-clerodane diterpenoids from *Scutellaria barbata* D.Don. *Chemistry Biodiversity*, 2019; 16: 1-6.

Wu, Y.B., Ni, Z. Y., Shi, Q.W., Dong, M., Kiyota, H., Gu, Y.C., Cong, B. 2012. Constituents from *Salvia* species and their biological activities. *Chemical Reviews* 112: 5967-6026.

Zegarra, P. 2007. Bases fisiopatológicas del dolor. *Acta Medica Peruana* 24: 105-108.

Zolla, C. 2005. La medicina tradicional indígena en el México actual. *Arqueología Mexicana* 74: 62-65.