



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.
Posgrado En Ciencias Biológicas
Opción Biotecnología

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, ANALGÉSICA Y
ANTIINFLAMATORIA DE METABOLITOS DE LA
FLORA NATIVA DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN

Tesis que presenta

HIATZY EISLIN ZAPATA ESTRELLA

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2014



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado "Actividad antioxidante, analgésica y antiinflamatoria de metabolitos aislados de la flora nativa de la península de Yucatán" fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias de este Centro.

Atentamente,

Dr. Manuel Martínez Estévez

Director de Docencia

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México; a de diciembre de 2014

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Hiatzy Eislir Zapata Estrella

AGRADECIMIENTOS

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero a través de la beca de Doctorado 20209 y la Beca mixta para la estancia en la Universidad de UNIVALI, Itajaí, SC, Brasil.

Al Programa de Cooperación Bilateral México-Brasil. CONACYT -Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY), por las facilidades para la realización de este proyecto, así como por la Beca de Movilidad CICY 2012, de manera especial a la Unidad de Biotecnología, así como a la subdirección de Posgrado por su amable atención.

A los integrantes de mi comité tutorial y comité revisor por todas las aportaciones hechas a mi trabajo de tesis.

Al Dr. Valdir Cechinel Filho y Dra Nara L. Meira Quintão de la Universidad de UNIVALI, por sus valiosos consejos y comentarios durante mi estancia en Itajaí, al igual que a su equipo de trabajo.

A los técnicos, QBB. Karlina García Sosa, y QBB. Fabiola Escalante Erosa, por toda la ayuda brindada a lo largo de mi doctorado.

A mis compañeros del Laboratorio 2 de Química Orgánica.

A Azeret D. M. Sánchez-Pardenill e Ivan Mijangos Ramos por enriquecer el proyecto, por darme la oportunidad de aprender junto con ustedes, ¡gracias!

A mis amigos del doctorado, Edilia De la Rosa y Glendy Polanco, por el valioso intercambio de ideas.

Un agradecimiento y dedicatoria especial a mi gran amigo Alejandro Yam Puc, la entrega y amor que demuestra a la Química Orgánica es aliciente para mí, muchas gracias por siempre estar a mi lado.

De manera especial agradezco al Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez, que sin su apoyo y confianza no hubiese podido llevar a cabo este proyecto, le agradezco las discusiones, amonestaciones, de vuelta las discusiones, consejos, anécdotas y debates filosóficos, pero sobre todo por su paciencia y dedicación en mi formación académica a lo largo del doctorado.

DEDICATORIAS

A Max, Alondra y mi xtup

A mis padres Raúl y Gretty

"El que no posee el don de maravillarse ni de entusiasmarse más le valdría estar muerto, porque sus ojos están cerrados" Albert Einstein.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS.....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
ÍNDICE DE CUADROS.....	XV
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	4
CAPÍTULO I.....	6
INTRODUCCIÓN	6
1 ANTECEDENTES.....	9
1.1 MECANISMOS DE LA INFLAMACIÓN DOLOROSA.....	9
1.2 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y EL ESTRÉS OXIDATIVO	11
1.3 PARTICIPACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN EL PROCESO NOCICEPTIVO	13
1.4 PARTICIPACIÓN DE LAS ERO EN EL PROCESO INFLAMATORIO	14
1.5 ANTIOXIDANTES.....	16
1.6 ANALGÉSICOS.....	18
1.7 ANTIINFLAMATORIOS.....	20
1.8 MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS PARA EL DOLOR E INFLAMACIÓN.....	21
1.9 MÉTODOS EMPLEADOS PARA DETECTAR ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	23
1.10 PRODUCTOS NATURALES CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, ANALGÉSICA Y ANTIINFLAMATORIA.....	25
1.11 LA IMPORTANCIA DE LAS PLANTAS MEDICINALES Y LOS PRODUCTOS NATURALES	27
1.12 FLORA NATIVA CON PROPIEDADES ANALGÉSICAS Y ANTIINFLAMATORIAS DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN.....	27
1.13 INFORMACIÓN ETNOMÉDICA, FARMACOLÓGICA Y FITOQUÍMICA DE, <i>Acmella</i> <i>pilosa</i> , <i>Calea urticifolia</i> , <i>Cnidoscolus souzae</i> , <i>Critonia aromatisans</i> y <i>Scutellaria gaumeri</i>	28
1.13.1 <i>Acmella pilosa</i> R. K. CANSEN (ASTERACEAE).....	28
1.13.2 <i>Calea urticifolia</i> (MILLER) DC (ASTERACEAE).....	29
1.13.3 <i>Cnidoscolus souzae</i> , MCVAUGH (EUPHORBIACEAE).....	30
1.13.4 <i>Critonia aromatisans</i> (DC.) R.M. KING Y H. ROB.SYN. <i>Eupatorium hemipteropodum</i> ROBINSON (ASTERACEAE).....	31
1.13.5 <i>Scutellaria gaumeri</i> , LEONARD. (LAMIACEAE).....	32
1.14 JUSTIFICACIÓN	34

1.15 HIPÓTESIS.....	36
1.15.1 OBJETIVOS	36
1.15.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
1.16 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	37
1.7 REFERENCIAS	39
CAPÍTULO II ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANALGÉSICA DE PLANTAS NATIVAS DE LA FLORA DE YUCATÁN.....	48
DESCRIPCIÓN DEL CAPÍTULO.....	48
2.1 ANTIOXIDANT AND ANALGESIC ACTIVITY OF SELECTED MEDICINAL PLANTS FROM THE NATIVE FLORA OF THE YUCATÁN PENÍNSULA.....	49
2.2 ABSTRACT.....	49
2.3 INTRODUCTION	50
2.4 MATERIALS AND METHODS	52
GENERAL PROCEDURES	52
2.4.1 PLANT MATERIAL	52
2.4.1.1 PREPARATION OF PLANT EXTRACTS.....	53
2.4.2 DIPHENYL-1-PICRYLHYDRAZYL (DPPH) RADICAL REDUCTION ASSAY	53
2.5 BIOLOGICAL ASSAYS.....	54
2.5.1 ANALGESIC ACTIVITY	54
2.5.1.2 FORMALIN TEST.....	55
2.6 STATISTICAL ANALYSES.....	56
2.7 RESULTS AND DISCUSSION	56
2.8 CONCLUSIONS	66
2.9 ACKNOWLEDGMENTS	67
2.10 REFERENCES.....	67
CAPÍTULO III METABOLITOS BIOACTIVOS DE <i>Cnidoscolus souzae</i> Y <i>Acmella pilosa</i> ..	74
DESCRIPCION DELCAPÍTULO	74
3.1 BIOACTIVE METABOLITES FROM <i>Cnidoscolus souzae</i> AND <i>Acmella pilosa</i>	74
3.2 ABSTRACT	75
3.3 INTRODUCTION	75
3.4 MATERIALS AND METHODS	76
3.4.1 GENERAL PROCEDURES	76
3.4.2 PLANT MATERIAL	76
3.4.2 PREPARATION OF PLANT EXTRACTS.....	77
3.4.2.1 ISOLATION OF BIOACTIVE METABOLITES OF <i>A. pilosa</i>	77

3.4.2.2 ISOLATION OF BIOACTIVE METABOLITES OF <i>C. souzae</i>	77
3.4.3 DIPHENYL-1-PICRYLHYDRAZYL (DPPH) RADICAL SCAVENGING ASSAY	78
3.4.4 IN VIVO ASSAYS	78
3.4.1 MECHANICAL HYPERALGESIA INDUCED BY CARRAGEENAN, PROSTAGLANDIN E2 (PGE2) OR BRADYKININ (BK).....	78
3.5 CARRAGEENAN-INDUCED PAW OEDEMA	79
3.6 STATISTICAL ANALYSES.....	79
3.7 RESULTS AND DISCUSSION	79
3.8 ACKNOWLEDGMENTS	81
3.9 REFERENCES.....	81
CAPÍTULO IV ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, ANALGÉSICA Y ANTI-INFLAMATORIA DE LOS METABOLITOS BIOACTIVOS DEL EXTRACTO DE RAÍZ DE <i>Calea urticifolia</i>	84
DESCRIPCION DEL CAPÍTULO	84
4.1 ANTIOXIDANT, ANALGESIC AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF BIOACTIVE METABOLITES FROM THE ROOT EXTRACT OF <i>Calea urticifolia</i>	85
4.2 ABSTRACT	86
4.3 INTRODUCTION	87
4.4 MATERIALS AND METHODS	88
4.4.1 EXPERIMENTAL GENERAL	88
4.4.2 PLANT MATERIAL	88
4.4.3 EXTRACTION AND ISOLATION	88
4.4.2.1 ISOLATION OF BIOACTIVE METABOLITES OF <i>Calea urticifolia</i>	89
4.5.2 ANTIOXIDANT ACTIVITY	91
4.5.3 IN VIVO ASSAYS.....	91
4.5.3.1 MECHANICAL HYPERALGESIA INDUCED BY CARRAGEENAN, PROSTAGLANDIN E2 (PGE2) OR BRADYKININ (BK).	91
4.5.3.2 CARRAGEENAN-INDUCED PAW OEDEMA.	91
4.6 STATISTICAL ANALYSIS.....	92
4.7 RESULT AND DISCUSSION.....	92
4.8 ACKNOWLEDGMENTS.....	100
4.9 REFERENCES.....	101
CAPÍTULO V	105
DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	106
5. 2 CONCLUSIONES	109
5.3 PERSPECTIVAS	109
6 APENDICE	111

ABREVIATURAS

5-HT:	Receptores de 5-hidroxitriptamina
AA:	Ácido araquidónico
ABTS:	Reactivo 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)
AINE:	Antiinflamatorios no esteroideos
ARE:	Elemento de respuesta antioxidante
ASA:	ácido acetilsalicílico
BK:	Bradicinina
CAM:	Moléculas de adhesión celular
CAT:	Catalasa
COX-1:	Ciclooxigenasa 1
COX-2:	Ciclooxigenasa 2
CRF:	Factor liberador de corticotropina
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DPPH:	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
ERN:	Especies reactivas de nitrógeno
ERO:	Especies reactivas de oxígeno
FAP:	Factores activador de plaqueta
FRAP:	Poder Antioxidante de Reducción Férrica
GPx:	Glutación Peroxidasa
GRD:	Ganglios de la raíz dorsal
GSH:	Glutación
i.p:	vía intraperitoneal
i.pl:	inyección intraplantar
IASP:	International Association for the Study of Pain
IFNy:	Interferón gamma
IL-1:	Interleucina 1
IL-6:	Interleucina 6
IL-8:	interleucina-8
iNOS:	Sintasa de óxido nítrico inducible
LOX:	lipoxigenasa
LPS:	Lipopolisacárido
NFκ-B:	Factor nuclear Kappa B
NGF:	Factor de Crecimiento Neural

Nrf2: Factor nuclear eritroide-2

OMS: Organización Mundial de la Salud

ORAC: Capacidad de absorción del radical oxígeno

PG: Prostaglandina

PGE2: Prostaglandina E2

POMC: pro-opiomelanocortina

s.c: Subcutáneo

SNC: Sistema nervioso central

SNP: Sistema nervioso periférico

SOD: Superóxido dismutasa

SOM: Somatostatina

TEAC: Capacidad antioxidante equivalente al Trolox

TNF: Factor de necrosis tumoral

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

TRAP: Determinación de potencia antioxidante total

TROLOX: Ácido 6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

TXA2: Tromboxano A2

UV: luz ultravioleta

v.o: vía oral

VCAM-1: Molécula 1 de adhesión de células vasculares

XO: Xantina oxidasa

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Mecanismos de inflamación y dolor.	10
Figura 1.2 Las fuentes y las respuestas celulares a las ERO.	13
Figura 1.3 Generación de ERO y ERN durante un proceso lesión y/o de la infección.	16
Figura 1.4 Principales antioxidantes no enzimáticos.	18
Figura 1.5 Analgésicos comúnmente utilizados.	20
Figura 1.6 Antiinflamatorios esteroideos comúnmente utilizados.	21
Figura 1.7 Ensayo de actividad antioxidante por reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).	25
Figura 1.8 Metabolitos con actividad antioxidante, analgésica y antiinflamatoria.	26
Figura 1.9 Metabolitos de <i>Acmella brasilensis</i> . a) Acido kaurenico y b) luteolina.	29
Figura 1.10 Germacrólidos aislados de <i>Calea urticifolia</i>	30
Figura 1.11 Flavonoides presentes en las hojas de <i>C. aconitifolius</i> , <i>C. souzae</i> y <i>C. spinosus</i>	31
Figura 1.12 Metabolitos secundarios reportados de <i>Eupatorium buniifolium</i>	32
Figura 1.13 Metabolitos aislados de <i>Scutellaria baicalensis</i> : a) Baicaleína y b) Baicalina.	33
Figure 3.1 Metabolites isolated stem extract from <i>Acmella pilosa</i> rosmarinic acid (1), caffeic acid (2), rosmarinic acid ethyl ester (3) and 7-deoxynimbidiol (4) of <i>C. souzae</i> root extract.	80
Figure 4.1 Bioactive metabolites from the root extract of <i>Calea urticifolia</i>	90
Figure 4.2 Chair conformation and Newman projection of (a) 3,4-dicaffeoylquinic acid methyl ester (3) and (b) 3,4-dicaffeoyl-epi-quinic acid methyl ester (4) to show the steric y effect between the hydroxyl group in C-1 and carbons C-3 and C-6.	93
Figure 4.3 Effect of the crude extract (A-B), semipurified hexane (Hex) and ethylacetate (EtOAc) fractions (C-D), and purified metabolites 1-5 (E-F) from <i>C. urticifolia</i> on mechanical hypernociception induced by i.p. injection of carrageenan (300 µg/paw) in mice.	98
Figure 4.4 Effect of purified metabolites 1-5 from <i>C. urticifolia</i> on paw oedema induced by carrageenan in mice (A-B).	100

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1 Métodos empleados para detectar actividad antioxidante	24
Table 2.1 Medicinal plants of the native flora of the Yucatán península used to alleviate pain	52
Table 2.2 Yields of organic crude extracts from five medicinal plants of the native flora of the Yucatán península used to alleviate pain.....	53
Table 2.3 Free radical scavenging activity (DPPH radical reduction assay; expressed as EC ₅₀) of leaf (L), stem (S), and root (R) extracts of five medicinal plants of the native flora of the Yucatan peninsula used to alleviate pain	60
Table 2.4 Antinociceptive activity (acetic acid writhing test) of leaf (L), stem (S), and root (R) extracts of five medicinal plants of the native flora of the Yucatan peninsula used to alleviate pain	63
Table 4.1 Radical scavenging activity (expressed as EC ₅₀) of the organic crude extract (CUR), semipurified hexane (Hex) and ethylacetate (EtOAc) fractions, and purified metabolites 1-5 from <i>C.urticifolia</i>	96

RESUMEN

Las ERO contribuyen y mantienen las condiciones de dolor e inflamación, por lo que agentes antioxidantes representan una opción importante para el desarrollo de nuevos analgésicos y antiinflamatorios.

En la medicina tradicional mexicana se utilizan un gran número de plantas para curar el dolor y los problemas inflamatorios. Entre las especies utilizadas en la medicina tradicional yucateca por sus propiedades analgésicas y/o antiinflamatorias se encuentran *Acmella pilosa*, *Calea urticifolia*, *Cnidoscolus souzae*, *Critonia aromatisans* y *Scutellaria gaumeri*.

En este trabajo se encontró que los extractos de hojas de todas las especies poseen una mayor actividad analgésica que los correspondientes extractos de tallo y raíz; sin embargo, y aun cuando los extractos de hojas de *C. urticifolia*, *A. pilosa* y *S. gaumeri* presentaron actividad antioxidante significativa, se encontró que la actividad analgésica de los extractos no está relacionada con su actividad antioxidante. Asimismo, los resultados de este trabajo permitieron establecer que en la actividad analgésica de los extractos de *S. gaumeri* y *C. aromatisans* participan mecanismos centrales y periféricos.

La evaluación de los diferentes metabolitos aislados de los extractos con mayor actividad permitió identificar al ácido rosmarínico, al éster metílico del ácido rosmarínico y al ácido cafeico, como los metabolitos responsables de la actividad antioxidante detectada en el extracto de tallo de *A. pilosa*; el 7-deoxynimbidiol como el principal metabolito con actividad antioxidante, analgésica y antiinflamatoria en el extracto de la raíz de *C. souzae*; y la mezcla de los monoterpenoides Timol y 3-metil 4-isopropilfenol, así como tres derivados de ésteres metílicos isoméricos del ácido cafeoilquínico: 3,4-O-dicafeoilquínico, 3,4-O-dicafeoil-epi-quínico y 3,5-O-dicafeoil-epiquínico, como los metabolitos con actividad antioxidante, analgésica y antiinflamatoria en el extracto de raíz de *C. urticifolia*.

ABSTRACT

ROS contribute and maintain the conditions of pain and inflammation, that is why antioxidant agents represent an important option for the development of new analgesic and antiinflammatory medicaments.

A large number of plants are used to cure pain and inflammatory problems in Mexican traditional medicine. Among the species used in the Yucatecan traditional medicine for their analgesic and/or antiinflammatory properties are *Acmella pilosa*, *Calea urticifolia*, *Cnidioscolus souzae*, *Critonia aromatisans* y *Scutellaria gaumeri*.

In this investigation it was found that extracts from the leaves of the different plants have a stronger analgesic activity than the corresponding stem and root extracts. However, and even though the extracts of *C. urticifolia*, *A. pilosa* and *S. gaumeri* presented a significant antioxidant activity, it was found that analgesic the activity of the extracts is not related to their antioxidant. Furthermore, the results of this work allowed to establish that in the analgesic activity of the extracts of *S. gaumeri* y *C. aromatisans* central and peripheral mechanisms take place.

The evaluation of the several isolated metabolites from the extracts with higher activities allowed the identification of rosmarinic acid, rosmarinic acid methyl ester and caffeic acid, as the metabolites responsible for the antioxidant activity detected in the stem extract of *A. pilosa*; the 7-deoxynimbidiol as the main metabolite with antioxidant, analgesic and antiinflammatory activity in the root of *C. souzae*; and the mixture of monoterpenoids thymol and 3-methyl-4-isopropylphenol, as well as three derivatives of isomeric methyl esters from caffeoylquinic acid: 3,4-O-dicaffeoylquinic, 3,4-O-dicaffeoyl-epi-quinic and 3,5-O-dicaffeoyl-epi-quinic, as metabolites with antioxidant, analgesic and antiinflammatory activity in the extract of *C. urticifolia*.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Desde los inicios de la historia humana el dolor ha sido uno de los principales problemas de salud pública y los productos utilizados para remediarlo siguen siendo uno de los principales objetivos y metas de los laboratorios de investigación (Kuner, 2010). La IASP definió el dolor como “una experiencia sensitiva y emocional desagradable, asociada a una lesión tisular real o potencial”. La percepción del dolor consta de un sistema neuronal sensitivo (nociceptores) y unas vías nerviosas aferentes que responden a estímulos nociocceptivos tisulares. Generalmente, el proceso fisiológico del dolor se desencadena por un estímulo mecánico, térmico, químico o eléctrico (Scholz y Woolf, 2002). El dolor se puede clasificar en Nociceptivo Agudo (dolor agudo), Inflamatorio y Neuropático (Scholz y Woolf, 2002) y el dolor tipo crónico que puede ser el síntoma de una enfermedad, (e.g. Cáncer, VIH/SIDA) o considerarse como una enfermedad (Kumar, 2007, Kuner, 2010).

El dolor de tipo agudo, también denominado hiperalgesia o alodinia (Hua y Cabot, 2010), se caracteriza por la inflamación debido a la hipernocicepción y la sensibilización de las neuronas sensoriales primarias nociceptivas ($A\alpha$ y C nociceptores). El dolor inflamatorio se presenta cuando los mediadores químicos son liberados de las células dañadas e inflamatorias y directamente activan los nociceptores, lo que evoca el dolor. Otros nociceptores (e.g. Nociceptores C) actúan para producir una sensibilización del sistema nervioso somato sensorial, que es característica del dolor inflamatorio, lo que permite que sane el tejido (Scholz y Woolf, 2002).

La presencia de dolor y el proceso inflamatorio están íntimamente ligados. La sensación de dolor tiene una función fisiológica importante en la inflamación para alertar al organismo del estado anormal de los tejidos dañados. El proceso inflamatorio es un fenómeno dinámico, desencadenado por estímulos y condiciones nocivas como son las infecciones y los daños tisulares. La inflamación como tal es una respuesta benéfica del hospedero (e.g. para proporcionar protección contra una infección); sin embargo una prolongada inflamación deja de ser benéfica y puede contribuir a un estado patológico de diversas enfermedades. En general, el proceso inflamatorio se divide en cinco etapas: a) liberación de mediadores, b) efecto de los mediadores, c) arribo de moléculas y células

inmunes al foco inflamatorio, d) regulación del proceso inflamatorio y e) reparación de los tejidos dañados (Medzhitov, 2008).

El inicio del reconocimiento de la infección es mediada por macrófagos y mastocitos residentes en el tejido, conduciendo a la producción de una variedad de mediadores inflamatorios, incluyendo quimiocinas, citocinas, vasoactinas, eicosanoides y productos de las cascadas proteolíticas (Simon y Green, 2005). Estos mediadores contribuyen a los reconocidos signos médicos de la inflamación i.e. el calor, el enrojecimiento, la hinchazón, el dolor agudo y la eventual pérdida de la función del tejido (Lawrence *et al.*, 2002). Los neutrófilos son los primeros en llegar al sitio aquejado e intentan eliminar a los agentes invasores mediante la liberación de contenidos tóxicos de sus gránulos, los cuales incluyen ERO y ERN. Estos efectos altamente potentes no discriminan entre el agente infectante y el hospedero siendo el daño colateral en el hospedero, inevitable (Thomas, 2008).

Estudios recientes indican que las ERO y el estrés oxidativo están implicados en el dolor persistente (Schwartz *et al.*, 2009), incluyendo el dolor neuropático (Kim *et al.*, 2010; Yowtak *et al.*, 2012) y el dolor inflamatorio (Wang *et al.*, 2004; Ibi *et al.*, 2008). Asimismo, actualmente se reconoce que la administración de antioxidantes disminuye la inflamación (Deng *et al.*, 2011), contribuyendo en la atenuación de la respuesta al dolor tipo inflamatorio (Hacimuftuoglu *et al.*, 2006) y crónico (Kim *et al.*, 2004). Por esta razón, la búsqueda de antioxidantes se considera una prometedora alternativa para el tratamiento de la inflamación y el dolor.

En la respuesta inflamatoria se activa la formación de PG a partir del AA debido a la acción de la COX. Mientras que la COX-1 es expresada de manera constitutiva y está implicada en procesos protectores gástricos, renales, etc., (Katori y Majima, 2000; Chandrasekharan y Simmons, 2004), la COX-2 se activa selectivamente en respuesta a diversos estímulos inflamatorios. Se considera que la expresión de COX-2 desempeña un papel fundamental en la producción de PG y el TxA₂, productos implicados en la inflamación, el dolor y la fiebre. Estos mediadores químicos involucrados en la iniciación de la inflamación aguda se asume que son idénticos a los que participan en la inflamación crónica y en la fase de resolución de la inflamación (Serhan, 2007). La primera familia de mediadores reconocidos como anti-inflamatorios son las lipoxinas, generados a partir de AA. Las lipoxinas inhiben la liberación de los neutrófilos y promueven el reclutamiento de los monocitos, que eliminan las células muertas e inician la remodelación de tejidos.

Cuando se encuentran en los sitios de inflamación, las lipoxinas están temporalmente disociadas de otros mediadores pro-inflamatorios como las prostaglandinas y leucotrienos que se sintetizan en los primeros pasos de la respuesta inflamatoria aguda (Svensson *et al.*, 2007).

Actualmente la OMS estima que el 80% de la población de países en desarrollo basa el cuidado de su salud en la medicina tradicional; el 20% de la población restante usa, en más del 25% de los casos, fármacos derivados de productos naturales (Fabricant y Farnsworth, 2001); si además se considera de los 1,184 productos que se incorporaron al mercado en los últimos 30 años el 2 y 4% fueron utilizados para tratar problemas de inflamación y dolor, respectivamente (Calixto *et al.*, 2000, Newman y Cragg, 2012.), lo anterior demuestra la importancia de los productos naturales como una fuente comercial viable de fármacos.

Actualmente la exploración de productos naturales novedosos y con potencial para el desarrollo de nuevos fármacos se ha centrado en el estudio de especies vegetales ubicadas en las regiones ricas en biodiversidad. En México, con su extensa riqueza natural y cultural, menos del 2% de las plantas han sido estudiadas en cuanto a su producción de metabolitos bioactivos (Meckes *et al.*, 1993).

Los fitoquímicos bien conocidos por su actividad antioxidante que actúan como eliminadores de radicales incluyen flavonoides (Coballase-Urrutia *et al.*, 2010; Ferchichi *et al.*, 2012), ácidos fenólicos (Zheng y Wang, 2001; Siquet *et al.*, 2006), cumarinas (Kadhum *et al.*, 2011), taninos (Benjemia *et al.*, 2013), estilbenos (Avila *et al.*, 2013) y lignanos (Sun *et al.*, 2013). Los extractos de plantas y los metabolitos secundarios con actividad antioxidante también son reconocidos por su potencial como analgésicos, e.g, la actividad neuroprotectora de *Eucommia ulmoides* se ha relacionado con su capacidad para disminuir la producción de ERO (Kwon *et al.*, 2012); el extracto con actividad antioxidante de *Taxillus liquidambaricola* ha demostrado también actividad antinociceptiva y anti-inflamatoria (Deng *et al.*, 2011), mientras que miricitrina, una flavonol conocido por su actividad antioxidante, posee una actividad antinociceptiva pronunciada en modelos de dolor en ratones (Meotti *et al.*, 2006), y la combinación de antioxidantes como la vitamina C y la vitamina E muestra una eficacia antinociceptiva en el dolor inflamatorio y neuropático (Lu *et al.*, 2011).

En la Península de Yucatán, de las 2,500 plantas vasculares reportadas, cerca del 30% son utilizadas para tratar diversos problemas de salud; de éstas el 11% se emplean para

tratar el dolor (Méndez González *et al.*, 2011). Considerando la importancia de la información etnomédica de estas especies, la flora medicinal de la península de Yucatán representa una importante fuente de estudio para la búsqueda de productos naturales bioactivos, con potencial aplicación como analgésicos y antiinflamatorios.

1 ANTECEDENTES.

1.1 MECANISMOS DE LA INFLAMACIÓN DOLOROSA

El sistema nervioso central regula el sistema inmunológico. Las células del sistema inmunológico expresan receptores para hormonas provenientes de diversos ejes y para numerosos neurotransmisores y mediadores bioquímicos excitatorios (e.g. glutamato, sustancia P, factores de crecimiento) e inhibitorios (e.g. opioides, GABA y glicina).

A consecuencia de la lesión tisular, las células del sistema inmune liberan mediadores inflamatorios, incluyendo citocinas, quimiocinas, NGF y PG. Los mediadores inflamatorios también pueden contribuir a la destrucción celular o ser liberados a la circulación (e.g. bradicinina). Varios mediadores inflamatorios actúan de forma sinérgica con la acidificación de tejidos para aumentar la actividad de las neuronas aferentes primarias de la vía nociceptiva, bajando el umbral de los nociceptores para inducir y mantener la desarrollo del dolor e hiperalgesia (Hua y Cabot, 2010) (Figura 1.1 a).

La inflamación estimula rápidamente la extravasación de células inmunes y la migración hacia los tejidos lesionados. Durante las primeras etapas de la inflamación los granulocitos (en especial los neutrófilos) expresan un mayor contenido de opioides, mientras que en las últimas etapas de la inflamación éstos predominan en los monocitos o macrófagos, los linfocitos T y las células B (Rittner *et al.*, 2008). Las células inmunes tienen un papel claro en la analgesia periférica. Los linfocitos activados tienen una mayor expresión de péptidos opioides, sobre todo los que se encuentran en los tejidos lesionados, donde se segregan los opioides para reducir el dolor. Además la expresión de los péptidos opioides aumenta en GRD y en las células inmunes en las últimas etapas del proceso inflamatorio. La consecuencia de esta sobreexpresión del péptido opioide dentro del tejido inflamado es el alivio del dolor (Stein y Machelska, 2011), (Figura 1.1 b).

Entre los mediadores analgésicos endógenos que también se producen dentro del tejido inflamado para contrarrestar el dolor se encuentran los péptidos opioides, la SOM, los endocannabinoides y las citocinas antiinflamatorias (Coutaux *et al.*, 2005).

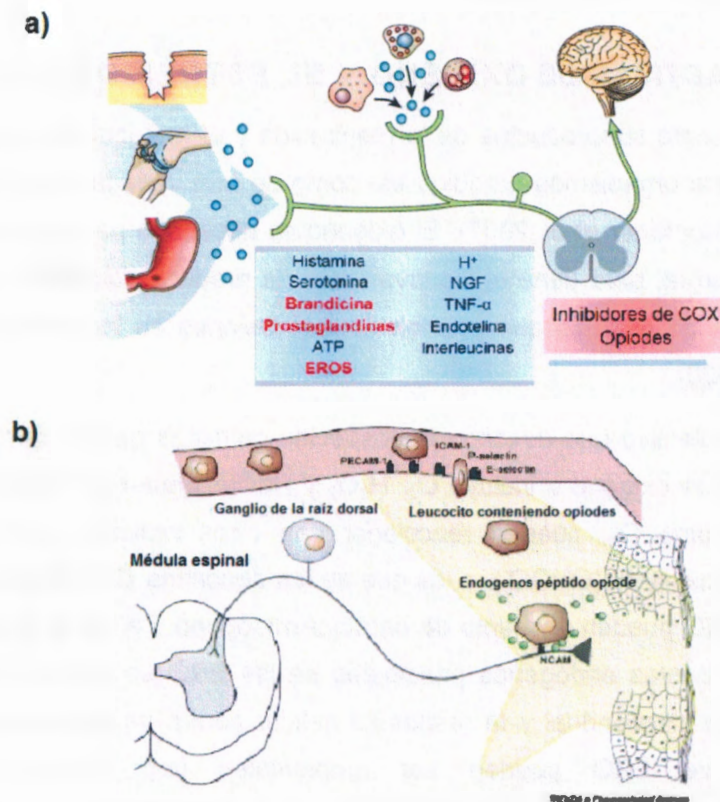


Figura 1.1 Mecanismos de inflamación y dolor.

(a) Las células de tejido dañadas, inflamatorias y tumorales, liberan mediadores químicos que crean una "sopa inflamatoria" que activa a los nociceptores. Esto, a su vez, establece los cambios en la capacidad de respuesta de las neuronas en el SNC (Modificado de Scholz y Clifford, 2002).
 b) En respuesta al estrés o agentes de liberación (e.g la CRF o IL-1), las células inmunes secretan péptidos opioides que se unen a los receptores opioides en neuronas aferentes primarias, lo que lleva a la analgesia. (Modificado de Hua *et al.*, 2010).

1.2 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y EL ESTRÉS OXIDATIVO

Las ERO se forman como subproductos de la respiración y el metabolismo oxidativo en todas las células de los organismos aerobios así como de una variedad de sistemas de enzimas citosólicas (Montaner *et al.*, 2007). El oxígeno es necesario para que las células aerobias generen energía, pero tiene el inconveniente de producir pequeñas cantidades de especies reactivas de oxígeno que pueden causar lesiones en las macromoléculas (Finkel y Holbrook, 2000).

ERO es un término colectivo que describe las especies químicas que se forman tras la reducción incompleta de oxígeno e incluye O_2 , H_2O_2 y $HO^\bullet$ (Autréaux y Toledano, 2007). Además las ERO, como O_2 , pueden reaccionar con otros radicales como el $ON^\bullet$, generando $NO_2^\bullet$ y peroxinitrito ($ONOO^\bullet$), a los que se les denomina ERN (Siomek, 2012). Las fuentes de las ERO pueden ser tanto de carácter endógeno, i.e. de la propia célula, como exógeno. Las fuentes endógenas principales de las ERO se generan durante el metabolismo oxidativo mitocondrial y la respuesta celular contra un agente nocivo. Las fuentes exógenas de ERO pueden ser ambientales (e.g. tabaco, radiación electromagnética, etc.), xenobióticos y nutricionales (e.g. contaminantes, aditivos, etc.) (Ray *et al.*, 2012; Salvemini *et al.*, 2011).

En la cadena respiratoria, la reducción monovalente de la molécula de oxígeno da lugar a la formación de la mayoría de las EROS. Sin embargo, el 95% del oxígeno que se respira es reducido a H_2O por la acción de la citocromo oxidasa-3, último eslabón de la cadena de transporte electrónico (Turrens, 2003).

El estrés oxidativo se refiere a las consecuencias citopatológicas del desequilibrio entre la producción de ERO y la capacidad de la célula para defenderse. Independientemente de cómo y dónde se generan, el aumento intracelular de los niveles de ERO tiene dos efectos potencialmente importantes: daños a los componentes celulares diferentes y activación de determinadas vías de señalización. Altas concentraciones de ERO pueden ser importantes mediadores de daño a las estructuras celulares, ácidos nucleicos, lípidos y proteínas. El oxhidrilo radical se sabe que reacciona con todos los componentes de la molécula de ADN, dañando tanto las bases de purina y pirimidina como la desoxirribosa (Wiseman y Halliwell, 1996; Montaner *et al.*, 2007). La modificación permanente del material genético resultante a partir de estos "incidentes" representa el primer paso en la

mutagénesis, carcinogénesis y el envejecimiento. Además de las modificaciones del ADN causado directamente por ERO y ERN, las bases de ADN puede ser modificadas por la peroxidación lipídica [productos tales como trans-4-hidroxi-2-nonenal (HNE), 4-hidroperoxi-2-nonenal (HPNE)] para formar diversos aductos exocíclicos, incluyendo malondialdehído. Los lípidos son probablemente las biomoléculas más susceptibles al ataque de los radicales libres (ERO/ERN), en especial los lípidos poliinsaturados de las membranas, causando la pérdida de fluidez y la lisis celular como consecuencia de la peroxidación lipídica (Bartsch y Nair, 2006).

En relación a los mecanismos implicados en la oxidación de las proteínas por ERO, las cadenas laterales de todos los aminoácidos, en particular la cisteína en las proteínas y los nueve residuos de proteínas metionina, son susceptibles a la oxidación por la acción de ERO/ERN. La oxidación de residuos de cisteína puede conducir a la formación de disulfuros mixtos entre grupos tiol (-SH) de proteínas y tioles de bajo peso molecular, en particular GSH (S-glutathiolation) (Valko *et al.*, 2007). Aunque los debates anteriores se han centrado principalmente en la generación endógena de ERO como consecuencia de actividades metabólicas de las enfermedades, muchos estímulos ambientales como las citosinas, radiación UV, los agentes quimioterapéuticos e incluso factores de crecimiento, generan altos niveles de ERO que pueden perturbar el balance oxidación/células normales y cambiar a un estado de estrés oxidativo (Montaner *et al.*, 2007).

En condiciones normales, los efectos de los ERO son contrarrestados por una variedad de mecanismos antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos (Valko *et al.*, 2007). El estrés oxidativo se considera que es el resultado de un desequilibrio de dos fuerzas opuestas y antagónicas: ERO y antioxidantes, en el que los efectos de ERO son mayores que la capacidad compensadora de antioxidantes (Finkel y Holbrook, 2000). Sin embargo, debido a los efectos a largo plazo del desequilibrio químico oxidativo en estados normales y de enfermedad, a menudo las ERO son consideradas los culpables de los efectos devastadores del estrés oxidativo. Las ERO también están relacionadas con las enfermedades cardíacas, la artritis, la diabetes (Valko *et al.*, 2007) y la etiología de los trastornos neurodegenerativos (Koppula *et al.*, 2012), así como del proceso inflamatorio (Kobayashi *et al.*, 2003; Papaharalambus y Griendling, 2008; Balázs *et al.*, 2011) y el dolor (Schwartz *et al.*, 2009; Ibi *et al.*, 2008; Yowtak *et al.*, 2012).

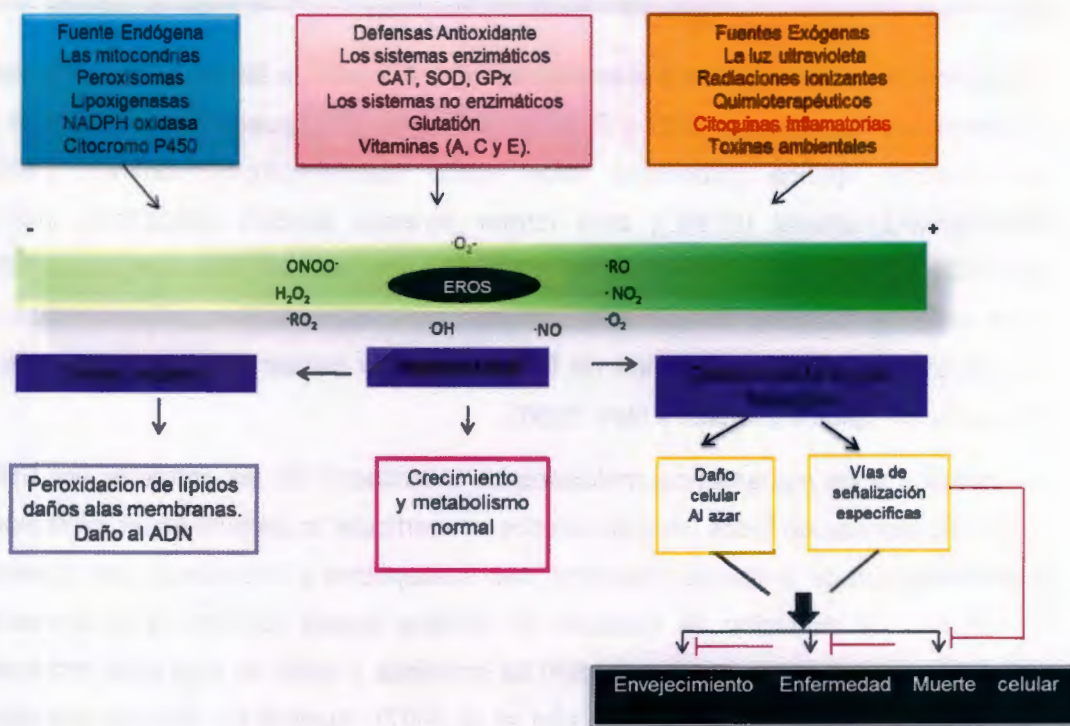


Figura 1.2 Las fuentes y las respuestas celulares a las ERO.

Los oxidantes se generan como resultado del metabolismo intracelular de las mitocondrias y los peroxisomas, así como de una variedad de sistemas de enzimas citosólicas, aunado a esto un número de agentes externos pueden desencadenar la producción de ERO. Sofisticados sistemas de defensa antioxidante enzimática y no enzimática, incluyendo CAT, SOD y GPx, contrarrestan y regulan los niveles de ERO para mantener la homeostasis fisiológica. La reducción de los niveles de ERO por debajo del punto de ajuste homeostático puede interrumpir el papel fisiológico de oxidantes en la proliferación celular y la defensa del huésped. De manera similar, el aumento de ERO también puede ser perjudicial y conducir a la muerte celular o de una aceleración en el envejecimiento.

1.3 PARTICIPACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN EL PROCESO NOCICEPTIVO

La lesión tisular puede estimular dolor a través de mecanismos que inducen inicialmente hiperalgesia y posteriormente alodinia. Los estados de dolor son, por tanto, el resultado de cambios patológicos en el sitio de la lesión y de alteraciones en las neuronas sensoriales y espinales de terminales nerviosas aledañas al sitio de lesión, que pueden ocasionar estados de hipersensibilidad agudos o crónicos luego de la lesión tisular inicial. Estudios recientes indican que las ERO y el estrés oxidativo están implicados en el dolor persistente/crónico (Schwartz *et al.*, 2009), el neuropático (Kim *et al.*, 2010; Yowtak *et al.*, 2012) y el dolor inflamatorio (Wang *et al.*, 2004; Ibi *et al.*, 2008). El dolor inflamatorio es un problema clínico importante en muchos trastornos, incluyendo artritis (Mirshafiey y Mohsenzadegan, 2008; Simmonds y Foxwell, 2008). El dolor inflamatorio se caracteriza

por el aumento de sensibilidad a los estímulos mecánicos o térmicos del tejido afectado (Ren y Dubner, 2010).

En este contexto, los resultados clínicos y experimentales sugieren que el NO probablemente no tiene una participación importante como mediador de dolor, bajo condiciones fisiológicas de producción endotelial o neuronal por acción de las NO constitutivas. Sin embargo, en situaciones de lesión tisular, luego de algunas horas de ocurrida la misma, se induce expresión de la enzima calcio independiente, que lleva a producción prolongada de grandes cantidades de NO en diferentes células (macrófagos, neuronas, endotelio, células musculares lisas y estriadas, etc.), la sobreproducción de NO pasa a tener un importante papel en la hiperalgesia inducida por la propia lesión tisular así como por estímulos químicos. Es en esta última situación en que los inhibidores de la síntesis de NO suprimen la hiperalgesia resultante de la lesión tisular o del estímulo químico. En apoyo de esta propuesta se ha demostrado que las concentraciones de las ONS aumentan notablemente en diferentes modelos animales de dolor vía L-arginina en la modulación del dolor, específicamente en la analgesia periférica y central. Se ha establecido que la acetilcolina, sustancia que estimula la liberación de NO constitutivo, antagoniza la hiperalgesia inducida por PGE2 en ratas (Salvemini *et al.*, 2011). Estos resultados sugieren que las ERO y NO contribuyen al retraso de la recuperación de nervios lesionados en ratas y al mantenimiento de la hiperalgesia (Khalil y Khodr, 2001), tanto que el superóxido aumenta la percepción de los estímulos dolorosos (Schwartz *et al.*, 2009). En combinación, el peroxinitrito y el superóxido conducen al desarrollo de la sensibilización central (Salvemini *et al.*, 2011).

1.4 PARTICIPACIÓN DE LAS ERO EN EL PROCESO INFLAMATORIO

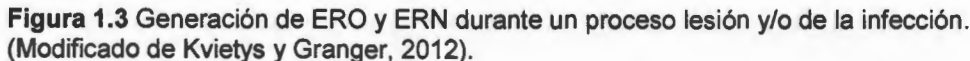
La severidad y la duración de la inflamación, el tipo y la concentración de las citocinas liberadas asociadas a la lesión tisular, pueden llevar a expresión de la iNOS y la producción de grandes cantidades de NO que, en condiciones de estrés oxidativo, ocasionan una mayor formación de ONOO⁻ los cuales actúan perpetuando la lesión (Spooner y Yilmaz 2011). Los macrófagos y neutrófilos reconocen componentes que dan como resultado la activación de la NADPH oxidasa (NOX), que genera ERO (superóxido y su producto de dismutación de H₂O₂; línea roja en la Figura 1.2). Las ERO puede ser exportadas hacia el intersticio celular para afectar células endoteliales adyacentes y/o activar más de NOX (e.g a través de una ruta de NF-κB) que conduce a la generación de

ERO adicionales. Las ERO también pueden funcionar como segundos mensajeros involucrados en la activación del factor de necrosis tumoral NF- κ B (Siomek, 2012; Klaunig y Kamendulis, 2004). La activación de NF- κ B puede también aumentar los niveles de iNOS, lo que resulta en la generación de NO (línea azul en la Figura 1.3), la inducción de mediadores inflamatorios (quimicinas y citocinas) y la expresión de citocinas inflamatorias (TNF, IL-1, IL-6, IL-8), CAM y otras moléculas que son iniciadores o potenciadores del proceso inflamatorio (Siomek, 2012). La combinación del O_2 con el NO da lugar a la formación del $ONOO^-$, capaz de inducir peroxidación lipídica en las lipoproteínas (Figura 1.3) (Ray *et al.*, 2012; Salvemini *et al.*, 2011).

En el desarrollo de la respuesta inflamatoria, los macrófagos residentes y las células migratorias tienen un papel amplificador pues son fuente de ON , los aniones O_2^- y $ONOO^-$. La sensibilización de los receptores del dolor es un mecanismo común a todos los tipos de dolor inflamatorio y que clínicamente se manifiestan por hiperalgesia. En estas condiciones, el NO tiene un papel pro-nociceptivo (López-Jaramillo, 2001).

Por otro lado los neutrófilos, al fagocitar bacterias o partículas extrañas, producen grandes cantidades de ERO (O_2 , $HO^\cdot$ y H_2O_2) y aumentan la expresión de la fosfolipasa A2, 5-lipoxigenasa (5-LOX), la COX-2 y de iNOS (Okamoto *et al.*, 2004). El H_2O_2 , el $O_2^{\cdot -}$, $HO^\cdot$ y ON han sido implicados en perpetuar la lesión tisular y, por consecuencia, en una mayor respuesta nociceptiva (Khalil y Khodr, 2001).

Dado que la expresión y la actividad de iNOS y COX-2 se asocia con inflamación dolorosa, se ha propuesto que la inhibición de ambos podría proporcionar un efecto antinociceptivo más potente (Dudhgaonkar *et al.*, 2006).



Como se ha mencionado, los altos niveles de ERO dañan las células y están relacionados con distintas patologías, e.g. la carcinogénesis, los desórdenes neurodegenerativos y las inflamaciones crónicas. Desde el punto de vista biológico, un antioxidante se define como un producto que en concentraciones bajas respecto a las de un sustrato oxidable, puede retrasar o evitar su oxidación (Procházková, *et al.*, 2011). En los organismos aerobios, la producción de ERO es contrarrestada por sofisticados sistemas de defensa antioxidante enzimática (endógena) y no enzimática (no endógena) (Valko *et al.*, 2007). En el sistema endógeno se encuentran la CAT, SOD y GPx (Sorg, 2004) (Figura 1.1), estas enzimas son controladas por ARE (Hur *et al.*, 2010), también involucrado en la expresión de genes inflamatorios (Chen *et al.*, 2006).

Entre los antioxidantes no enzimáticos, el ácido ascórbico puede neutralizar ERO, e. g. radicales oxhidrilo ($\cdot\text{OH}$), superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), de forma directa; sin embargo también puede reparar moléculas orgánicas oxidadas como el alfa-tocoferol o la vitamina E. La forma oxidada del ascorbato, el radical monodeshidroascorbato, es una

molécula muy estable y se puede desproporcionar espontáneamente regenerando el ascorbato y el dideshidroascorbato. Este último se descompone en ácido oxálico y ácido treónico o es reabsorbido y reducido por la glutarredoxina y el glutatión. (Figura 1.4 a). El ascorbato puede regenerarse fácilmente por la acción de reductasas específicas y con ayuda de otras moléculas como el NADH, el NADPH o el GSH en el denominado ciclo Ascorbato-Glutatión (ASC-GSH) (Foyer y Noctor, 2011).

El α -tocoferol, en presencia de un radical (lipídico), forma el radical tocoferilo que se puede reducir con ascorbato (Figura 1.4 b), en tanto que el β -caroteno, a través de una dioxigenasa, genera dos moléculas de retinal que es reducido por la retinaldehído reductasa y posteriormente el retinol debe ser oxidado hasta componer la forma activa del ácido retinoico (Figura 1.4 c).

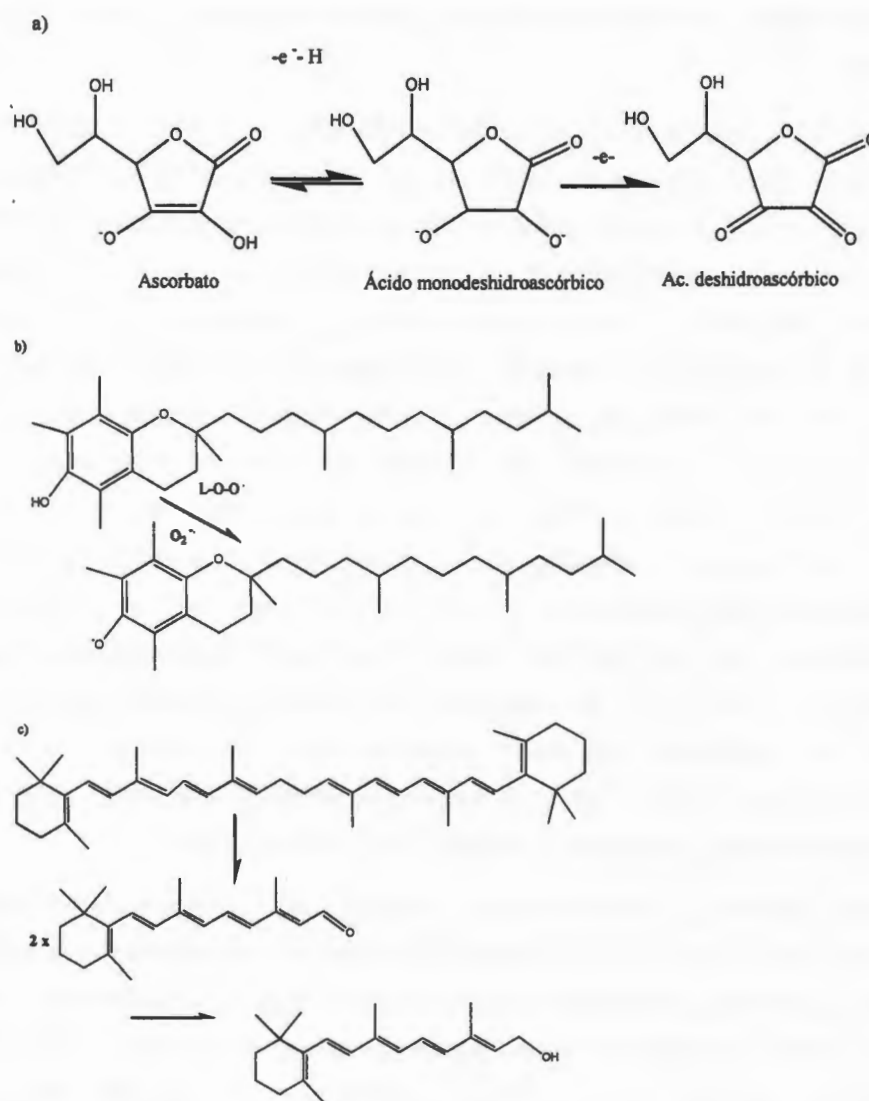


Figura 1.4 Principales antioxidantes no enzimáticos.

a) El ascorbato (vitamina C) b) α -tocoferol (vitamina E) y c) el β -caroteno.

Recientemente en la búsqueda de nuevos antioxidantes ha aumentado el interés por estudiar las plantas utilizadas en las prácticas de medicina tradicional, con el fin de obtener de ellas productos naturales con propiedades antioxidantes.

1.6 ANALGÉSICOS

El control del dolor ha sido un objetivo importante de la farmacoterapia. Diversos productos derivados de plantas se han utilizado para aliviar el dolor durante miles de años, los ejemplos más notables son los salicilatos, derivados de la familia de *Salix*,

(Calixto *et al.*,2000) y los opiáceos, morfina y codeína, aislados de *Papaver somniferum* (Butler, 2004).

Los fármacos para aliviar el dolor se pueden clasificaren dos grupos principales: AINE y los fármacos opioides. Los AINE constituyen uno de los grupos de medicamentos más prescritos (Figura 1.5); la amplia utilización de este grupo de fármacos se debe a que comparten en variable proporción sus efectos antiinflamatorio, analgésico, antipirético y antiagregante plaquetario. El primer grupo inhibe la síntesis de PG a través de la inhibición de la enzima COX, mientras que el mecanismo de acción de los opioides consiste en activar los receptores opioides. Los AINE inhiben la enzima COX que cataliza la conversión de AA para generarlas PG. Existen dos isoformas de la enzima COX: la COX-1 y la COX-2, donde la COX-1 se expresa constitutivamente y la COX-2 está presente en niveles bajos en condiciones fisiológicas, pero es rápidamente inducida por diversos estímulos (Chandrasekharan y Simmons, 2004). Los AINE se pueden clasificar como no selectivo de la enzima COX (COX-1/2, e.g. ácido acetil salicílico, naproxeno), preferencial de la COX-2 (e.g. el meloxicam, nimesulida) y selectivo de la COX-2 (e.g. inhibidores de celecoxib, rofecoxib) (Satyanarayana *et al.*,2004). Los efectos gastrointestinales son debidos en gran parte a la inhibición de COX-1 que regula la actividad estomacal en condiciones normales (Vane y Botting, 1998).

La analgesia opioide se puede producir en el SNC y SNP a través de la activación de receptores opioide, exógenos o endógenos. Estos efectos analgésicos son especialmente prominentes en el dolor inflamatorio. En las primeras etapas de la inflamación, receptores de opioides, tanto periféricos como centrales, están involucrados en los efectos antinociceptivos, mientras que en etapas posteriores la analgesia está mediada exclusivamente por opioides periféricos receptores (Hua y Cabot, 2010). La administración de analgésicos opiáceos se asocia con efectos secundarios clásicos de drogas opiáceas tales como la de presión respiratoria, la sedación, estreñimiento y la depresión del sistema inmune celular (disminución de la resistencia a la infección bacteriana) (Ramsin *et al.*,2008).

Diversos estudios han demostrado que los metabolitos con actividad antioxidante disminuyen el dolor (Meotti *et al.*,2006; Lu *et al.*,2011) y la inflamación (Deng *et al.*,2011). Los antioxidantes fenil-N-tert-butilnitrona (PBN), 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxi (TEMPOL) y N-acetil-L-cisteína presentan analgesia contra el dolor de tipo agudo (fase I) y en el dolor inflamatorio (fase II), en el modelo de dolor inducido por formalina

(Hacimuftuoglu *et al.*,2006). Adicionalmente el antioxidante PBN presentó analgesia en el dolor tipo crónico (Kim *et al.*,2004). También se ha reportado que la combinación de las vitaminas C y E tienen un efecto sinérgico en la primera fase de analgesia en modelos de dolor inducido por formalina y en el dolor de tipo neuropático, después de la lesión del nervio periférico (Lu *et al.*,2011). Por lo que el interés por búsqueda de nuevos antioxidantes ha aumentado considerablemente al demostrarse su potencial como analgésicos y antiinflamatorios.

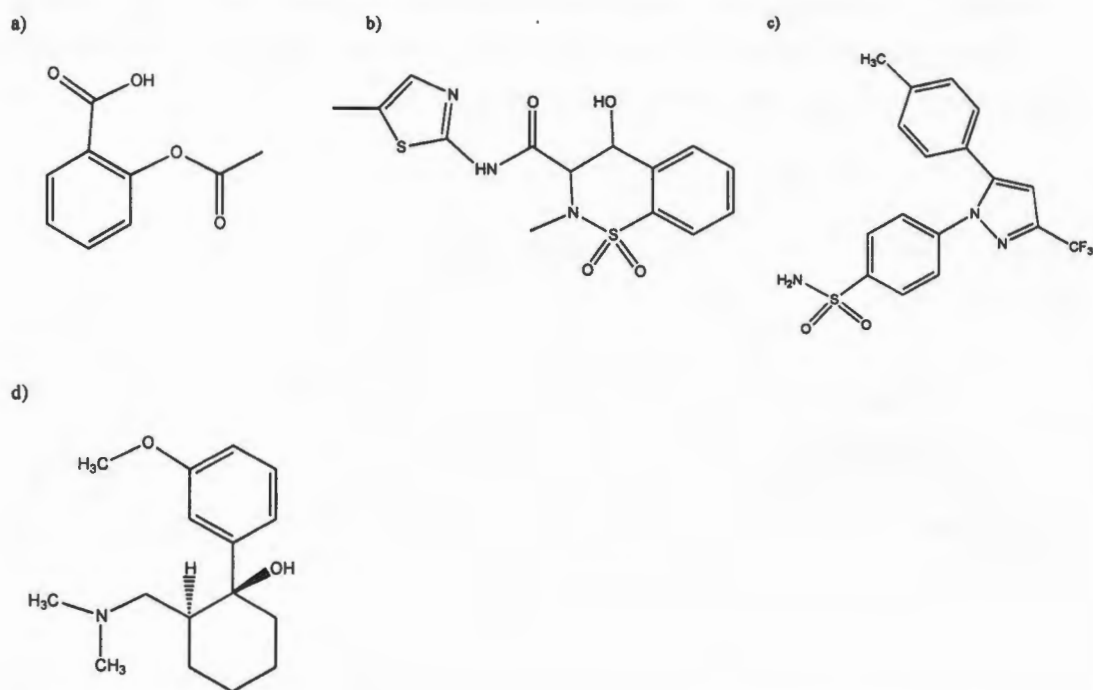


Figura 1.5 Analgésicos comúnmente utilizados.

AINEs: a) Ácido acetil salicílico, b) Meloxicam ®, c) Celecoxib ®; opiáceos: d) tramadol.

1.7 ANTIINFLAMATORIOS

Los AINEs son fármacos antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos que constituyen un grupo heterogéneo de productos, con frecuencia no relacionados químicamente, que comparten ciertas acciones terapéuticas y efectos colaterales. Como se mencionó en la sección anterior, uno de los mecanismos de acción antiinflamatorios es la inhibición de la

enzima COX que resulta crítica en la formación de las prostaglandinas (Steinmeyer *et al.*, 2000).

Los antiinflamatorios esteroideos o glucocorticoides son fármacos antiinflamatorios, antialérgicos e inmunosupresores derivados del cortisol o hidrocortisona, hormona producida por la corteza adrenal. Los glucocorticoides ejercen su acción inmunosupresora y antiinflamatoria principalmente mediante la inhibición de la expresión de los genes de interleucina-2 (IL-2) y otros mediadores. También inducen la síntesis de dos proteínas que afectan la traducción de señales, como son la con la familia de cremallera de leucinas inducida por glucocorticoides, la que inhibe el factor NF- κ B y AP-1 (De Bosscher *et al.*, 2010). Entre los fármacos de tipo glucocorticoides se encuentran la dexametasona, prednisona, cortisona, (Figura 1.6) (Biju *et al.*, 2011).

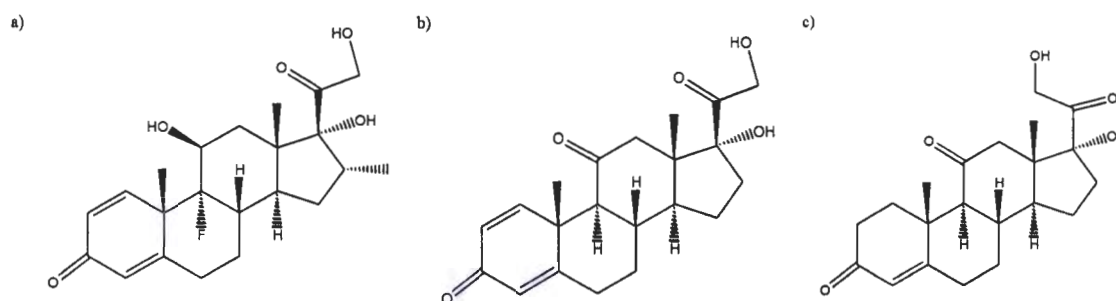


Figura 1.6 Antiinflamatorios esteroideos comúnmente utilizados.

a) Dexametasona, b) Prednisona c) Cortisona

1.8 MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS PARA EL DOLOR E INFLAMACIÓN

La búsqueda de tratamientos farmacológicos para remediar el dolor sigue siendo uno de los principales objetivos y metas de los laboratorios de investigación. El desarrollo de los modelos animales de dolor han permitido la investigación de nuevos fármacos para tratar el dolor e inflamación. Debido a la complejidad del dolor en el ser humano, es muy difícil elaborar un modelo que pueda valorar sus diferentes aspectos. Por ello, los modelos suelen estudiar aspectos concretos y muy específicos en una gran variedad de condiciones experimentales.

En los modelos animales de dolor agudo se encuentran aquellos que utilizan un estímulo físico o químico y que tienen como objetivo determinar una latencia de respuesta por parte del animal ante dicho estímulo y tienen un desarrollo temporal breve. Entre estos modelos están las evaluaciones (test) de la placa caliente (hot plate test), el de retirada de la cola (tail flick test) y el de inmersión de la cola en agua caliente (tail immersion test), que usan un estímulo térmico; el test de presión de la pata (paw pressure test) o de la cola (tail pressure test) en la rata, que usan un estímulo mecánico; el test de estimulación eléctrica de la cola (electric stimulation of the tail), que usa un estímulo eléctrico; el test del ácido acético (abdominal constriction test) y el test de la formalina (formalin test) (valoración de la primera fase), que usan un estímulo químico (Le Bars *et al.*, 2001).

En los modelos inflamatorios es necesario utilizar los modelos agudos, sobre todo térmicos y mecánicos, para determinar las alteraciones del umbral nociceptivo que se producen en las zonas inflamadas. Así, se utilizan los modelos térmicos para detectar la presencia de hiperalgesia o alodinia térmicas, sólo que cambiando la intensidad del estímulo. La primera se caracteriza por una respuesta nociceptiva exagerada ante un estímulo nocivo y la segunda por una respuesta nociceptiva ante un estímulo inocuo (Ortega *et al.*, 2002).

Se ha demostrado que la carragenina produce un edema en la pata de las ratas y ratones, al provocar la migración de células inflamatorias que marcan un tipo de alteración nociceptiva. Diversos estudios han demostrado que el edema inducido por carragenina está asociado con la producción de mediadores inflamatorios como son la histamina, las prostaglandinas, ON y citocinas. En ratones, la inyección de carragenina intraplantar produce una respuesta peculiar que posee un perfil bifásico, con picos a las 6 y 72 h. Recientemente se ha demostrado que la respuesta inflamatoria provocada por la carragenina está asociada con la producción de prostaglandinas, NO, anión superóxido (Posadas *et al.*, 2004), así como la presencia de TNF- α implicado en la migración neutrofílica y la producción de ERO (Rocha *et al.*, 2006).

Entre los modelos de inflamación localizada se encuentra el test de la formalina, que está entre los modelos agudos y los crónicos. En este test, la primera fase refleja un dolor nociceptivo debido a la irritación química de la formalina subcutánea; en su segunda fase refleja un dolor de origen inflamatorio (Capone y Aloisi, 2004). La primera fase (0-5 min), a su vez, se puede atribuir a un efecto directo algogénico del formolina en los nociceptores, (neuronas nociceptivas); se ha demostrado que la sustancia P y la bradicinina participan

en esta primera fase. La última fase (15-45 min) de la liberación de mediadores inflamatorios locales como serotonina, histamina, bradicinina y las prostaglandinas responsables de la sensibilización de percepción primaria del dolor ocurre por medio de la activación de neuronas centrales en la medula espinal (Hunnskaar y Hole, 1987). En ambas fases son los receptores de histamina H1 y H3 los responsables de la sensibilidad nociceptiva (Tjølsen *et al.*, 1992; Corrêa y Calixto, 1993). Los medicamentos que actúan principalmente sobre el sistema nervioso central inhiben las dos fases, mientras que los que inhiben solo la última fase son considerados de acción periférica (Corrêa y Calixto, 1993). Por esta razón se recomienda usar controles positivos como fármacos de tipo opioide, e.g la morfina, que logren inhibir ambas fases y otros de tipo AINEs, como el ASA, que inhiba solamente la segunda fase de este ensayo (Choi, *et al.*, 2001).

Estos ensayos de estimulación química tienen la ventaja de que producen una serie de signos que son contabilizables y representan una medida del dolor que puede ser aliviado por la acción de los analgésicos. Uno de los inconvenientes técnicos es que tienen un periodo de observación amplio y que la estimulación química provoca una conducta aprendida en el ratón; este hecho hace que los animales tengan que ser sacrificados inmediatamente tras la realización del test (Ortega *et al.*, 2002).

1.9 MÉTODOS EMPLEADOS PARA DETECTAR ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Existen numerosos métodos para evaluar la actividad antioxidante *in vitro* de extractos crudos y metabolitos secundarios puros. Una de las estrategias más aplicadas consiste en determinar la actividad del antioxidante de un extracto orgánico o un metabolito frente a un componente cromógeno de naturaleza radical, observando la pérdida de color que ocurre de forma proporcional con la concentración de actividad antioxidante.

Entre los diversos agentes cromógenos que se utilizan para evaluar la actividad antioxidantes están el ABTS, el DPPH y el FRAP, que determinan la capacidad de los productos para reducir radicales libres, actuando así en contra los efectos perjudiciales de los procesos de oxidación que implican las ERO.

Los requisitos que debe presentar cualquier método para evaluar la actividad antioxidante *in vitro* son: fácil de interpretar, rápido, con un mecanismo químico, adaptable a ensayos con antioxidantes de tipo hidrofílicos y lipofílicos, y compatible con diferentes fuentes generadoras de radicales. Otras características importantes son: a) un rango analítico

apropiado, b) reproducibilidad y c) reconocimiento de productos que puedan interferir en el análisis (Prior *et al.*,2005). Los distintos métodos difieren en el agente oxidante, en el sustrato empleado, en la medida del punto final, en la técnica instrumental utilizada y en las posibles interacciones de la muestra con el medio de reacción (Zheng y Wang, 2001; Thaipong *et al.*,2006) (Cuadro 1).

Cuadro 1.1 Métodos empleados para detectar actividad antioxidante

Método	Principio	Ventajas	Desventajas	Referencia
ABTS	Cuantificación de la decoloración del radical ABTS ^{•+} , debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones.	Rápido Confiable	Se debe monitorear la reacción durante un mayor tiempo puesto que algunos polifenoles reaccionan lentamente.	(Arumugam <i>et al.</i> ,2006)
DPPH	Reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) en la 2,2-difenil-1-picril hidrazina por la acción antioxidante.	Rápido Económico Confiable	Interferencia con pigmentos fotosintéticos de las muestras.	(Brand-Williams, <i>et al.</i> ,1995)
FRAP	Determinación de la capacidad de la muestra de reducir el hierro de su forma férrica a su forma ferrosa.	Rápido Económico Confiable	Se debe monitorear la reacción durante un mayor tiempo.	(Benzie y Strain, 1996)
ORAC	Capacidad captadora de los radicales peroxilo.	Sensible Reproducible	interacción entre la especie que genera los radicales y los compuestos antioxidantes de la muestra	(Huang <i>et al.</i> ,2002)

Uno de los métodos más ampliamente empleados por su versatilidad es el método de reducción del radical DPPH. La molécula de DPPH se caracteriza por ser un radical libre y estable en virtud de la deslocalización del electrón, de modo que las moléculas no se dimerizan (Figura 1.7a). El fundamento de este método consiste en determinar la capacidad de un producto en la muestra para reducir el radical libre del DPPH (Brand-Williams *et al.*,1995). La reducción de DPPH es seguida por el monitoreo de la disminución de su absorbancia. Los resultados suelen ser expresados como porcentaje de decoloración de DPPH (Figura 1.7b).

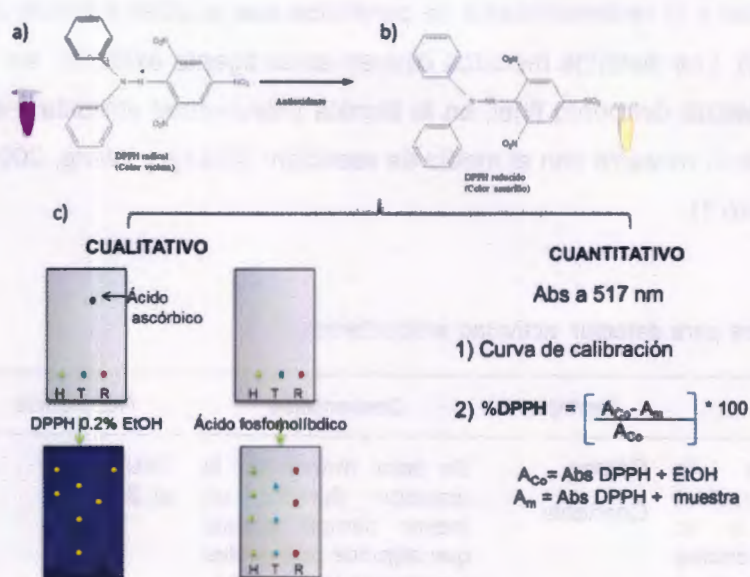


Figura 1.7 Ensayo de actividad antioxidante por reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).

Fundamento del ensayo de DPPH a) DPPH radical libre, b) DPPH reducido y c) Ensayo cualitativo y cuantitativo del DPPH (Tomado y modificado de Molyneux *et al.*, 2004).

1.10 PRODUCTOS NATURALES CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, ANALGÉSICA Y ANTIINFLAMATORIA.

La diversidad estructural de los metabolitos que han sido analizados como antioxidantes es considerable y prácticamente todas las familias de productos naturales aislados de plantas conocidos tienen representantes en esa lista; incluso se ha propuesto hacer modificaciones estructurales a algunos de éstos para usarlos como antioxidantes multipotentes y para enfermedades específicas (Zhang, *et al.*, 2006). Los fitoquímicos bien conocidos por su actividad antioxidante que actúan como eliminadores de radicales y/o quelantes de metales incluyen flavonoides (Coballase-Urrutia *et al.*, 2010; Tanaka *et al.*, 2010), ácidos fenólicos (Zheng y Wang, 2001; Siquet *et al.*, 2006), cumarinas (Korotkova *et al.*, 2003), taninos (Benjemia *et al.*, 2013), estilbenos (Keshewani *et al.*, 2013) y lignanos (Sun *et al.*, 2013).

Entre los metabolitos con actividad antioxidante que también presentan actividad analgésica y antiinflamatoria se encuentran la mircitrina (Figura 1.8a), un flavonoide que posee una pronunciada actividad nociceptiva en el ensayo de dolor inducido por ácido acético y en el dolor neurogénico inducido por capsicina, glutamato y brandicinina (Meotti

et al.,2006), el ácido elágico (Figura 1.8b), un polifenol que, lo mismo que sus derivados mono-y di-metilado aislados de *Caesalpinia paraguariensis*, demostraron actividad antioxidante en el ensayo de DPPH y actividad antiinflamatoria (Sgariglia *et al.*,2013), la queleritrina (Figura 1.8 c), un alcaloide aislado de *Fumaria spp.* que ha demostrado actividad anti-inflamatoria y analgésica en los ensayos de edema inducido por formaldehído y anti-nociceptiva en el ensayo de contorsiones inducidas por ácido acético y que inhibe la expresión de la proteína de la prostaglandina H sintetasa (COX-2) (Niu *et al.*,2011), y la cucurbitacina E, aislada de *Citrullus lanatus* var. citroides, que demostró actividad antiinflamatoria en ensayos de edema provocado por carragenina en ratas, inhibiendo la COX-2 y ERN, pero no ERO (Abdelwahab *et al.*,2011). Asimismo, del extracto de la resina de *Commiphora erythraea* se aislaron furanosesquiterpenoides que, además de presentar actividad antioxidante en el ensayo de DPPH, también presentaron actividad anti-inflamatoria en el modelo de edema de oreja inducido por aceite de Croton (Fraternale *et al.*,2011).

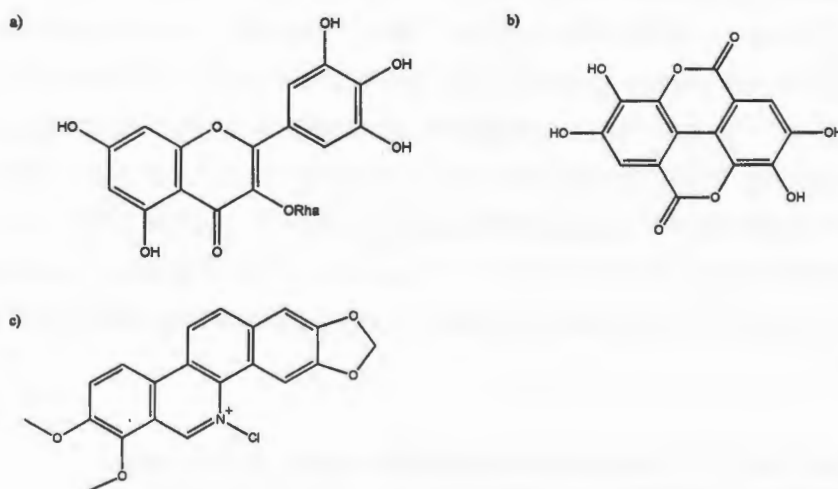


Figura 1.8 Metabolitos con actividad antioxidante, analgésica y antiinflamatoria.
a) Mircitrina, b) Ácido elágico y c) Queleritrina, Rha= ramnosa.

1.11 LA IMPORTANCIA DE LAS PLANTAS MEDICINALES Y LOS PRODUCTOS NATURALES

Actualmente la OMS estima que el 80% de la población de países en desarrollo basa el cuidado de su salud en la medicina tradicional; el 20% restante de la población usa, en más del 25% de los casos, fármacos que han sido derivados de productos naturales (Fabricant y Farnsworth, 2001). En los últimos 30 años, de los 1,184 productos que se incorporaron al mercado como nuevos fármacos, el 5% correspondió a productos naturales, con estructuras novedosas, el 23% se obtuvo como derivados de los mismos, un 10% correspondió a nuevas moléculas modeladas a partir de productos naturales y el 4% a moléculas de productos naturales obtenidos por síntesis química. De estos fármacos el 2-4% fueron desarrollados para tratar los problemas de inflamación y dolor (Newman y Cragg, 2012); lo anterior indica que los productos naturales representan una alternativa importante para el desarrollo de nuevos fármacos analgésicos y antiinflamatorios.

La exploración de productos naturales novedosos y con potencial para el desarrollo de nuevos fármacos se ha centrado en el estudio de especies vegetales ubicadas en las regiones ricas en biodiversidad y en el uso de la información etnobotánica de las diversas especies en estas regiones. Sin embargo, se ha reportado que, hasta ahora, de las 300,000 especies de plantas superiores que se estima existen en el planeta, únicamente entre el 10 y el 15% han sido investigadas en cuanto a su producción de metabolitos bioactivos (Harvey, 2000). En México, con su extensa riqueza natural y cultural, menos del 2% de las plantas han sido estudiadas en cuanto a su producción de metabolitos bioactivos (Meckes *et al.*, 1993). Con base a lo anterior, el aislamiento y la identificación de metabolitos bioactivos de plantas mexicanas podría contribuir a resolver problemas de salud pública.

1.12 FLORA NATIVA CON PROPIEDADES ANALGÉSICAS Y ANTIINFLAMATORIAS DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN

En la Península de Yucatán, de las 2,500 plantas vasculares reportadas, cerca del 30% se utilizan en medicina tradicional y de éstas, el 11% se utilizan para aliviar el dolor (Méndez González *et al.*, 2011).

Dada la diversidad y la riqueza en la información sobre plantas nativas de la península de Yucatán utilizadas en la medicina tradicional para aliviar diversas enfermedades y

padecimientos, se ha investigado la actividad biológica y los metabolitos bioactivos de los extractos de las raíces de *Colubrina greggii* (actividad antiinflamatoria, citotóxica y anti-VIH), *Lonchocarpus xuul* (analgésica y antiinflamatoria) y *Serjania yucatánensis* (citotóxica y antiprotozoaria), además de los extractos de hojas de *Urechites andrieuxii* (antitiinflamatoria y anti-VIH), *Byrsonima bucidaefolia* (antioxidante y citotóxica) y *Bourreria pulcra* (citotóxica), y los extractos de tallo y hojas de *Bakeridesia gaumeri* (citotóxica). Entre las especies utilizadas en la medicina tradicional Yucateca por sus propiedades analgésicas y anti-inflamatorias se encuentran *Acmella pilosa* R. K. Cansen (Asteraceae), *Calea urticifolia* (Miller) DC (Asteraceae), *Cnidoscolus souzæ* Mcvaugh (Euphorbiaceae), *Critonia aromatisans* (DC.) R.M. King y H. Rob. Syn. *Eupatorium hemipteropodum* Rob. (Asteraceae), y *Scutellaria gaumeri* Leonard. (Lamiaceae). Con base a lo anteriormente expuesto, y tomando en cuenta su uso tradicional, las especies *Acmella pilosa*, *Calea urticifolia*, *Cnidoscolus souzæ*, *Critonia aromatisans* y *Scutellaria gaumeri*, representan una alternativa prometedora para el aislamiento e identificación de metabolitos con actividad analgésica y/o antiinflamatoria.

1.13 INFORMACIÓN ETNOMÉDICA, FARMACOLÓGICA Y FITOQUÍMICA DE *Acmella pilosa*, *Calea urticifolia*, *Cnidoscolus souzæ*, *Critonia aromatisans* y *Scutellaria gaumeri*

1.13.1 *Acmella pilosa* R. K. CANSEN (ASTERACEAE).

La infusión de las hojas *Acmella pilosa*, comúnmente conocida como tripa de gallina, se utiliza en la medicina tradicional Yucateca para aliviar el dolor de muelas y la anemia. Actualmente no existen reportes fitoquímicos de esta especie. Sin embargo de *Acmella brasiliensis* (*Wedelia paludosa*), utilizada en la medicina tradicional brasileña como antiespectorante y anticonvulsiva, se ha reportado que posee actividad actividad tripanocida y citotóxica (Batista *et al.*, 2005) y de su extracto se han aislado el ácido kaurenico y la luteolina (Figura 1.9 a y b), con efectos similares a los analgésicos comerciales en el ensayo de contorsiones inducido por ácido acético en ratones (Block *et al.*, 1998).

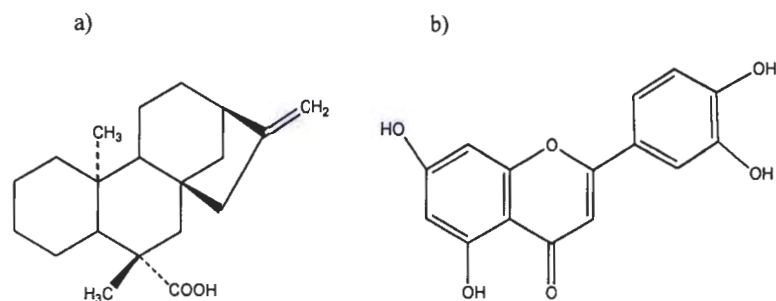


Figura 1.9 Metabolitos de *Acmella brasilensis*. a) Acido kaurenoico y b) luteolina.

1.13.2 *Calea urticifolia* (MILLER) DC (ASTERACEAE).

Calea urticifolia es conocida como Tok'aban, tsikin, xtokában o amargo del monte en la Península de Yucatán y es utilizada en la medicina popular en El Salvador y en México como bactericida y para el tratamiento de úlceras gástricas, (Bork *et al.*,1997). De esta especie se han reportado lactonas sesquiterpénicas del tipo germacranólidos con actividad citotóxica (Bork *et al.*,1997; Nakagawa *et al.*,2005), anti-tumoral (Ohguchi *et al.*,2009), acaricida (Ribeiro *et al.*,2008) y de inhibición de preadipocitos (Matsuura *et al.*,2005). También se ha reportado que la calealactona C (Figura 1.10a) y la 2,3-epoxijuanisulamina (Figura 1.10b), tienen una importante actividad citotóxica *in vitro* contra células tumorales (Castillo *et al.*,1981; Matsuura *et al.*,2005) y de inhibición de la biosíntesis de melanina (Ohguchi *et al.*,2009). Asimismo, se ha reportado que partenólido (Figura 1.10c), aislado de el extracto de hoja de *C. urticifolia*, inhibe la señalización del factor nuclear NF-kB (Bork *et al.*,1997).

Recientemente se reportó que la arucanólida (Figura 1.10 d), aislada de extractos de hoja de *C. urticifolia* presenta citotoxicidad contra células que cáncer y se encontró que esta actividad era debida principalmente a la apoptosis de las células cancerígenas a través de AIF (Nakagawa *et al.*,2005). También se ha reportado que la calealactona A (Figura 1.10 d), aislada de extracto de hoja de *C. urticifolia*, activa la vía del factor relacionado al Nrf2 de ARE (Umemura *et al.*, 2008).

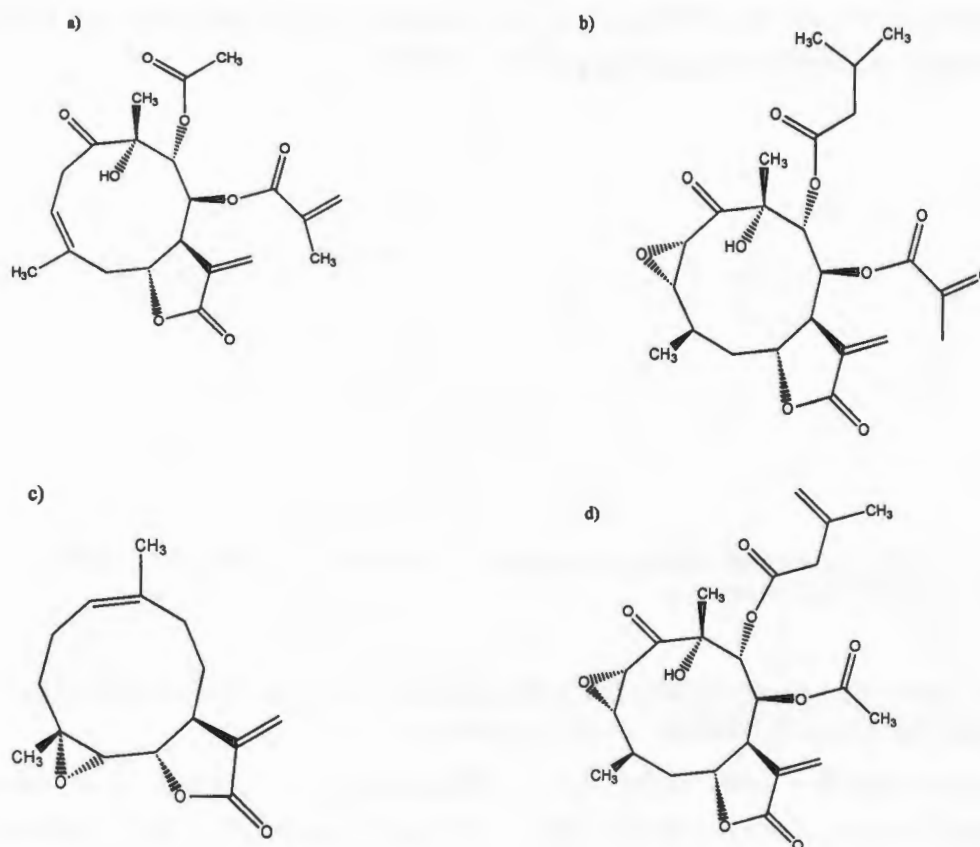


Figura 1.10 Germacrólidos aislados de *Calea urticifolia*.

a) Calealactona C, b) 2,3 Epoxijuanislamina, c) Partenólida y d) Arucanólido.

1.13.3 *Cnidoscolus souzae*, MCVAUGH (EUPHORBIACEAE)

Cnidoscolus souzae es comúnmente conocida como chaya silvestre, mala mujer, ts'iim, y ts'iim chaay en la península de Yucatán, donde es empleada como remedio contra el reumatismo.

Esta planta es sumamente apreciada en la dieta Mesoamericana debido a su rico contenido nutricional (Kuti y Konuru, 2004). Se ha reportado que las hojas de chaya tienen un alto contenido de vitamina C y beta-caroteno. además de ser ricas en calcio, fósforo, hierro, tiamina, riboflavina, (vitamina B2) y niacina (Ranhotra *et al.*, 1998).

Del material foliar de *Cnidoscolus aconitifolius*, *Cnidoscolus souzae* y *Cnidoscolus spinosus* se han reportado once flavonoides, un C-glicosil-flavonoide (Figura 1.11 a) y Kaemferol (Figura 1.11b), así como derivados de glucósidos flavonoides (Kolterman *et*

al., 1984) y la linamarina, identificada como la principal forma de glicósidos cianogénicos en las hojas de *Cnidocolus spp* (Kuti y Konuru, 2004).

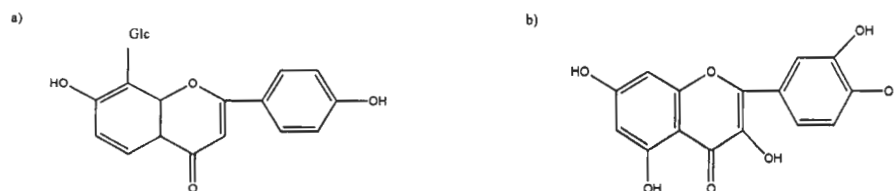


Figura 1.11 Flavonoides presentes en las hojas de *C. aconitifolius*, *C. souzai* y *C. spinosus*.
a) C-glicosilflavona y b) kaempferol.

1.13.4 *Critonia aromatisans* (DC.) R.M. KING Y H. ROB.syn. *Eupatorium hemipteropodum* Robinson (Asteraceae)

Critonia aromatisans (syn. *Eupatorium hemipteropodum*) es utilizada en la medicina tradicional yucateca para el dolor de cabeza y de cuerpo, contra la diarrea y para aliviar el reumatismo.

Hasta ahora no existen reportes fitoquímicos de esta especie. Sin embargo muchos metabolitos secundarios con actividad farmacológica de interés han sido aislados del género *Critonia*. Entre ellos se encuentran lactonas sesquiterpénicas, flavonoides, productos acetilénicos, triterpenos y alcaloides con actividad citotóxica, antitumoral, antimicrobiana, antioxidante y antiinflamatoria (Clavin *et al.*, 2000; Miño *et al.*, 2005). También se ha reportado actividad analgésica en extractos de *E. buniifolium*, *E. laevigatum*, *E. amottianum* y *E. subhastatum* (Clavin *et al.*, 2000), en tanto que los metabolitos 5,7,5'-trihidroxi-3, 6, 2,4-tetrametoxiflavona (Figura 1.12a), Escopoletina (Figura 1.12b) y centaureidina (Figura 1.12c), aislados de *E. buniifolium*, se reportan con actividad antiinflamatoria en el modelo de edema de la oreja de ratón (Muschietti *et al.*, 2001).

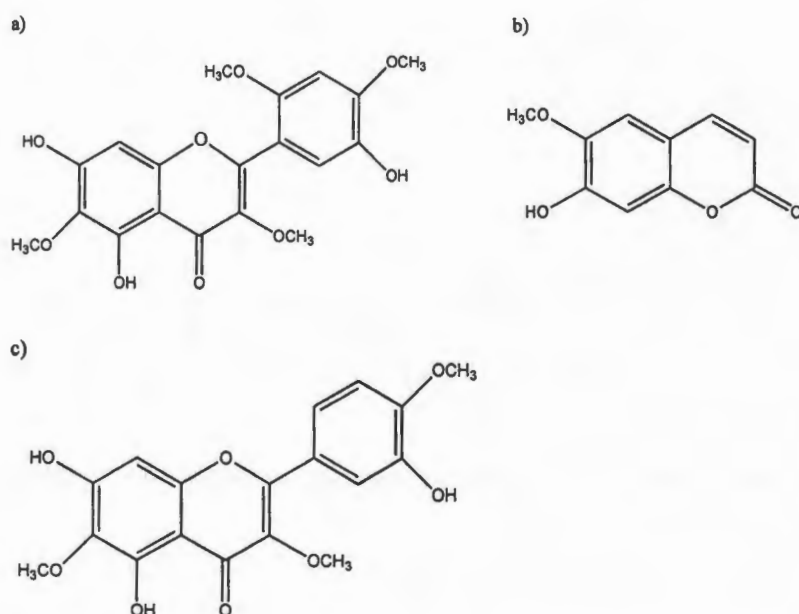


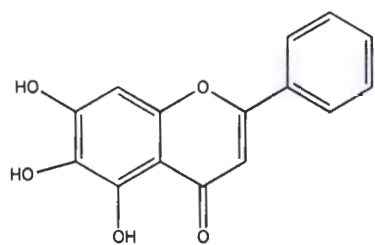
Figura 1.12 Metabolitos secundarios reportados de *Eupatorium buniifolium*.
a) 5,7,5'-trihidroxi-3,6,2',4'-tetrametoxiflavona, b) Escopoletina y c) Centaureidina

1.13.5 *Scutellaria gaumeri*, LEONARD. (LAMIACEAE)

A *Scutellaria gaumeri* se le conoce en la península de Yucatán como albahaca y ya'ax kakaltuum. En la medicina tradicional se emplea como antipirético, para aliviar el dolor de espalda, la inflamación del hígado y la irritación de la matriz.

Aun cuando no se tiene información fitoquímica de la especie, el género *Scutellaria* incluye unas 350 especies con una distribución cosmopolita (Europa, América del Norte y Asia Oriental), de las que se han reportado casi 300 metabolitos, incluyendo flavonoides (Sonoda *et al.*,2004; Yimam *et al.*,2012), metabolitos fenólicos (Türkoğlu y Celik, 2010), alcaloides, aceites volátiles, y polisacáridos (Shang *et al.*,2010). El género *Scutellaria* ha sido ampliamente caracterizado por sus propiedades antioxidantes (Schinella *et al.*,2002; Peng-fei, *et al.*,2013) y los metabolitos baicaleína y baicalina (Figura 1.13 a y b) se han reportado con actividad analgésica y antiinflamatoria (Van Loon 1997; Guo *et al.*,2013).

a)



b)

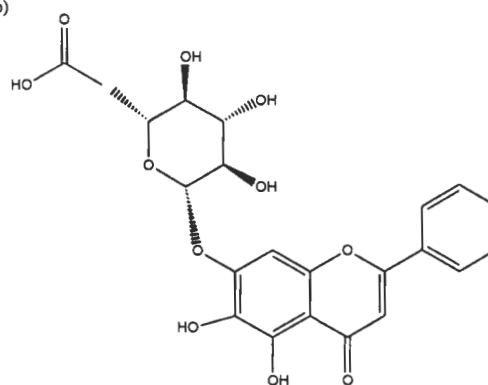


Figura 1.13 Metabolitos aislados de *Scutellaria baicalensis*: a) Baicaleína y b) Baicalina.

1.14 JUSTIFICACIÓN

Las ERO contribuyen y mantienen las condiciones de dolor e inflamación, por lo que la búsqueda de agentes antioxidantes representa una opción importante para el desarrollo de nuevos analgésicos y antiinflamatorios. En la actualidad los analgésicos y antiinflamatorios aunque eficientes poseen efectos secundarios indeseables. Por lo que es necesario el desarrollo de fármacos con igual o mayor eficacia, pero exentos de estos efectos.

La exploración de productos naturales novedosos y con potencial para el desarrollo de nuevos fármacos se ha centrado en el estudio de especies vegetales ubicadas en las regiones ricas en biodiversidad y en el uso de la información etnobotánica. México no solo cuenta una con biodiversidad vegetal sino también un legado cultural, donde un importante número de especies vegetales son utilizadas en medicina tradicional; sin embargo hoy en día menos del 2% de las especies han sido estudiadas en cuanto a su producción de metabolitos bioactivos.

El aislamiento y la identificación de los metabolitos con actividad antioxidante, analgésica y antiinflamatoria producidos por *Acacia gaumeri*, *Acmella pilosa*, *Calèa urticifolia*, *Cnidoscolus souzæ*, *Critonia aromatisans* y *Scutellaria gaumeri* así como la descripción de su estructura química permitirá conocer su probable mecanismo de acción y establecer su probable potencial para el desarrollo de futuros analgésicos y antiinflamatorios.

1.15 HIPÓTESIS

Las plantas nativas de la península de Yucatán utilizadas contra el dolor y los problemas inflamatorios deben sus propiedades a su contenido de metabolitos bioactivos.

1.15.1 OBJETIVOS

Evaluar la actividad antioxidante, antiinflamatoria y analgésica de extractos y metabolitos secundarios obtenidos de especies nativas de la península de Yucatán.

1.15.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Recopilar la información fitoquímica, etnomédica y farmacológica de: *Acmella pilosa*, *Calea urticifolia*, *Cnidioscolus souzae*, *Critonia aromatisans* y *Scutellaria gaumeri*.

Evaluar la actividad antioxidante, antiinflamatoria y analgésica de los extractos crudos y fracciones alta (Hex) y mediana polaridad (EtOAc).

Evaluar los metabolitos bioactivos obtenidos de los extractos con mayor actividad en modelos in vivo de dolor e inflamación.

Determinar los mecanismos de acción de los metabolitos bioactivos aislados de las especies con mayor actividad antioxidante, analgésica y antiinflamatoria.

1.1. OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como objetivo principal analizar el estado actual de la investigación en el campo de la fisiología vegetal, con especial énfasis en los aspectos relacionados con el metabolismo fotosintético.

1.2. JUSTIFICACIÓN

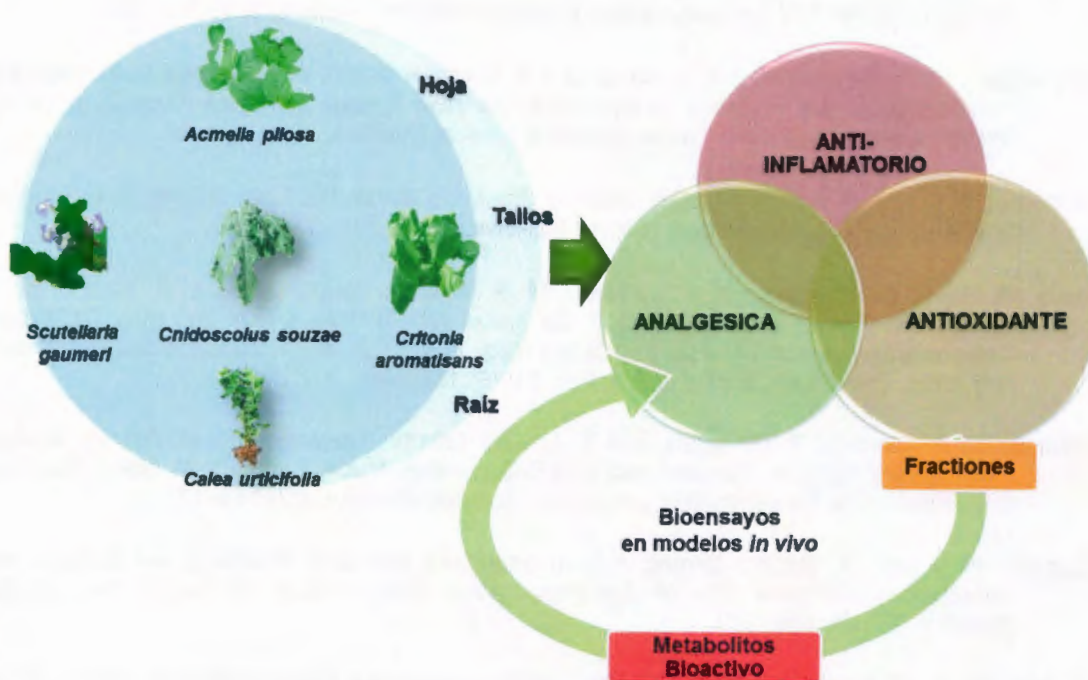
La fisiología vegetal es una disciplina científica que estudia el funcionamiento de los organismos vegetales, desde el nivel celular hasta el nivel del organismo completo. Este conocimiento es fundamental para comprender los procesos biológicos que sustentan la vida en las plantas.

1.3. ESTRUCTURA DEL TRABAJO

El presente trabajo está estructurado en tres partes principales. La primera parte describe el estado actual de la investigación en el campo de la fisiología vegetal, con especial énfasis en los aspectos relacionados con el metabolismo fotosintético. La segunda parte presenta los resultados de la investigación realizada durante el desarrollo del trabajo. La tercera parte discute los resultados obtenidos y las implicaciones de los mismos para el conocimiento actual de la fisiología vegetal.

1.16 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos planteados, se llevó a cabo la siguiente estrategia experimental.



1.7 REFERENCIAS

- Abdelwahab, S. I., L. A. Hassan, M. S. Hasnah, M. Y. Sakina, S. K. Waleed, S. Mohan, M. M. Taha, S. Ahmad, C. S. Chuen., P. Narrima., M. M. Rais y A. H. Hadi (2011). Anti-Inflammatory Activities of Cucurbitacin E Isolated from *Citrullus Lanatus* Var. Citroides: Role of Reactive Nitrogen Species and Cyclooxygenase Enzyme Inhibition. *Fitoterapia*, 82(8), 1190–7.
- Arumugam, P., P. Ramamurthy, S. T. Santhiya y A. Ramesh (2006). Antioxidant Activity Measured in Different Solvent Fractions Obtained from *Mentha Spicata* Linn.: An Analysis by ABTS⁺ Decolorization Assay. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 15(1), 119–24.
- Autréaux, B. D y M. B Toledano (2007). ROS as Signalling Molecules: Mechanisms That Generate Specificity in ROS Homeostasis. *Nature Reviews*, 8 (10), 813–824.
- Avila, P. R., S. O. Marques., T. F. Luciano., M. F. Vitto., J. Engelmann., D. R. Souza., S. V. Pereira., R. Pinho., F. S. Lira y C. T De Souza (2013). Resveratrol and Fish Oil Reduce Catecholamine-Induced Mortality in Obese Rats: Role of Oxidative Stress in the Myocardium and Aorta. *The British Journal of Nutrition*, 110(9), 1580–90.
- Balázs, R., P. Gardina, T. G. Myers and T. L. Leto (2011). Reactive Oxygen Species Mediate Inflammatory Cytokine Release and EGFR-Dependent Mucin Secretion in Airway Epithelial Cells Exposed to *Pseudomonas pyocyanin*. *Mucosal Immunol*, 4(2), 158–171.
- Bartsch, H y Nair, J. (2006). Chronic Inflammation and Oxidative Stress in the Genesis and Perpetuation of Cancer: Role of Lipid Peroxidation, DNA Damage and Repair. *New Surgical Horizons*, 391(5), 499–510.
- Batista, R., F. C. Braga and A. B. Oliveira (2005). Quantitative Determination by HPLC of Ent-Kaurenoic and Grandiflorenic Acids in Aerial Parts of *Wedelia Paludosa* DC. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 15(2), 119–125.
- Benjemia, M., W. Aidi -Wannes, O. Ouchikh, M. Bruno y M. E. Kchouk (2013). Antioxidant Activity of Tunisian *Geranium robertianum* L. (*Geraniaceae*). *Natural Product Research*, 27(22), 2076–83.
- Benzie, I. Fand Strain J. J. (1996). *The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of Antioxidant Power: The FRAP Assay*. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76.
- Biju, P., K. McCormick, R. Aslanian, M. Berlin, D. Solomon, R. Chapman, R. McLeod., D. Prelusky., S. Eckel, G. Kelly, M. Natiello, A. House, X. Fernandez, R. Bitar, J. Phillips and J. Anthes, (2011). *Steroidal C-21 Mercapto Derivatives as Dissociated Steroids: Discovery of an Inhaled Dissociated Steroid*. *Bioorganic y Medicinal Chemistry Letters*, 21(21), 6343–7.
- Block, L. C., A. R. Santos, M. M. de Souza, C. Scheidt, R. A. Yunes, M. A. Santos, F. D. Monache y V. C. Filho (1998). Chemical and Pharmacological Examination of Antinociceptive Constituents of *Wedelia Paludosa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 61(1), 85–9.
- Bork, P. M., M. L. Schmitz, M. Kuhnt, C. Escher y M. Heinrich (1997). Sesquiterpene Lactone Containing Mexican Indian Medicinal Plants and Pure Sesquiterpene Lactone as Potent Inhibitors of Transcription Factor NF- κ B. *Federation of European Biochemical Societies*, 402(1), 85–90.

- Brand-Williams, W., M. E. Cuvelier y C. Berset (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
- Butler, M. S (2004). The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *Journal of Natural Products*, 67(12), 2141–2153.
- Calixto, J. B., A. Beirith., J. Ferreira., R. Santos., V. C. Filho and R. Yunes (2000). Naturally Occurring Antinociceptive Substances from Plants. *Phytotherapy Research*, 14(6), 401–18.
- Capone, F y A. M. Aloisi (2004). Refinement of Pain Evaluation Techniques. The Formalin Test. *Annali dell'Istituto Superiore Di Sanità*, 40(2), 223–229.
- Castillo, J. B., M. T. Manresa Ferrero., L. Rodriguez y P. Vazquez Bueno (1981). Research Article Salvadorian Compositae. II. Juanislaamin and 2,3-Epoxy-Juanislaamin, Two New Sesquiterpenic Lactones From *Calea urticifolia*. *Journal Natural Products*, 44(3), 348–350.
- Chandrasekharan, N. V y D. L. Simmons (2004). Protein Family Review The Cyclooxygenases. *Genome Biology*, 5(9), 1–7.
- Chen X.L, G. Dodd, S Thomas, X Zhang, M.A. Wasserman, B.H Rovin y C. Kunsch (2006). Activation of Nrf2/ARE Pathway Protects Endothelial Cells from Oxidant Injury and Inhibits Inflammatory Gene Expression Activation of Nrf2 / ARE Pathway Protects Endothelial Cells from Oxidant Injury and Inhibits Inflammatory Gene Expression. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 290(5), 1862-70.
- Choi, S. S, J. K. Lee y H. W. Suh (2001). Antinociceptive Profiles of Aspirin and Acetaminophen in Formalin, Substance P and Glutamate Pain Models. *Brain Research*, 921(1-2), 233–9.
- Clavin, L., S. Gorzalczany, J. Min, C. Kadarian y V. Martino (2000). Antinociceptive Effect of Some Argentine Medicinal Species of Eupatorium. *Phytotherapy Research*, 14(4), 275–277.
- Coballase-Urrutia, E., J. Pedraza-Chaverri, R. Camacho-Carranza, N. Cárdenas-Rodríguez, B. Huerta-Gertrudis, O. N. Medina-Campos, M. Mendoza-Cruz, G. Delgado-Lamas y J. J. Espinosa-Aguirre (2010). Antioxidant Activity of *Heterotheca inuloides* Extracts and of Some of Its Metabolites. *Toxicology*, 276, 41–8.
- Corrêa, C. R y J. B. Calixto (1993). Evidence for Participation of B1 and B2 Kinin Receptors in Formalin-Induced Nociceptive Response in the Mouse. *British Journal of Pharmacology*, 110, 193–8.
- Coutaux, A., A. Frédéric, J. C. Willer y D. Le Bars (2005). Hyperalgesia and Allodynia: Peripheral Mechanisms. *Joint Bone Spine*, 72(5), 359–71.
- De Bosscher, K., I. M. Beck y G. Haegeman (2010). Classic Glucocorticoids Versus Non-Steroidal Glucocorticoid Receptor Modulators: Survival of the Fittest Regulator of the Immune System? *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(7), 1035-42.
- Deng, J. S., C. S. Chi, S. S. Huang, P. H. Shie, T. H. Lin y G. J. Huang (2011). Antioxidant, Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of the Ethanolic Extracts of *Taxillus Liquidambaricola*. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(3), 1161–71.

- Dudhgaonkar, S. P., S. K. Tandan., A. S. Bhat., S. H. Jadhav y D. Kumar (2006). Synergistic Anti-Inflammatory Interaction Between Meloxicam and Aminoguanidine Hydrochloride in Carrageenan-Induced Acute Inflammation in Rats. *Life Sciences*, 78(10), 1044–8.
- Fabricant, D. S y N. R. Farnsworth (2001). The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. *Environmental Health Perspectives*, 109, 69–75.
- Finkel, T y N. J. Holbrook (2000). Oxidants, Oxidative Stress and Biology of Ageing. *Nature*, 408, 239–247.
- Ferchichi, L., S. Derbré, K. Mahmood, K. Touré, Guilet, D., Litaudon, M., Awang, K., Hadi, A. H., Le Ray, A. M y P. Richomme (2012). Bioguided Fractionation and Isolation of Natural Inhibitors of Advanced Glycation End-Products (AGEs) from *Calophyllum flavoramulum*. *Phytochemistry*, 78, 98–106.
- Foyer, C. H y G. Noctor (2011). Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub. *Plant Physiology*, 155, 2–18.
- Fraternale, D., S. Sosa., D. Ricci, S. Genovese, F. Messina, S. Tomasini, F. Montanari y M. C. Marcotullio (2011). Anti-Inflammatory, Antioxidant and Antifungal Furanosquiterpenoids Isolated from *Commiphora Erythraea* (Ehrenb.) Engl. *Resin. Fitoterapia*, 82(4), 654–61.
- Guo, M., N. Zhang, D. Li, D. Liang, Z. Liu, F. Li, Y. Fu, Y. Cao, X. Deng y Z. Yang (2013). Baicalin Plays an Anti-Inflammatory Role through Reducing Nuclear Factor- κ B and P38 Phosphorylation in *S. aureus*-Induced Mastitis. *International Immunopharmacology*, 16(2), 1–6.
- Hacimuftuoglu, A., C. R. Handy, V. M. Goettl, C. G. Lin, S. Dane y R. L Jr. Stephens (2006). Antioxidants Attenuate Multiple Phases of Formalin-Induced Nociceptive Response in Mice. *Behavioural Brain Research*, 173(2), 211–6.
- Harvey, A (2000). Strategies for Discovering Drugs from Previously Unexplored Natural Products. *Drug Discovery Today*, 5(7), 294–300.
- Hua, S y P. J Cabot (2010). Mechanisms of Peripheral Immune-Cell-Mediated Analgesia in Inflammation: Clinical and Therapeutic Implications. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31(9), 427–33.
- Huang, D. B., M. Ou, M. Hampsch-Woodill, J. A. Flanagan y E. K Deemer (2002). Development and Validation of Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay for Lipophilic Antioxidants Using Randomly Methylated Beta-Cyclodextrin as the Solubility Enhancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 1815–21.
- Hunskar, S y K. Hole. (1987). The Formalin Test in Mice: Dissociation Between. *Pain*, 30 (1), 103–114.
- Hur, W., Z. Sun, T. Jiang, D. E. Mason, E. C. Peters, D. D. Zhang, H. Luesch, G. P. Schultz y S. G. Nathanael (2010). A Small-Molecule Inducer of the Antioxidant Response Element. *Chemistry y Biology*, 17(5), 537–547.
- Ibi, M., K. Matsuno., D. Shiba, M. Katsuyama, K. Iwata, T. Takehi, T. Nakagawa, K. Sango, Y. Shirai T. Yokoyama, S. Kaneko, N. Saito and C. Yabe-nishimura (2008). Reactive Oxygen

- Species Derived from NOX1/NADPH Oxidase Enhance Inflammatory Pain. *The Journal of Neuroscience*, 28(38), 9486–9494.
- Kadhun, A. A., A. A. Al-Amiery, A. Y. Musa y A. B. Mohamad (2011). The Antioxidant Activity of New Coumarin Derivatives. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(9), 5747–61.
- Katori, M y M. Majima (2000). Cyclooxygenase-2: It's Rich Diversity of Roles and Possible Application of Its Selective Inhibitors. *Inflammation Research*, 49, 367–392.
- Kesharwani, V., F. Atif, S. Yousuf y S. K. Agrawal (2013). Resveratrol Protects Spinal Cord Dorsal Column from Hypoxic Injury by Activating Nrf-2. *Neuroscience*, 25, 241:80-8.
- Khalil, Z y B. Khodr (2001). A Role for Free Radicals and Nitric Oxide in Delayed Recovery in Aged Rats with Chronic Constriction Nerve Injury. *Free Radical Biology y Medicine*, 31(4), 430–9.
- Kim, D., B. You, E. K Jo, S. K. Han, M. I. Simon y S. G. Lee (2010). NADPH Oxidase 2-Derived Reactive Oxygen Species in Spinal Cord Microglia Contribute to Peripheral Nerve Injury-Induced Neuropathic Pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(33), 14851–6.
- Kim, H. K., S. K. Park, J. L. Zhou, G. Taglialatela, K. Chung, R. E. Coggeshall y J. M. Chung (2004). Reactive Oxygen Species (ROS) Play an Important Role in a Rat Model of Neuropathic Pain. *Pain*, 111(1-2), 116–24.
- Klaunig, E. J y L. M Kamendulis (2004). The Role of Oxidative Stress in Carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44, 239–67.
- Kobayashi, S., N. Inoue, Y. Ohashi, M. Terashima, K. Matsui, T. Mori, H. Fujita, K. Awano, K. Kobayashi., H. Azumi, J. Ejiri, K. Hirata, S. Kawashima, Y. Hayashi, H. Yokozaki, H. Itoh y M. Yokoyama (2003). Interaction of Oxidative Stress and Inflammatory Response in Coronary Plaque Instability: Important Role of C-Reactive Protein. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(8), 1398–404.
- Kolterman, D. A., G. J. Breckon y R. R. Kowal (1984). Chemotaxonomic Studies in Cnidoscolum (Euphorbiaceae). II. Flavonoids of *C. aconitifolius* and *C. spinosus*. *Systematic Botany*, 9(1), 22–32.
- Koppula, S., H. Kumar., I. S Kim and D. K. Choi (2012). Reactive Oxygen Species and Inhibitors of Inflammatory Enzymes, NADPH Oxidase, and iNOS in Experimental Models of Parkinson's Disease. *Mediators of Inflammation*, [Online], 2012, 1–16.
- Korotkova, E. I., O. A. Avramchik., M. S. Yusubov., M. V. Belousov and T. I Andreeva (2003). Determination of the Antioxidant Activity of Plant Extracts by Means of Cathode Voltammetry. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 37(9), 511–512.
- Kumar, N (2007). WHO Normative Guidelines on Pain Management Report of a Delphi Study to Determine the Need for Guidelines That Should Be Developed by WHO [Online]. 1–50.
- Kuner, R. (2010). Central Mechanisms of Pathological Pain. *Nature Medicine*, 16(11), 1258–1267.
- Kuti, J. O y H. B. Konuru (2004). Antioxidant Capacity and Phenolic Content in Leaf Extracts of Tree Spinach (*Cnidoscolum Spp.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 117–21.

- Kvietys, P. R y D. N Granger (2012). Role of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in the Vascular Responses to Inflammation. *Free Radical Biology y Medicine* 52(3), 556–92.
- Kwon, S. H., M. J. Kim., S. X. Ma., I. J. You., J. Y. Hwang., J. H. Oh., S. Y. Kim., H. C. Kim., S. Y. Lee y C. G. Jang (2012). *Eucommia ulmoides* Oliv. Bark. Protects Against Hydrogen Peroxide-Induced Neuronal Cell Death in SH-SY5Y Cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 142(2),337–45.
- Lawrence, T., A. D. Willoughby y D. W. Gilroy (2002). Anti-inflammatory Lipid Mediators and Insights into the Resolution of Inflammation. *Nature Reviews*, 2(10), 787–95.
- Le Bars D., M. Gozariu y S. Cadden (2001). Animal Models of Nociception. *Pharmacological Review*, 53(4), 597–652.
- López-Jaramillo, P (2001). Óxido Nítrico y Dolor. *Revista Medunab* 4(10), 1–7.
- Lu, R., W. Kallenborn-Gerhardt., G. Geisslinger y A. Schmidtko (2011). Additive Antinociceptive Effects of a Combination of Vitamin C and Vitamin E after Peripheral Nerve Injury. *PLoSOne*, 6(12),1–9.
- Matsuura, N., M. Yamada, H. Suzuki, N. Hasegawa, C. Kurosaka, M. Ubukata, T. Tanaka y M. Linuma (2005). Inhibition of Preadipocyte Differentiation by Germacranolides from *Calea urticifolia* in 3T3-L1 Cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69(12), 2470–4.
- Meckes, M., R. Mata y X. Lozoya (1993). La Investigación científica de la herbolaria medicinalmexicana. Secretaria de Salud México. México, D. F. 169 p.
- Medzhitov, R (2008). Origin and Physiological Roles of Inflammation. *Nature*,454, 428-435.
- Méndez González, M. E., R. Garcia-Durán., M. S. Bobadilla-Campos and A. Dorantes Euan. (2011). Flora Medicinal in Biodiversidad y Desarrollo Humano En Yucatán, Méndez González, M. E., R. Garcia-Durán. (ed). PPD-FMAM, CONABIO, SEDUMA, Mérida Yucatán, México. pp349– 352.
- Meotti, F. C., A. P. Luiz., M. G. Pizzolatti, C. A. Kassuya, J. B. Calixto y A. R Santos (2006). *Analysis of the Antinociceptive Effect of the Flavonoid Myricitrin: Evidence for a Role of the L -Arginine-Nitric Oxide and Protein Kinase C Pathways*. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 316(2), 789–796.
- Miño, J., L. Muschietti, G. Ferraro, V. Martino y C. Acevedo (2005). Antinociceptive Activity of *Eupatorium buniifolium* Aqueous Extract. *Fitoterapia*, 76(1),100–103.
- Mirshafiey, A y M. Mohsenzadegan (2008). The Role of Reactive Oxygen Species in Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Iranian Journal of Allergy, Asthma y Immunology*, 7(4), 195–202.
- Molyneux, P (2004). The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl- Hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *The Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211–219.
- Montaner, B., P. O'Donovan, O. Reelfs, C. M. Perrett, X. Zhang., Y. Z. Xu, X. Ren, P. Macpherson., D. F y P. Karran (2007). Reactive oxygen-mediated damage to a human DNA replication and repair protein. *Scientific Report*, 8(11), 4–9.

- Muschietti, L., S. Gorzalczyk, G. Ferraro, C. Acevedo and V. Martino (2001). Phenolic compounds with anti-inflammatory activity from *Eupatorium buniifolium*. *Planta Medica*, 67(8), 743–744.
- Nakagawa, Y., M. Linuma, N. Matsuura, K. Yi, M. Naoi, T. Nakayama, Y. Nozawa y Y. Akao (2005). A Potent Apoptosis-Inducing Activity of a Sesquiterpene Lactone, Arucanolide, in HL60 Cells: A Crucial Role of Apoptosis-Inducing Factor. *Journal of Pharmacological Sciences*, 97(2), 242–252.
- Newman, D. J y G. M Cragg (2012). Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal Natural Product*, 75(3), 311–335.
- Niu, X. F, P. Zhou, W. F. Li y H. B. Xu (2011). Fitoterapia Effects of Chelerythrine, a Specific Inhibitor of Cyclooxygenase-2, on Acute Inflammation in Mice. *Fitoterapia*, 82(4), 620–625.
- Ohguchi, K., M. Ito, K. Yokoyama, M. Linuma, T. Itoh, Y. Nozawa y Y. Akao (2009). Effects of Sesquiterpene Lactones on Melanogenesis in Mouse B16. *Biological y Pharmaceutical Bulletin*, 32(2), 308–310.
- Okamoto, T., K. Gohil, E. I. Finkelstein, P. Bove, T. Akaike y V. Albert van der (2004). Multiple Contributing Roles for NOS2 in LPS-Induced Acute Airway Inflammation in Mice. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 286, 198–209.
- Ortega, A., A. Roca y J. A. Micó (2002). Modelos animales de dolor. Una visión crítica. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 9: 447–453.
- Papaharalambus, C. A y K. K. Griendling (2008). Basic Mechanisms of Oxidative Stress and Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Injury. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 17(2), 48–54.
- Peng-Fei, L., H. Fu-Genand D. Bin-Bin (2013). Purification and Antioxidant Activities of Baicalin Isolated from the Root of Huangqin (*Scutellaria baicalensis* Gcorst). *Journal of Food Science and Technology*, 50(3), 615–619.
- Posadas, I., M. Bucci, F. Roviezzo, A. Rossi, L. Parente, L. Sautebin y G. Cirino (2004). Carrageenan-Induced Mouse Paw Oedema Is Biphasic, Age-Weight Dependent and Displays Differential Nitric Oxide Cyclooxygenase-2 Expression. *British Journal of Pharmacology*, 142(2), 331–8.
- Prior, R. L., X. Wu y K. Schaich (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 615–9.
- Procházková, D., I. Boušová y N. Wilhelmová (2011). Fitoterapia Antioxidant and Prooxidant Properties of Flavonoids. *Fitoterapia*, 82(4), 513–523.
- Ramsin, B., A. M. Trescot, S. Datta, R. Buenaventura, R. Adlaka, N. Sehgal, S. E Glaser y R. Vallejo (2008). Opioid Complications and Side Effects. *Pain Physician*, 11(2 Suppl), 105–20.
- Ranhotra, G. S., J. A. Gelroth, S. D. Leinen y M. A. Vin (1998). Nutritional Profile of Some Edible Plants from Mexico. *Journal of Food Composition and Analysis*, 304(11), 298–304.

- Ray, P. D, B. W. Huang y Y. Tsuji, (2012). Reactive Oxygen Species (ROS) Homeostasis and Redox Regulation in Cellular Signaling. *Cellular Signalling*, 24(5), 981–990.
- Ren, Ke y R. Dubner (2010). Interactions Between the Immune and Nervous Systems in Pain. *Nature Medicine*, 16(11), 1267–76.
- Rittner, H. L., A. Brack y C. Stein (2008). Pain and the immune system. *BJA British Journal of Anaesthesia* 101, 40–4.
- Ribeiro, V. L., C. Avancini, K. Gonçalves, E. Toigo y G. von Poser (2008). Acaricidal Activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus Microplus* and *Rhipicephalus Sanguineus*. *Veterinary Parasitology*, 151(2-4),351–4.
- Rocha, A. C., E. S. Fernandes, N. L. Quintão, M. M. Campos y J. B. Calixto (2006). Relevance of Tumour Necrosis Factor-Alpha for the Inflammatory and Nociceptive Responses Evoked by Carrageenan in the Mouse Paw. *British Journal of Pharmacology*, 148(5), 688–95.
- Salvemini, D., J. W. Little, T. Doyle y W. L. Neumann (2011). Roles of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Pain. *Free Radical Biology y Medicine* 51(5),951–66.
- Satyanarayana, P. S., N. K. Jain, A. Singh y S. K. Kulkarni (2004). Isobolographic Analysis of Interaction Between Cyclooxygenase Inhibitors and Tramadol in Acetic Acid-Induced Writhing in Mice. *Progress in Neuropsychopharmacology y Biological Psychiatry*, 28(4), 641–9.
- Schinella, G. R, H. A. Tournier, J. M. Prieto, P. Mordujovich de Buschiazso y J. L. Ríos (2002). Antioxidant Activity of Anti-Inflammatory Plant Extracts. *Life Sciences*, 70(9),1023–1033.
- Scholz,J y C. J. Woolf (2002). Can We Conquer Pain ? *Nature Neuroscience*, 5, 1062-7.
- Schwartz, E. S., H. Y. Kim, J. Wang., I. Lee, E. Klann, J. M. Chung y K. Chung (2009). Persistent Pain Is Dependent on Spinal Mitochondrial Antioxidant Levels. *Journal of Neuroscience*, 29, 159–168.
- Sgariglia, M. A (2013). Anti-Inflammatory Properties of Phenolic Lactones Isolated from *Caesalpinia paraguariensis* Stem Bark. *Journal of Ethnopharmacology*,147, 1–11.
- Shang, X., X. He, M. Li, R. Zhang., P. Fan, Q. Zhang y Z. Jia (2010). The Genus *Scutellaria* an Ethnopharmacological and Phytochemical Review. *Journal of Ethnopharmacology*, 128(2), 279–313.
- Serhan, C. N (2007). Resolution Phase of Inflammation: Novel Endogenous Anti-Inflammatory and Proresolving Lipid Mediators and Pathways. *The Annual Review of Immunology*, 25,101–37.
- Simmonds, R. E y B. M. Foxwell (2008). NF-κB and Its Relevance to Arthritis and Inflammation. *Rheumatology*, 45(5), 584–590.
- Simon, S. I y C. E. Green (2005). Molecular Mechanics and Dynamics of Leukocyte Recruitment During. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 7,151–85.
- Siomek, A (2012). NF-κB Signaling Pathway and Free Radical Impact. *Acta Biochimica Polonica* 59 (3), 323–31.

- Siquet, C., F. Paiva-Martins, J. L. Lima., S. Reis y F. Borges (2006). Antioxidant Profile of Dihydroxy- and Trihydroxyphenolic Acids-A Structure-Activity Relationship Study. *Free Radical Research*, 40(4), 433–42.
- Sonoda, M., T. Nishiyama, Y. Matsukawa y M. Moriyasu (2004). Cytotoxic Activities of Flavonoids from Two Scutellaria Plants in Chinese Medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 91(1), 65–68.
- Sorg, O (2004). Oxidative Stress: A Theoretical Model or a Biological Reality? *Comptes Rendus Biologies*, 327(7), 649–662.
- Spooner, R y Y. Özlem (2011). The Role of Reactive-Oxygen-Species in Microbial Persistence and Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 334–352.
- Stahl, W y H. Sies (2003). Antioxidant Activity of Carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24 (6), 345–351.
- Stein, C y H. Machelska (2011). Modulation of Peripheral Sensory Neurons by the Immune System: Implications for Pain Therapy. *Pharmacological Reviews*, 63(4), 860–881.
- Steinmeyer, J (2000). Pharmacological Basis for the Therapy of Pain and Inflammation with Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Jürgen Steinmeyer. *Arthritis Research*, 2(5), 379.
- Sun, J., Yu, J., P. C. Zhang., F. Tang., Y. D. Yue., Y. N. Yang., Z. M. Feng y X. F. Guo (2013). Isolation and Identification of Lignans from *Caulis bambusae* in *Taenia* with Antioxidant Properties. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 61(19), 455–62.
- Svensson, C. I., M. Zattoni y C. N. Serhan (2007). Lipoxins and Aspirin-Triggered Lipoxin Inhibit Inflammatory Pain Processing. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(2), 245–252.
- Tanaka, A., N. Hamada, Y. Fujita, T. Itoh y Yoshinori Nozawa (2010). Bioorganic y Medicinal Chemistry A Novel Kavalactone Derivative Protects Against H_2O_2 -Induced PC12 Cell Death via Nrf2 / ARE Activation. *Bioorganic y Medicinal Chemistry*, 18(9), 3133–3139.
- Thaipong, K., U. Boonprakob, K. Crosby, L. Cisnero-Zevallos y D. Hawkins Byrne (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC Assays for Estimating Antioxidant Activity from Guava Fruit Extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), 669–675.
- Thomas, W (2008). Catch Bonds in Adhesion. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 10, 39–57.
- Tjølsen, A., O. G. Berge., S. Hunnskaar., J. H. Rosland y K. Hole (1992). Review Article The Formalin Test: an Evaluation of the Method. *Pain* 51(1): 5–17.
- Türkoğlu, S y S. Celik (2010). Determination Antioxidant Capacity of Water and Ethanol Extracts. *Turkish Journal of Science y Technology*, 5(2), 59–68.
- Turrens, J. F (2003). Mitochondrial Formation of Reactive Oxygen Species. *Journal of Physiology*, 2, 335–344.
- Umemura, K., T. Itoh, N. Hamada, Y. Fujita., Y. Akao., Y. Nozawa., N. Matsuura., M. Linuma y M. Ito (2008). Preconditioning by Sesquiterpene Lactone Enhances H_2O_2 -Induced Nrf2/ARE Activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 368(4), 948–54.

- Valko, M., D. Leibfritz., J. Moncol., T. D. Mark., C. Milan Mazur y J. Telser (2007). Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. The International Journal of Biochemistry, 39, 44–84.
- Van Loon, I. M (1997). The Golden Root: Clinical Applications of *Scutellaria baicalensis* Georgi Flavonoids as Modulators of the Inflammatory Response *Scutellaria*. Alternative Medicine Review, 2 (6), 472–480.
- Vane, J R y R. M Botting (1998). Anti-Inflammatory Drugs and Their Mechanism of Action. Inflammation Research, 47 (2 Suppl), 78–87.
- Wang, Z. Q., F. Porreca., S. Cuzzocrea., K. Galen., R. Lightfoot, E. Masini, C. Muscoli, V. Mollace., M. Ndengele., H. Ischiropoulos y D. Salvemini (2004). A newly Identified Role for Superoxide in Inflammatory Pain. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 309(3), 869–878.
- Wiseman, H y B. Halliwell (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer Inflammatory Disease and Progression to Cancer. Biochemical Journal, 29(2): 17–29.
- Yimam, M., L. Brownell., M. Hodges and Q. Jia (2012). Analgesic Effects of a Standardized Bioflavonoid Composition from *Scutellaria baicalensis* and *Acacia catechu*. Journal of Dietary Supplements, 9(3), 155–65.
- Yowtak, J., K. Y. Lee., H. Y. Kim., J. Wang., H. K. Kim., K. Chung and J. M. Chung (2012). Reactive Oxygen Species Contribute to Neuropathic Pain by Reducing Spinal GABA Release. Pain, 152(4), 844–852.
- Zhang, H. Y., Yang, D. P and G. Y. Tang (2006). Multipotent Antioxidants: from Screening to Design. Drug Discovery Today, 11(15-16), 749–54.
- Zheng, W and S. Y Wang (2001). Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. Journal Agricultural and Food Chemistry, 49(11), 5165–5170.

CAPÍTULO II ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANALGÉSICA DE PLANTAS NATIVAS DE LA FLORA DE YUCATÁN

DESCRIPCIÓN DEL CAPÍTULO

Las ERO contribuyen a mantener las condiciones de dolor y de inflamación. En consecuencia, los antioxidantes representan una opción importante para el desarrollo de nuevos analgésicos y anti-inflamatorios. El reino vegetal, que incluye las plantas utilizadas en la medicina tradicional yucateca, representa una importante fuente de metabolitos secundarios con actividad biológica. En este capítulo se evaluó la actividad antioxidante, analgésica y antiinflamatoria de extractos crudos de cinco plantas nativas de la península de Yucatán tradicionalmente utilizadas para tratar el dolor y la inflamación. Los ensayos de reducción del radical DPPH y de inhibición de contorsiones inducidas por ácido acético se utilizaron para evaluar la actividad antioxidante y analgésica, respectivamente, de los extractos de hoja, tallo y raíz de *Acmella pilosa*, *Calea urticifolia*, *Cnidoscolus souzae*, *Critonia aromatisans* y *Scutellaria gaumeri*. Además, se utilizó la prueba de la formalina para explorar el mecanismo de acción de la actividad analgésica, junto con la actividad antiinflamatoria, de los extractos de *S. gaumeri* y *C. aromatisans*.

Los extractos de hojas de todas las especies mostraron una mayor actividad analgésica en comparación con los extractos de tallo y raíz, en tanto que solo los extractos de hojas de *C. urticifolia*, *A. pilosa* y *S. gaumeri* presentaron actividad antioxidante significativa. Los extractos de *C. aromatisans* y *S. gaumeri* inhibieron la fase temprana y tardía de la hipernocicepción inducida por formalina y suprimieron el edema inducido en la pata, indicando que el efecto analgésico es a la vez central y periférico. Los resultados sugieren que la actividad analgésica de los extractos de hoja, tallo y raíz de las diferentes especies no se relaciona con su capacidad de captación de radicales. Por otro lado, el hecho de que los extractos de hojas de las cinco plantas mostraron una actividad analgésica de alta a moderada y/o antiinflamatoria confirma que su uso tradicional está relacionado con su producción de metabolitos secundarios bioactivos.

2.1 ANTIOXIDANT AND ANALGESIC ACTIVITY OF SELECTED MEDICINAL PLANTS FROM THE NATIVE FLORA OF THE YUCATÁN PENÍNSULA^a

Hiatzy Eislin Zapata-Estrella,¹ Fabiola Escalante-Erosa,¹ Karlina García-Sosa,¹ Paulino Sima-Polanco,² Valdir Cechinel Filho,³ Nara L. Meira-Quintão,³ Fátima de Campos-Buzzi,³ and Luis Manuel Peña-Rodríguez¹ *

¹Laboratorio de Química Orgánica, Unidad de Biotecnología, and ²Unidad de Recursos Naturales, Centro de investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, CP 97200, Mérida, Yucatán, México.

³Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas, UNIVALI, Rúa Uruguai, 458 Bloco 17 CEP 88302-202Itajaí, S.C, Brasil.

2.2 ABSTRACT

Context: Reactive oxygen species contribute to maintain conditions of pain and inflammation. Accordingly, antioxidants represent an important source for the development of new *pharmaceuticals*. Presently plants used in traditional medicine, represent an important source of secondary metabolites with antioxidant activity. **Objective:** To evaluate the antioxidant and analgesic activities of crude extracts from five native plants traditionally used to alleviate pain. **Materials and Methods:** The DPPH assay and writhing test were used to evaluate the antioxidant and analgesic activities of the leaf, stem and root extracts of *Acmella pilosa*, *Calea urticifolia*, *Cnidioscolus souzae*, *Critonia aromatisans* and *Scutellaria gaumeri*. Additionally, the formalin test was used to explore action of nociception and anti-inflammatory activity of the extracts of *S. gaumeri* and *C. aromatisans*. **Results and Discussion:** Evaluation of all extracts for their antioxidant and analgesic activities showed that while the leaf extracts of all species had the highest analgesic activity when compared to that of the other extracts of each plant, only the leaf extracts of *C. urticifolia*, *A. pilosa* and *S. gaumeri* showed significant antioxidant activity. The extracts of *C. aromatisans* and *S. gaumeri* inhibited both phases of formalin test and suppressed paw edema, indicating that their analgesic effect is both central and peripheral. **Conclusions:** The results suggest that the analgesic activity of the leaf and other extracts is not related to their radical scavenging ability. Moreover, the fact that the leaf extracts of the five plants showed high to moderate analgesic activity suggest that their traditional use is related to their production of bioactive secondary metabolites.

Keywords: ROS, antioxidant, analgesic, acetic acid writhing test, formalin test

^a Este trabajo ha sido sometido para su publicación al "*Pharmaceutical Biology*"

2.3 INTRODUCTION

Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) are well recognized for playing a dual role as both deleterious and beneficial species (Valko *et al.*, 2007; Salvemini *et al.*, 2011; Ray *et al.*, 2012). Overproduction of ROS results in oxidative stress, a process that can cause damage to cell structures and to membrane lipids, proteins, and DNA (Valko *et al.*, 2007). Recent studies indicate that ROS and oxidative stress are also involved in persistent pain (Schwartz *et al.*, 2009), including neuropathic (Kim *et al.*, 2010; Yowtak *et al.*, 2012) and inflammatory pain (Wang *et al.*, 2004; Ibi *et al.*, 2008), and neurodegenerative disorders such as Alzheimer's (da Silva and Ming 2007) and Parkinson's diseases (Koppula *et al.*, 2012). Presently, pain and inflammation are major public health problems where a correct diagnosis and treatment is necessary (Kumar, 2007). During acute inflammatory pain, macrophages produce nitric oxide and other ROS, pro-inflammatory enzymes and cytokines which are all able to conduct and amplify the nociceptive responses (Coutaux *et al.*, 2005, Cunha *et al.*, 2005).

In order to prevent or limit the effects of oxidative stress, cells must respond to ROS by mounting an antioxidant defense that includes enzymatic and non-enzymatic antioxidants. The former include superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) (Sorg, 2004), while non-enzymatic antioxidants are represented by ascorbic acid (Vitamin C), α -tocopherol (Vitamin E), glutathione (GSH) and secondary metabolites such as carotenoids, (Stahl y Sies 2003) flavonoids (Procházková *et al.*, 2011), and other antioxidants which can be endogenous or taken from the diet (Valko *et al.*, 2007).

New drugs originating from natural products have received a lot of attention and many plant-derived secondary metabolites have effective antinociceptive activities (Calixto *et al.*, 2000). Currently, between 1.5 % and 4.5% of all newly approved drugs used to treat problems of pain and inflammation, respectively, are obtained from natural sources (Newman y Cragg, 2012). Plants are commonly used in the practice of traditional medicine and are well recognized as an important source of secondary metabolites with antioxidant and/or analgesic activities. Phytochemicals well known for their antioxidant activity that act as radical scavengers and/or metal chelators include flavonoids (Coballase-Urrutia *et al.*, 2010; Ferchichi *et al.*, 2012), phenolic acids (Zheng and Wang, 2001; Siquet *et al.*, 2006), coumarin (Kadhum *et al.*, 2011), tannins (Benjemia *et al.*, 2013), stilbenes (Avila *et al.*, 2013), and lignans (Sun *et al.*, 2013). Plants and their antioxidant secondary metabolites

are also known for their potential as analgesics, e.g. the neuroprotective activity of *Eucommia ulmoides* has been related to its ability to decrease ROS production (Kwon *et al.*, 2012); the antioxidant extract of *Taxillus liquidambaricola* has demonstrated antinociceptive and anti-inflammatory activities (Deng *et al.*, 2011), while myricitrin, a flavonol with antioxidant activity, shows a pronounced antinociceptive activity when tested in chemical and mechanical models of pain in rodents (Meotti *et al.*, 2006), and a combination of antioxidants such as vitamin C and vitamin E show an antinociceptive efficacy in mouse models of inflammatory and neuropathic pain (Lu *et al.*, 2011).

It has been reported that, of the estimated 2,500 vascular plants growing in the Yucatan Peninsula, about 30% of them have a registered medicinal use and 11% of these are used to relieve pain or inflammation (Méndez González *et al.*, 2011). As part of a project directed towards the search for bioactive metabolites from plants used in Yucatecan traditional medicine, we wish to describe the use of the DPPH radical reduction assay and the acetic acid writhing and formalin assays to evaluate the antioxidant and analgesic activities, respectively, of the organic crude extracts of leaves, stems and roots of *Acmella pilosa* R.K. Cans Cansen (Asteraceae), *Calea urticifolia* Miller DC (Asteraceae), *Cnidoscolus souzae* McVaugh (Euphorbiaceae), *Critonia aromatisans* R.M. King and H. Rob. (syn. *Eupatorium hemipteropodum*) (Asteraceae) and *Scutellaria gaumeri* Leonard (Lamiaceae), five medicinal plants used in Yucatecan traditional medicine to treat pain and inflammation (Table 1) (Ankli *et al.*, 1999; Durán *et al.*, 1998; Argueta y Gallardo-Vázquez 1994).

Table 2.1 Medicinal plants of the native flora of the Yucatán peninsula used to alleviate pain

Scientific Name	Family	Common name	Ethnomedical uses	Part(s) used
<i>Acmella pilosa</i>	Arteraceae	Tripa de gallina	Toothache	Leaf
<i>Calea urticifolia</i>	Arteraceae	Tok'aban, tsikin, xtokában	Stomachache, gastric ulcers and malaria	Leaf
<i>Cnidoscolus souzae</i>	Euphorbiaceae	Chaya Silvestre, mala mujer, ts'iim, ts'iimchaay	Remedy for rheumatism	Leaf, root, and gum extract
<i>Critonia aromatisans</i>	Arteraceae	Chi' op' le', chiople'	Headache, body pain, diarrhea and rheumatism	Leaf
<i>Scutellaria gaumeri</i>	Lamiaceae	Albahaca; ya'axkakaltuum	Backache, liver inflammation, irritation of the matrix and antipyretic	Leaf Stem

2.4 MATERIALS AND METHODS

GENERAL PROCEDURES

Analytical TLC analyses were carried out using aluminum backed Silica gel (60F254) plates (E.M. Merck, 0.2 mm thickness); the plates were first examined under UV light (254 and 366 nm) and the various components in the chromatograms were visualized by dipping the plates in a solution of phosphomolybdic acid (20 g) and ceric sulfate (2.5 g) in 500 mL of sulfuric acid (5%), followed by drying and gentle heating. All solvents were distilled in the laboratory prior to use.

2.4.1 PLANT MATERIAL

Plant material was collected in November 2009 and identified by field specialist Paulino Simá-Polanco; a voucher specimen of each species was deposited in the Herbarium of Unidad de Recursos Naturales CICY under the appropriate collection number: *Calea urticifolia* (P. Simá 3010) and *Cnidoscolus souzae* (P. Simá 3011) were collected at the 9.5 km mark of the Yaxcabá-Libre Unión highway in Yucatán, México. Plants of *Critonia aromatisans* (P. Simá 3013) and *Scutellaria gaumeri* (P. Simá 3014) were collected along

Highway 40 in Sotuta, Yucatan, México, and plants of *Acmella pilosa* (P. Simá 3015) were collected in the town of Nuevo Campeche, Campeche, México.

2.4.1.1 PREPARATION OF PLANT EXTRACTS

Leaves, stems, and roots of each plant were first dried for three days at room temperature and then for three days in an oven at 50°C. The plant material was ground and extracted by maceration three times with ethanol (400 mL/20 g of plant material) at room temperature for 72 h. After separation of the plant material by successive filtration procedures using cheesecloth and filter paper (Whatman No. 1), the solvent was eliminated under reduced pressure to produce the corresponding crude extracts (Table 2.2).

Table 2.2 Yields of organic crude extracts from five medicinal plants of the native flora of the Yucatán peninsula used to alleviate pain

	%Yield (g)		
	Leaves	Plant part Stems	Root
<i>Acmella pilosa</i>	3.84 (58.4)	3.40 (65.2)	21.59 (48.8)
<i>Calea urticifolia</i>	4.56 (86.1)	2.86 (33.6)	6.23 (46)
<i>Cnidoscolus souzae</i>	8.09 (189.4)	13.3 (124.8)	3.80(100.6)
<i>Critonia aromatisans</i>	3.79 (111.5)	8.11 (146.9)	7.1 (115.9)
<i>Scutellaria gaumeri</i>	4.09 (50.5)	7.11 (38.4)	25.7 (77.3)

L: leaves; S: stems; R: roots

2.4.2 DIPHENYL-1-PICRYLHYDRAZYL (DPPH) RADICAL REDUCTION ASSAY

Qualitative antioxidant activity. Crude extracts were spotted on a TLC plate and eluted with an appropriate solvent system (e.g. chloroform-methanol 9:1). The resulting chromatograms were sprayed with a 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma-Aldrich) ethanolic solution (0.2% w/v). The presence of antioxidant metabolites was detected four hours later by observing yellow spots against a purple background (Nguemfo *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2008).

Quantitative antioxidant activity. A calibration curve of the DPPH bleaching rate by different concentrations of ascorbic acid (Sigma-Aldrich) in methanol was prepared, and a linear regression was performed to correlate the percentage of DPPH discoloration with

the concentration of the test sample. Methanol was used as a blank and a 1% solution of ascorbic acid in methanol was used as positive control. DPPH methanol solutions were freshly prepared every day and kept protected from light. An equal volume of the solvent used to dissolve the samples being tested was added to the control tubes. Measurements were carried out in triplicate and reported as the mean $\pm$ SEM. The initial DPPH concentration was calculated from the calibration curve using the equation determined by linear regression. The antioxidant activity measurements were carried out by adding aliquots of DPPH to a 1% methanol solution of the crude extracts. After 30 min, the absorbance was measured at 517 nm using a spectrophotometer (model SM 110215); DPPH radical scavenging activity was calculated by using the following formula:

$$\% \text{ decoloration} = 1 - Ae/Ac \times 100$$

Where Ae and Ac are the absorbance of the extract and the control, respectively. The antioxidant activity was expressed as EC₅₀, i.e. the amount of antioxidant necessary to decrease the initial DPPH concentration by 50% (Brand-Williams *et al.*, 1995; Molyneux, 2004).

2.5 BIOLOGICAL ASSAYS

Animals. Swiss male mice weighing approximately 35g were randomly assigned to different groups (6-8 animals) and maintained on a commercial diet and water *ad libidum*, in an air-conditioned room at 25 $\pm$ 2 °C (12 h light-darkness cycle, 60 to 80% humidity). All procedures used in the present study followed the "Principles of Laboratory Animal Care" from NIH publication no. 85-23 and were approved by the Animal Ethics Committee of UNIVALI (Protocol numbers 599/2007 UNIVALI). The number of animals and the intensity of noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate consistent effects of the drug treatments.

2.5.1 ANALGESIC ACTIVITY

The acetic acid abdominal constriction test (writhing test) was carried out as described previously (Collier *et al.*, 1968). Mice were intraperitoneally (i.p.) injected with 10 mg/Kg of the different plant extracts or vehicle. The extracts were suspended in Tween 80 (E. Merck) and dissolved in 0.9% NaCl solution; the final concentration of Tween 80 did not exceed 5% and did not cause a biological effect. After 30 min of treatment, 0.1 mL/10g of 0.6% acetic acid was injected i.p. to the mice. The number of abdominal writhes was

counted over a period of 20 min, starting five minutes (T_0) after the administration of the acid. Control animals received a similar volume of vehicle. The analgesic activity was calculated using the formula:

$$\% \text{ of anti-nociceptive activity: } (n - n') \div n \times 100$$

Where n is the average number of writhes of the control group and n' is average number of writhes of test group.

2.5.1.2 FORMALIN TEST

Mice were treated with the organic crude extracts of leaves, roots and stems of *C. aromatisans* and *S. gaumeri* (10 mg/Kg i.p.), or acetylsalicylic acid (ASA 10-60 mg/Kg i.p.) used as positive control, 30 min before formalin injection. The formalin test was carried out as described by Hunskaar and Hole (Hunskaar y Hole, 1987) with minor modifications. Each animal was placed in the chamber 5 min before treatment to allow acclimatization to the new environment; 20 μ L of a 2.5% formalin solution in 0.92% formaldehyde were injected intraplantarely to the right hind paw of the mouse. The mice ($n = 6-8$) were then placed in the observation funnel with a mirror mounted at 45° beneath the floor to allow an unobstructed view of the paw. The time spent licking and biting the injected paw was taken as a measure of nociceptive response. Data collected between 0 to 5 min post-formalin injection represented phase one (early phase) and data collected between 15 to 45 min after injection of formalin represented phase two (late phase). To evaluate both phases, the cumulative time during which the animal kept licking was clocked with a stopwatch. Animals were euthanized 30 min after formalin injection by cervical dislocation, and both paws were cut at the ankle joint and immediately weighed using an analytical balance. The maximum percentage of inhibition, i.e. the antinociceptive activity was calculated as follows:

$$\% \text{ anti-nociceptive activity: } (n - n') \div n \times 100$$

Where n is the average of the amount of time spent licking of the control group and n' is average of the amount of time spent licking of the test group.

2.6 STATISTICAL ANALYSES

The percentages of inhibition were calculated using the entire time course of each experiment and are reported as the mean $\pm$ SEM of inhibition values obtained for each individual experiment. The statistical significance of differences between groups was evaluated by means of a two-way or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post hoc test; p-values lower than 0.05 ($p < 0.05$ or less) were considered significant. Statistical analysis was carried out using the Instant Statistical Package (Graph Pad software, Inc., USA).

2.7 RESULTS AND DISCUSSION

The antioxidant activity of the various extracts was evaluated both qualitatively and quantitatively using the DPPH radical reduction assay. This assay is one of the most commonly used methods for the detection and the bioassay-guided purification of secondary metabolites with antioxidant activity in plant crude extracts (Brand-William *et al.*, 1995; Molyneux, 2004; Thaipong *et al.*, 2006); while the presence of the bioactive metabolites can be detected qualitatively using TLC, the extent of the activity can be measured using a spectrophotometer (Jiang *et al.*, 2008). The DPPH assay has been used for the isolation and identification of phenolic antioxidants in the aqueous extract of *Orthosiphon grandiflorus* (Nuengchamnong, *et al.*, 2011) and the identification of 6-hydroxy-luteolin-7-O-glucoside as the major antioxidant of the extract of the aerial parts of *Athrixiphylicoides* (de Beer, *et al.*, 2011). Similarly, the DPPH assay has been used in the identification of new dicaffeoyl quinic acids with antioxidant activity from *Chrysanthemum morifolium* (Kim y Lee, 2005), to evaluate the antioxidant activity of the various extracts and flavonoids from *Oxytropis falcate* (Jiang *et al.*, 2008), and to demonstrate the radical scavenging abilities of the stilbene acids and flavonoids of *Cajanus cajan* (Wu *et al.*, 2009), the lignans from *Caulis bambusae* (Sun *et al.*, 2013), and the sesquiterpenoids isolated from the methanolic extract of *Heterotheca inuloides* (Coballase-Urrutia *et al.*, 2010).

Testing of the root, stem and leaf extracts of *A. pilosa*, *C. urticifolia*, *C. souzae*, *C. aromatisans* and *S. gaumeri*, for the presence of secondary metabolites with antioxidant activity using the DPPH qualitative assay showed that, even though the leaves of the five species are used in traditional Yucatecan medicine for alleviating pain, only the leaf extract

of *S. gaumeri* showed a significant presence of well-defined, medium-polarity bioactive metabolites (Figure 2.1).

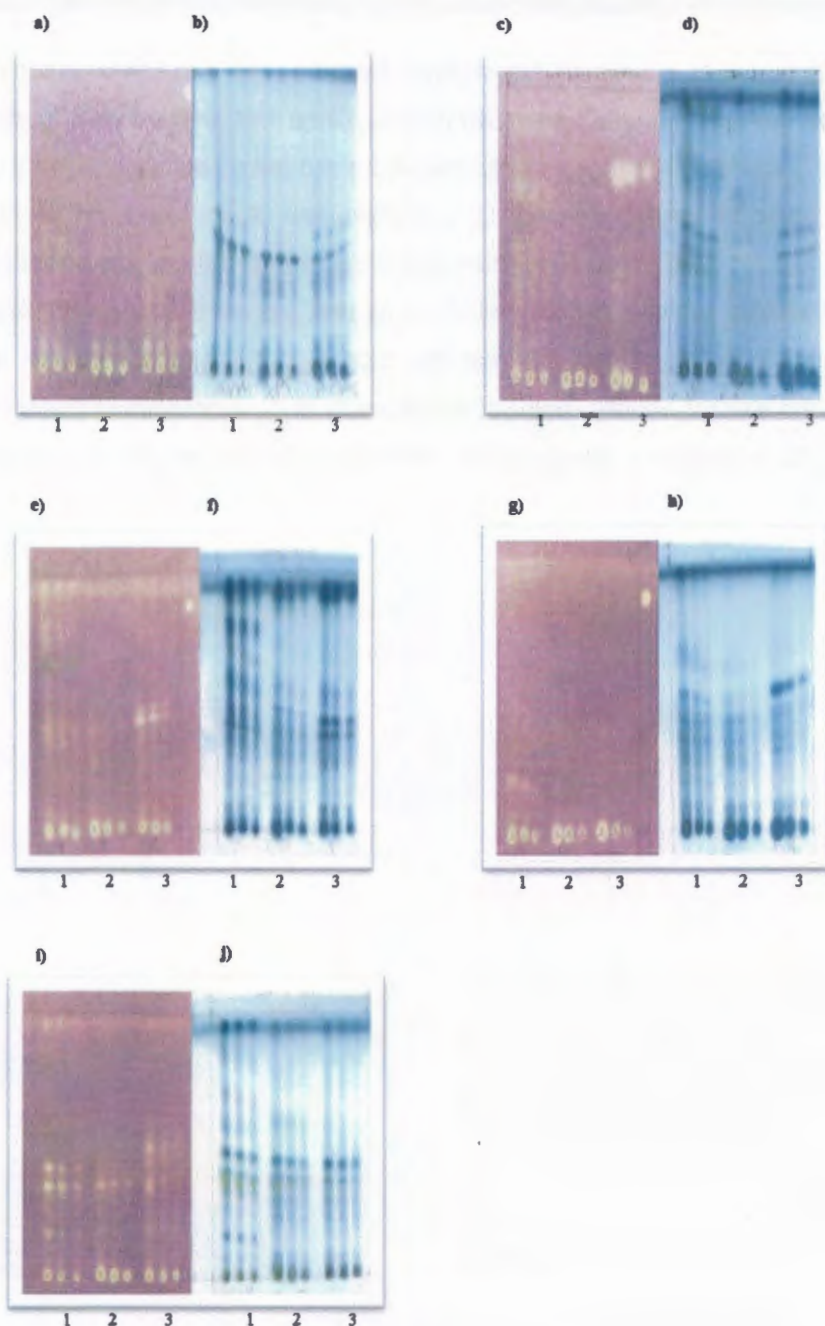


Figure 2.1 Antioxidant activity and TLC-chromatographic profiles of plant crude extracts: 1) leaf, 2) stem, 3) root. Eluant: CH_2Cl_2 : MeOH (95:5). TLC plates sprayed with DPPH (a, c, e, g, i) and phosphomolybdic acid (b, d, f, h, j): *Acmella pilosa* (a, b), *Calea urticifolia* (c, d), *Cnidioscolus souzai* (e, f), *Critonia aromatisans* (g, h), *Scutellaria gaumeri* (i, j).

However, when the antioxidant activity of the various extracts was quantified using the same assay, it was the leaf extracts of *C. urticifolia* and *A. pilosa* that showed an important activity, while the leaf extract of *S. gaumeri* only showed a moderate activity (Table 2.3), suggesting that the bioactive metabolites of *C. urticifolia* and *A. pilosa* were of high polarity. Alternatively, the root extract of *C. souzae*, which showed the presence of several components with antioxidant activity in the qualitative assay, did not show a significant activity in the quantitative assay suggesting that the bioactive metabolites are not the major components of the extract. Finally, none of the extracts of *C. aromatisans* displayed antioxidant activity in the quantitative assay, which coincided with the results observed in the qualitative assay.

Table 2.3 Free radical scavenging activity (DPPH radical reduction assay; expressed as EC₅₀) of leaf (L), stem (S), and root (R) extracts of five medicinal plants of the native flora of the Yucatan peninsula used to alleviate pain

Plants	Extracts	DPPH
		EC ₅₀ (mg/mL)
<i>Acmella pilosa</i>	L	0.735 ±0.04
	S	0.813±0.10
	R	0.431±0.02
<i>Calea urticifolia</i>	L	0.670±0.01
	S	0.481±0.03
	R	0.542±0.01
<i>Cnidoscolus souzae</i>	L	2.188± 0.24
	S	4.384±0.38
	R	1.578± 0.02
<i>Critonia aromatisans</i>	L	3.089± 0.03
	S	5.265± 1.51
	R	3.119± 0.33
<i>Scutellaria gaumeri</i>	L	1.301± 0.02
	S	0.860± 0.02
	R	0.423± 0.001
Ascorbic acid	AcA	0.047± 0.0001

Each value represents the mean ± S.E.M.

There exists a number of animal models to help understand the concepts and mechanisms of pain and to evaluate the analgesic activity of extracts and pure metabolites. One of these models is the abdominal constriction test (writhing test) induced by acetic acid, widely used as a first indicator of analgesic activity (Deraedt, *et al.*, 1980). Although this model is considered as having low specificity, its results are reliable (Le Bars *et al.*, 2001); in this assay, the acetic acid acts indirectly causing the release of nociception endogenous

mediators such as bradykinin, serotonin, histamine, sympathomimetic amines, and prostaglandins. This nociceptive effect can be prevented by NSAIDs, as well as by opioids and analgesics with central action (Ribeiro *et al.*, 2000; Manjavachi *et al.*, 2010).

Evaluation of all extracts for their analgesic activity in the acetic acid-induced writhing test showed that, with the exception of the leaf extract of *C. souzae*, the leaf extracts of all species had the strongest analgesic activity when compared to the activity of the other extracts of each plant (Table 2.4). These results are in agreement with the ethnomedical use of the plants, but do not coincide with the results of the antioxidant activity assay (Table 2.3), nor with a number of reports in the literature that correlate the antioxidant activity detected in the DPPH assay for crude extracts and pure metabolites, with the analgesic activity detected in the writhing test (Deng *et al.*, 2011; Kumar, 2011; Hernández-Ortega *et al.*, 2012). This is particularly evident in the case of *C. aromatisans* since none of its extracts showed a significant antioxidant activity (Table 2.3), but the analgesic activity of both its leaf and root extracts proved to be particularly high (Table 2.4). Similarly, while the three extracts of *A. pilosa* showed a strong antioxidant activity, their analgesic activity could only be considered as moderate. These findings strongly suggest that, even though it is a well-established fact that ROS play an important role in pain (Gao *et al.*, 2007), in this case the analgesic activity is not related to the radical scavenging capacity of the bioactive metabolites.

While there are no reports about the phytochemical components or the biological activity in extracts of *C. aromatisans*, the analgesic activity shown by its leaf and root extracts is in agreement with that reported for the aqueous extracts of the aerial parts of *Eupatorium* spp (Clavin *et al.*, 2000). Similarly, to date there are no reports on the antioxidant or analgesic activities of *C. urticifolia*, although a number of investigations describe its production of sesquiterpene lactones with various biological activities including cytotoxic (Nakagawa *et al.*, 2005), inhibition of NF- κ B (Bork *et al.*, 1997) and activation of factor Nrf2/ARE (Umemura *et al.*, 2008).

The genus *Scutellaria* has been extensively characterized for its antioxidant (Schinella *et al.*, 2002; Peng-fei *et al.*, 2013), analgesic (Yimam *et al.*, 2012), and anti-inflammatory (Guo *et al.*, 2013; Isis and Van Loon, 1997) activities. Phytochemically, the genus is known for its production of flavonoids (Sonoda *et al.*, 2004; Yimam *et al.*, 2012) and other phenolic metabolites (Türkoğlu and Celik, 2010), as well as alkaloids, diterpenoids, volatile

oils and polysaccharides (Shang *et al.*, 2010). However, to date, there are no reports on the phytochemistry or pharmacology of *S. gaumeri*.

It is interesting to mention that even though a number of *Cnidoscolus* spp are reported to contain tannins, saponins, cardiac glycosides, terpenoids and alkaloids, some of them with antimicrobial or anti-inflammatory activities (Aderian *et al.*, 2013; de Sousa Araújo *et al.*, 2008), the phytochemistry and pharmacology of *C. souzae* is unknown. Similarly, while the leaves of some *Cnidoscolus* spp have been reported to be a rich source of natural antioxidants (Kuti and Konuru, 2004), our results show that none of the extracts of *C. souzae* has a particularly high ability to reduce free radicals or has a significant analgesic activity (Tables 2.2 and 2.3).

Table 2.4 Antinociceptive activity (acetic acid writhing test) of leaf (L), stem (S), and root (R) extracts of five medicinal plants of the native flora of the Yucatan peninsula used to alleviate pain

Plant	Extracts	Inhibition (%) 10 mg/kg, i.p.
<i>Acmella pilosa</i>	L	40.7± 3.2**
	S	27.6±3.5**
	R	36.2±4**
<i>Calea urticifolia</i>	L	57.5±5.6***
	S	48.3±4.7**
	R	48.3±1.6**
<i>Cnidoscolus souzae</i>	L	41.0±1.33**
	S	25.2±1.45**
	R	46.8±0.94**
<i>Critonia aromatisans</i>	L	68.2±0.92***
	S	43.7±0.94**
	R	61.8±0.70 ***
<i>Scutellaria gaumeri</i>	L	75.0±1.15***
	S	40.5±1.33**
	R	73.0±1.26***
ASA		35.0

Each group represents the mean ± SEM of six to eight animals. **p values < 0.01 and *** < 0.001 compared with corresponding control values.

Finally, the low analgesic activity of the extracts *A. pilosa*, in spite of being amongst the most active in the DPPH reduction assay, is not in agreement with the analgesic activity reported for the hexane and dichloromethane fractions of the aerial parts and roots of *A. brasiliensis*, both of which significantly reduced the number of constrictions induced by acetic acid. While the analgesic effects of *A. brasiliensis* have been attributed to the

presence of kaurenoic acids and luteolin (Batista *et al.*, 2009; Block *et al.*, 1998), to date there are no reports on the phytochemical components or the biological activity of the extracts of *A. pilosa*.

In order to establish whether the strong analgesic activity detected in the extracts of *S. gaumeri* and *C. aromatisans* was due to a central or peripheral mechanism, the extracts were further evaluated in the formalin test which was also used to determine acute inflammatory pain. The formalin test, as opposed to other traditional pain-evaluating models which consist of brief but high-intensity stimuli, involves moderate, long-lasting pain (Capone and Aloisi, 2004). A subcutaneous injection of formalin used as a peripheral noxious stimulus, causes biphasic nociceptive responses which involve two different mechanisms that take place at different stages. In the early phase, neurogenic pain is caused by the direct chemical stimulation of nociceptive afferent fibers, predominantly C fibers together with A fibers, and reflects centrally-mediated pain which can be suppressed by opiates like morphine (Tjølsen, *et al.*, 1992; Corrêa and Calixto, 1993). In the late phase, inflammatory pain results from the action of inflammatory mediators such as prostaglandins (PGIs), serotonin, histamine and nonapeptidebradykinin (BK) in the peripheral tissues (Corrêa and Calixto, 1993); this type of pain can be inhibited by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (Choi *et al.*, 2001).

The results of the evaluation of the extracts of *C. aromatisans* and *S. gaumeri* in the formalin test showed antinociceptive activity in both the early and late phases for all extracts, including those from the leaves of both plants (Table 2.5). The antinociceptive activity shown by the extracts in the late phase confirmed the analgesic activity observed in the acetic acid-induced writhing model (Table 2.4), while the inhibition of nociception in the later phase indicates that the extracts act in a peripheral way, similar to NSAIDs which are known to be effective against mild and moderate pain (Satyanarayana *et al.*, 2004). Furthermore, the observed antiinflammatory activity of the extracts of *C. aromatisans* and *S. gaumeri*, when tested in the inhibition of formalin-induced paw edema in mice (Table 2.5), suggest that their antinociceptive activity is due, at least in part, to the inhibition of pro-inflammatory mediators associated with the inflammatory pain of the late phase (Corrêa and Calixto, 1993).

These results are in agreement with the reported antinociceptive activity of *Eupatorium triplinerve* in both phases of the test (Parimala *et al.*, 2012) and with the analgesic effect of *E. boniifolium* against inflammatory pain, as well as with the antiinflammatory activity of its

isolated phenolic metabolites when tested in the inhibition of ear edema model (Miño *et al.*, 2005). Finally, a recent report suggests that the clinical antiinflammatory effects of *E. perfoliatum* are correlated with its content of eupafolin and sesquiterpene lactones (Hensel *et al.*, 2011).

As mentioned before, the biological activity of species belonging to the *Scutellaria* genus has been widely documented (Schinella *et al.*, 2002; Peng-Fei *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2013). Recently, it has been reported that the inflammation-modulating action of *S. baicalensis* may be attributable to its inhibition of PGE2 production by suppressing COX-2 activity (Kim *et al.*, 2009); furthermore, the bioactive flavonoid baicalin, isolated from the root of *S. baicalensis*, has been reported to have strong antioxidant activity (Peng-Fei *et al.*, 2013), as well as both analgesic and antiinflammatory activities (Chou *et al.*, 2003) and to be associated with NF- κ B in various acute and chronic inflammation models (Kim *et al.*, 2006).

Table 2.5 Antinociceptive activity of ethanolic extracts obtained from leaves (L), roots (R) and stem (S) from *Critonia aromatisans* and *Scutellaria gaumeri* and ASA (10 mg/kg, i.p.) against the first (0-5 min) and second (15 -30 min) phases of the formalin test in mice

	Extracts	1°Phase	2°Phase	Oedema
<i>Critonia aromatisans</i>	L	42.9±1.3**	25.8±2.2**	36.6±1.3**
	S	53.1±1.4**	37.8±1.9**	35.6±0.7**
	R	48.8±2.0**	34.5±3.0**	34.9±2.4**
<i>Scutellaria gaumeri</i>	L	44.5±2.2**	36.4±2.4**	23.8±0.6**
	S	33.2±2.2**	30.5±2.9**	38.4±0.8**
	R	44.5±2.0**	35.8±4.1**	31.6±0.5**
ASA		16.0	45.0	-

Each group represents the mean ± SEM of six to eight animals *p values < 0.05 and ** < 0.01 compared with the corresponding control values.

2.8 CONCLUSIONS

The results of this investigation confirm the traditional use of the various plants for alleviating pain and suggest that their medicinal properties might be related to the analgesic activity of their bioactive secondary metabolites. The results also indicated that the analgesic effect of the extracts of *A. pilosa*, *S. gaumeri*, *C. aromatisans*, *C. souzae* and *C. urticifolia* is not related to their radical scavenging capacity and that the analgesic effect of the extracts of *S. gaumeri* and *C. aromatisans* is effective against acute and inflammatory pain and that they probably act at the central and peripheral level when administered. Finally, the results of this investigation reflect the importance of the plants used in Yucatecan traditional medicine as a potential source of bioactive metabolites with antioxidant and analgesic activities.

2.9 ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the financial support from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) through their "Programa de Cooperación Bilateral México-Brasil".

Declaration of interest: The authors declare no conflict of interest in this investigation.

2.10 REFERENCES

- Aderian, O. I., O. O. Olajide, N. C. Igwmmar and A. T. Orishadipe (2013). Phytochemical Constituents, Antimicrobial and Antioxidant Potentials of Tree Spinach [*Cnidocolus aconitifolius* (Miller) I. M. Johnston]. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(19), 1317–1322.
- Ankli, A., O. Sticher and M. Heinrich (1999). Medical Ethnobotany of the Yucatec Maya: Healers Consensus as a Quantitative Criterion. *Economic Botany*, 53(2), 144–160.
- Argueta, A. and M. C. Gallardo-Vázquez. (1994). Atlas de Las Plantas de La Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista. D. F México. pp. 968-29-7325.
- Avila, P. R., S. O. Marques, T. F. Luciano, M. F. Vitto, J. Engelmann, D. R. Souza, S. V. Pereira, R. Pinho, F. S. Lira and C. T. De Souza (2013). Resveratrol and Fish Oil Reduce Catecholamine-Induced Mortality in Obese Rats: Role of Oxidative Stress in the Myocardium and Aorta. *The British Journal of Nutrition*, 110(9), 1580–90.
- Batista, R., F. C. Braga and A. B. Oliveira (2005). Quantitative Determination by HPLC of Ent-Kaurenoic and Grandiflorene Acids in Aerial Parts of *Wedelia Paludosa* DC. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15(2), 119–125.
- Benjemia, M., W. Aidi -Wannes, O. Ouchikh, M. Bruno and M. E. Kchouk (2013). Antioxidant Activity of Tunisian *Geranium Robertianum* L. (Geraniaceae). *Natural Product Research*, 27(22), 2076–83.
- Block, L. C., A. R. Santos, M. M. de Souza, C. Scheidt, R. A. Yunes., M. A. Santos, F. D. Monache and V. C. Filho (1998). Chemical and Pharmacological Examination of Antinociceptive Constituents of *Wedelia Paludosa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 61(1), 85–9.
- Bork, P. M., M. L. Schmitz, M. Kuhnt, C. Escher and M. Heinrich (1997). Sesquiterpene Lactone Containing Mexican Indian Medicinal Plants and Pure Sesquiterpene Lactone as Potent Inhibitors of Transcription Factor NF- κ B. *Federation of European Biochemical Societies*, 402, 85–90.
- Brand-Williams, W., M. E. Cuvelier and C. Berset (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
- Capone, F and A. M. Aloisi (2004). Refinement of Pain Evaluation Techniques. The Formalin Test. *Annali dell'Istituto Superiore Di Sanità*, 40(2), 223–229.

- Calixto, J. B., A. Beirith, J. Ferreira, R. Santos, V. C. Filho and R. Yunes (2000). Naturally Occurring Antinociceptive Substances from Plants. *Phytotherapy Research*, 14(6), 401–18.
- Choi, S. S., J. K. Lee and H. W. Suh (2001). Antinociceptive Profiles of Aspirin and Acetaminophen in Formalin, Substance P and Glutamate Pain Models. *Brain Research*, 921(1-2), 233–9.
- Chou, T. C., L. P. Chang, C. Y. Li, C. S. Wong and S. P. Yang (2003). The Antiinflammatory and Analgesic Effects of Baicalin in Carrageenan-Evoked Thermal Hyperalgesia. *Anesthesia y Analgesia*, 97(6), 1724–1729.
- Clavin, L., S. Gorzalczany, J. Min., C. Kadarian and V. Martino (2000). Antinociceptive Effect of Some Argentine Medicinal Species of Eupatorium. *Phytotherapy Research*, 14(4), 275–277.
- Coballase-Urrutia, E., J. Pedraza-Chaverri, R. Camacho-Carranza, N. Cárdenas-Rodríguez, B. Huerta-Gertrudis, O. N. Medina-Campos, M. Mendoza-Cruz, G. Delgado-Lamas and J. J. Espinosa-Aguirre (2010). Antioxidant Activity of Heterotheca inuloides Extracts and of Some of Its Metabolites. *Toxicology*, 276(1), 41–8.
- Collier, H. O., L. C. Dinneen, C. A. Johnson and C. Schneider (1968). The Abdominal Constriction Response and Its Suppression by Analgesic Drugs in the Mouse. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 32(2), 295–310.
- Corrêa, C. R and J. B. Calixto (1993). Evidence for Participation of B1 and B2 Kinin Receptors in Formalin-Induced Nociceptive Response in the Mouse. *British Journal of Pharmacology*, 110(1), 193–8.
- Coutaux, A., A. Frédéric, W. Jean-Claude and D. Le Bars (2005). Hyperalgesia and Allodynia: Peripheral Mechanisms. *Joint, Bone, Spine: Revue Du Rhumatisme*, 72(5), 359–71.
- Cunha, T. M., W. A. Jr. Verri, J. S. Silva, S. Poole, F. Q. Cunha, S. H. Ferreira (2005). A Cascade of Cytokines Mediates Mechanical Inflammatory Hypernociception in Mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(5), 1755–60.
- Da Silva, G. F and L. J. Ming (2007). Metallo-ROS in Alzheimer's Disease: Oxidation of Neurotransmitters by Cull-Beta-Amyloid and Neuropathology of the Disease. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 46(18), 3337–41.
- De Beer, D., E. Joubert, C. J. Malherbe, J. D. Brand (2011). Use of Countercurrent Chromatography During Isolation of 6-Hydroxyluteolin-7-O-β-Glucoside, a Major Antioxidant of *Athrixia phyllicoides*. *Journal of Chromatography*, 1218(36), 6179–86.
- De Sousa Araújo, T. A., N. L. Alencar, E. L. de Amorim, U. P. de Albuquerque (2008). A New Approach to Study Medicinal Plants with Tannins and Flavonoids Contents from the Local Knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*, 120(1), 72–80.
- Deng, J. S., C. S. Chi., S. S. Huang., P. H. Shie., T. H. Lin and G. J. Huang (2011). Antioxidant, Analgesic, and Anti-Inflammatory Activities of the Ethanolic Extracts of *Taxillus Liquidambaricola*. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(3), 1161–71.
- Deraedt, R., Jouquey, S., Delevallee, F and Flahaut, M (1980). Release of Prostaglandins E and F in an Allergic Reaction and Its Inhibition. *European Journal of Pharmacology*, 61 (1), 17–24.

- Durán, R., J. C. Trejo-Torres and G. Ibarra-Manríquez (1998). Endemic Phytotaxa of the Peninsula of Yucatán. *Harvard University Herbaria*, 3(2), 263–314.
- Ferchichi, L., S. Derbré, K. Mahmood, K. Touré, Guilet, D., Litaudon, M., Awang, K., Hadi, A. H., Le Ray, A. M and P. Richomme (2012). Bioguided Fractionation and Isolation of Natural Inhibitors of Advanced Glycation End-Products (AGEs) from *Calophyllum flavoramulum*. *Phytochemistry*, 78, 98–106.
- Gao, X., H. K. Kim, J. M. Chung and K. Chung (2007). Reactive Oxygen Species (ROS) Are Involved in Enhancement of NMDA-Receptor Phosphorylation in Animal Models of Pain. *Pain* 131(3), 262–271.
- Guo, M., N. Zhang, D. Li., D. Liang, Z. Liu., F. Li, Y. Fu, Y. Cao, X. Deng and Z. Yang (2013). Baicalin Plays an Anti-Inflammatory Role through Reducing Nuclear Factor- κ B and P38 Phosphorylation in *S. aureus*-Induced Mastitis. *International Immunopharmacology*, 16(2), 1–6.
- Hensel, A., Maas, M., Sendker, J, Lechtenberg, M. Petereit, F. Deters, A. Schmidt, T. Stark (2011). *Eupatorium perfoliatum* L.: Phytochemistry, Traditional Use and Current Applications. *Journal of Ethnopharmacology* 138(3), 641–651.
- Hernández-Ortega, M., A. Ortiz-Moreno, D. Hernandez-Navarro, Chamorro-Cevallos, G., Dorantes-Alvarez, L., Necoechea-Mondragón, H (2012). Anti-Inflammatory Effects of Carotenoids Extracted from Dried Pepper (*Capsicum annum* L.). *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1–10.
- Hunskar, S., Hole, K (1987). The Formalin Test in Mice: Dissociation Between Inflammatory and Non-Inflammatory Pain. *Pain* 30(1), 103–14.
- Ibi, M., K. Matsuno., D. Shiba, M. Katsuyama, K. Iwata, T. Takehi, T. Nakagawa, K. Sango, Y. Shirai T. Yokoyama, S. Kaneko, N. Saito and C. Yabe-nishimura (2008). Reactive Oxygen Species Derived from NOX1/NADPH Oxidase Enhance Inflammatory Pain. *The Journal of Neuroscience*, 28(38), 9486–9494.
- Isis, M., Van Loon, N. D (1997). The Golden Root: Clinical Applications of *Scutellaria baicalensis* Georgi Flavonoids as Modulators of the Inflammatory Response *Scutellaria*. *Alternative Medicine Review* 2(6),472–480.
- Jiang, H., W. Q. Zhan, X. Liu, S. X. Jiang (2008). Antioxidant Activities of Extracts and Flavonoid Compounds from *Oxytropis falcate* Bunge. *Natural Product Research* 22(18),1650–6.
- Kadhun, A. A., A. A. Al-Amiery, A. Y. Musa, A. B. Mohamad (2011). The Antioxidant Activity of New Coumarin Derivatives. *International Journal of Molecular Sciences* 12(9), 5747–61.
- Kim, D., B. You, E. K Jo, S. K. Han, M. I. Simon and S. G. Lee (2010). NADPH Oxidase 2-Derived Reactive Oxygen Species in Spinal Cord Microglia Contribute to Peripheral Nerve Injury-Induced Neuropathic Pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(33), 14851–6.
- Kim, D. H., H. K. Kim, S. Park, J. Y. Kim, Y. Zou, K. H. Cho, Y. S. Kim, Y. Zou, K. H. Cho, Y. S Kim, D.H. Yu, B.P. Choi, J.S. Chung, H.Y.(2006). Short-Term Feeding of Baicalin Inhibits Age-Associated NF- κ B Activation. *Mechanism of Ageinf and Development*,127(9), 719–725.

- Kim, E. H., B. Shim, S. Kang, G. Jeong, J. S. Lee, Y. B. Yu and M. Chun (2009). Anti-Inflammatory Effects of *Scutellaria baicalensis* Extract via Suppression of Immune Modulators and MAP Kinase Signaling Molecules. *Journal of Ethnopharmacology* 126(2), 320–31.
- Kim, H. J and Y. S. Lee, (2005). Identification of New Dicafeoylquinic Acids from *Chrysanthemum morifolium* and Their Antioxidant Activities. *Planta Medica* 71(9), 871–6.
- Koppula, S., H. Kumar., I. S Kim and D. K. Choi (2012). Reactive Oxygen Species and Inhibitors of Inflammatory Enzymes, NADPH Oxidase, and iNOS in Experimental Models of Parkinson's Disease. *Mediators of Inflammation*, 1–16.
- Kumar, N (2007). WHO Normative Guidelines on Pain Management Report of a Delphi Study to determine the need for guidelines that should be developed by WHO. WHO [Online]., 1–50.
- Kumar, D (2011). Anti-Inflammatory Analgesic, and Antioxidant Activities of Methanolic Wood Extract of *Pterocarpus santalinus* L. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 2(3), 2011–2013.
- Kuti, J. O and H. B. Konuru (2004). Antioxidant Capacity and Phenolic Content in Leaf Extracts of Tree Spinach (*Cnidoscolus* Spp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(1), 117–21.
- Kwon, S. H., M. J. Kim, S. X. Ma, I. J. You, J. Y. Hwang, J. H. Oh, S. Y. Kim, H. C. Kim, S. Y. Lee and C. G. Jang (2012). *Eucommia ulmoides* Oliv. Bark. Protects Against Hydrogen Peroxide-Induced Neuronal Cell Death in SH-SY5Y Cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 142(2), 337–45.
- Le Bars D., M. Gozariu and S. Cadden (2001). Animal Models of Nociception. *Pharmacological Review*, 53 (4), 597–652.
- Lu, R., W. Kallenborn-Gerhardt., G. Geisslinger and A. Schmidtke (2011). Additive Antinociceptive Effects of a Combination of Vitamin C and Vitamin E after Peripheral Nerve Injury. *PLoSOne*, 6 (12),1–9.
- Manjavachi, M. N., N. L. M. Quintão, M. M. Campos, I. K. Deschamps, R. Yunes, R. J. Nunes and J. B. Calixto (2010). The effects of the selective and non-peptide CXCR2 receptor antagonist SB225002 on acute and long-lasting models of nociception in mice. *European journal of pain*, 14(1), 23–31.
- Méndez González, M. E., R. García-Durán., M. S. Bobadilla-Campos and A. Dorantes Euan. (2011). "Flora Medicinal in Biodiversidad y Desarrollo Humano En Yucatán", Méndez González, M. E., R. García-Durán. (ed). PPD-FMAM, CONABIO, SEDUMA, Mérida Yucatán, México. pp349– 352.
- Meotti, F. C., A. P. Luiz., M. G. Pizzolatti, C. A. Kassuya, J. B. Calixto and A. R Santos (2006). Analysis of the Antinociceptive Effect of the Flavonoid Myricitrin: Evidence for a Role of the L-Arginine-Nitric Oxide and Protein Kinase C Pathways. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 316(2), 789–796.
- Miño, J., L. Muschietti., G. Ferraro., V. Martino and C. Acevedo (2005). Antinociceptive Activity of *Eupatorium buniifolium* Aqueous Extract. *Fitoterapia*, 76(1),100–103.

- Molyneux, P (2004). The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl- Hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *The Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211–219.
- Nakagawa, Y., M. Linuma, N. Matsuura., K. Yi, M. Naoi, T. Nakayama, Y. Nozawa and Y. Akao (2005). A Potent Apoptosis-Inducing Activity of a Sesquiterpene Lactone, Arucanolide, in HL60 Cells: A Crucial Role of Apoptosis-Inducing Factor. *Journal of Pharmacological Sciences*, 97(2), 242–252.
- Newman, D. J and G. M Cragg (2012). Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal Natural Product*, 75(3), 311-335.
- Nguemfo, E. L., T. Dimo, A. B. Dongmo, A. G. Azebaze, Alaoui, K., Asongalem, A. E., Cherrah, Y and P. Kamtchouing (2009). Anti-Oxidative and Anti-Inflammatory Activities of Some Isolated Constituents from the Stem Bark of *Allanblackia monticola* Staner L. C (Guttiferae). *Inflammopharmacology*, 17(1): 37–41.
- Nuengchamnong, N., K. Krittasilp and K. Ingkaninan (2011). Characterisation of Phenolic Antioxidants in Aqueous Extract of *Orthosiphon grandiflorus* Tea by LC–ESI-MS/MS Coupled to DPPH Assay. *Food Chemistry*, 127(3), 1287–1293.
- Parimala, K., B. Varghese-Cheriyann, and S. Viswanathan (2012). Anti-inflammatory activity of petroleum- ether extract of *Eupatorium triplinerve* Vahl. " *International Journal of Life and Pharma Research*, 2(3), 12–18.
- Peng-Fei, L., H. Fu-Gen and D. Bin-Bin (2013). Purification and Antioxidant Activities of Baicalin Isolated from the Root of Huangqin (*Scutellaria baicalensis* Gcoursi). *Journal of Food Science and Technology*, 50(3), 615–619.
- Procházková, D., I. Boušová and N. Wilhelmová (2011). Fitoterapia Antioxidant and Prooxidant Properties of Flavonoids. *Fitoterapia*, 82(4), 513–523.
- Ray, P. D., B. W. Huang and Y. Tsuji (2012). Reactive Oxygen Species (ROS) Homeostasis and Redox Regulation in Cellular Signaling. *Cellular Signalling*, 24(5), 981–990.
- Ribeiro, RA., M. L. Vale, S. M. Thomazzi, A. B. Paschoalato, S. H. Ferreira, F. Q. Cunha (2000). Involvement of Resident Macrophages and Mast Cells in the Writhing Nociceptive Response Induced by Zymosan and Acetic Acid in Mice. *European Journal of Pharmacology*, 387(1), 111–8.
- Salvemini, D., J. W. Little, T. Doyle and W. L. Neumann (2011). Roles of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Pain. *Free Radical Biology y Medicine* 51(5),951–66.
- Satyanarayana, P. S., N. K. Jain, A. Singh and S. K. Kulkarni (2004). Isobolographic Analysis of Interaction Between Cyclooxygenase Inhibitors and Tramadol in Acetic Acid-Induced Writhing in Mice. *Progress in Neuropsychopharmacology y Biological Psychiatry*, 28(4), 641–9.
- Schinella, G. R, H. A. Tournier, J. M. Prieto, P. Mordujovich de Buschiazzo and J. L. Ríos (2002). Antioxidant Activity of Anti-Inflammatory Plant Extracts. *Life Sciences*, 70(9),1023–1033.
- Schwartz, E. S., H. Y. Kim, J. Wang., I. Lee, E. Klann, J. M. Chung and K. Chung (2009). Persistent Pain Is Dependent on Spinal Mitochondrial Antioxidant Levels. *Journal of Neuroscience*, 29, 159–168.

- Shang, X., X. He, M. Li, R. Zhang., P. Fan, Q. Zhang and Z. Jia (2010). The Genus *Scutellaria* an Ethnopharmacological and Phytochemical Review. *Journal of Ethnopharmacology*, 128(2), 279–313.
- Siquet, C., F. Paiva-Martins, J. L. Lima., S. Reis and F. Borges (2006). Antioxidant Profile of Dihydroxy- and Trihydroxyphenolic Acids-A Structure-Activity Relationship Study. *Free Radical Research*, 40(4), 433–42.
- Sonoda, M., T. Nishiyama, Y. Matsukawa and M. Moriyasu (2004). Cytotoxic Activities of Flavonoids from Two *Scutellaria* Plants in Chinese Medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 91(1), 65–68.
- Sorg, O (2004). Oxidative Stress: A Theoretical Model or a Biological Reality? *Comptes Rendus Biologies*, 327 (7), 649–662.
- Stahl, W and H. Sies (2003). Antioxidant Activity of Carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24 (6), 345–351.
- Sun, J., Yu, J., P. C. Zhang., F. Tang., Y. D. Yue., Y. N. Yang., Z. M. Feng and X. F. Guo (2013). Isolation and Identification of Lignans from *Caulis bambusae* in *Taenia* with Antioxidant Properties. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 61(19), 455–62.
- Thaipong, K., U. Boonprakob, K. Crosby, L. Cisneros-Zevallos and D. Hawkins Byrne (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC Assays for Estimating Antioxidant Activity from Guava Fruit Extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), 669–675.
- Tjølsen, A., O. G. Berge., S. Hunskaar., J. H. Rosland and K. Hole (1992). Review Article The Formalin Test: an Evaluation of the Method. *Pain* 51(1): 5–17.
- Türkoğlu, S and S. Celik (2010). Determination Antioxidant Capacity of Water and Ethanol Extracts. *Turkish Journal of Science y Technology*, 5(2), 59–68.
- Umemura, K., T. Itoh, N. Hamada, Y. Fujita., Y. Akao., Y. Nozawa., N. Matsuura., M. Linuma and M. Ito (2008). Preconditioning by Sesquiterpene Lactone Enhances H₂O₂-Induced Nrf2/ARE Activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 368(4), 948–54.
- Valko, M., D. Leibfritz., J. Moncol., T. D. Mark., C. Milan Mazur and J. Telser (2007). Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. *The International Journal of Biochemistry*, 39, 44–84.
- Wang, Z. Q., F. Porreca., S. Cuzzocrea., K. Galen., R. Lightfoot, E. Masini, C. Muscoli, V. Mollace., M. Ndengele., H. Ischiropoulos and D. Salvemini (2004). A Newly Identified Role for Superoxide in Inflammatory Pain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 309(3), 869–878.
- Wu, N., K. Fu, Y. J. Fu, Y. G. Zu, F. R. Chang, Y. H. Chen, X. L. Liu, Y. Kong, W. Liu and C. B. Gu (2009). Antioxidant Activities of Extracts and Main Components of *Pigeonpea* [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] Leaves. *Molecules*, 14 (3), 1032–43.
- Yimam, M., L. Brownell., M. Hodges and Q. Jia (2012). Analgesic Effects of a Standardized Bioflavonoid Composition from *Scutellaria baicalensis* and *Acacia catechu*. *Journal of Dietary Supplements*, 9(3), 155–65.

- Yowtak, J., K. Y. Lee., H. Y. Kim., J. Wang., H. K. Kim., K. Chung and J. M. Chung (2012). Reactive Oxygen Species Contribute to Neuropathic Pain by Reducing Spinal GABA Release. *Pain*, 152(4), 844–852.
- Zheng, W and S. Y Wang (2001). Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5165–5170.

CAPÍTULO III METABOLITOS BIOACTIVOS DE *Cnidoscolus souzae* Y *Acmella pilosa*.

DESCRIPCION DEL CAPÍTULO

La evaluación de la actividad antioxidante y analgésica de los extractos etanólicos crudos, fracciones semipurificadas y productos puros de *Acmella pilosa* y *Cnidoscolus souzae*, dos plantas de la flora nativa de la Península de Yucatán utilizadas en la medicina tradicional para tratar problemas de inflamación y el dolor, demostró que el ácido rosmarínico (1) y el ácido cafeico (2) son los principales metabolitos bioactivos de *A. pilosa*, en tanto que el 7-deoxinimbidiol (4) se identificó como el principal metabolito bioactivo de *C. souzae*. Los metabolitos 1, 2, y 4 resultaron ser responsables de la actividad antioxidante detectada originalmente en los extractos crudos orgánicos correspondientes; 7-deoxinimbidiol (4) mostró una buena actividad analgésica y antiinflamatoria, inhibiendo el dolor inducida por PGE2 y reduciendo el edema inducido por carragenina, respectivamente.

3.1 BIOACTIVE METABOLITES FROM *Cnidoscolus souzae* AND *Acmella pilosa*²

Hiatzy E. Zapata-Estrella^{a†}, Azeret D. M. Sánchez-Pardenilla^{a†}, Karlina García-Sosa^a, Fabiola Escalante-EROa^a, Fátima de Campos-Buzzi^{b,c}, Nara Lins Meira-Quintão^c, Valdir Cechinel-Filho^{b,c} and Luis M. Peña-Rodríguez^a

^a Laboratorio de Química Orgánica, Unidad de Biotecnología, Centro de investigación Científica de Yucatán,

Calle 43 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, CP 97200, Mérida, Yucatán, México

^b Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas, ^cPost-graduate Programo of Pharmaceutical Science, UNIVALI,

Rúa Uruguai, 458 Bloco 17 CEP 88302-202 Itajaí, S. C, Brazil

² Este artículo ha sido publicado en Natural Product Communications Natural Product Communications 9(9), 1319-1321 (2014).

3.2 ABSTRACT

The bioassay-guided purification of the ethanolic extracts of *Acmella pilosa* and *Cnidoscolus souzae*, two plants of the native flora of the Yucatánpenínsula used in traditional medicine to treat inflammation and pain, resulted in the identification of rosmarinic acid (1) and caffeic acid (2) as the bioactive metabolites from *A. pilosa*, and of 7-deoxynimbidiol (4) as the major bioactive metabolite from *C. souzae*. Metabolites 1, 2, and 4 Proved to be responsible for the antioxidant activity originally detected in the corresponding organic crude extracts; 7-deoxynimbidiol (4) showed good analgesic and antiinflammatory activities, inhibiting the pain induced by PGE2 and reducing the oedema induced by carrageenan, respectively.

3.3 INTRODUCTION

It has been reported that, of the estimated 2,500 vascular plants growing in the Yucatánpenínsula in Mexico, about 30% of them have a registered medicinal use and 11% of these are used to relieve pain or inflammation (Méndez-González *et al.*, 2011) *Acmella pilosa* R. K. Cansen (Asteraceae) and *Cnidoscolus souzae* Mc Vaugh (Euphorbiaceae) are two plants commonly used in Yucatecan traditional medicine for the treatment of various inflammatory pain diseases.

To date there are no reports on the phytochemical components of *A. pilosa*, a plant commonly known as “tripa de gallina” in Yucatán, where is used as an anesthetic and to treat toothache and anemia (Duran *et al.*, 1998, Ankli *et al.*, 1999); phytochemical studies of *A. brasiliensis* (syn *Wedelia paludosa*) have resulted in the isolation of kaurenoic acid and luteolin (Block *et al.*, 1998).

Similarly, and although the *Cnidoscolus* genus is known for its high contents of vitamin C and β -carotene (Ranhotra *et al.*, 1998) and a number of phytochemical reports describe the isolation of coumarins and glycosidic flavonoids (Koltermann *et al.*, 1984, Yuan *et al.*, 2007) little is known about the phytochemical components of *C. souzae*, an endemic plant to the Yucatánpenínsula where is commonly known as “chaya silvestre” or “ts'iim Chaay” and where is used as a traditional remedy for the treatment of rheumatism, gastrointestinal disorders and inflammation (Duran *et al.*, 1998, Ankli *et al.*, 1999).

Recently, as part of our search for new analgesics and anti-inflammatories from medicinal plants of the endemic flora of the Yucatán península, we reported the presence of both antioxidant and analgesic activities in the stem extract of *A. pilosa* and the root extract of

C. souzae (Zapata-Estrella *et al.*, 2014); we wish to report herein on the isolation and identification of the metabolites responsible for the biological activity detected in the organic crude extracts of each plant.

3.4 MATERIALS AND METHODS

3.4.1 GENERAL PROCEDURES

NMR spectra (^1H , ^{13}C) and two-dimensional experiments (COSY, HSQC and HMBC) were acquired on an Avance III 500 system (Bruker, Germany). HRESIMS were measured using an LC (D)ESI/LTQ Orbitrap (Thermo Scientific). HPLC analyses were run in a Waters 600 HPLC system, equipped with a pump system (Waters Model 600 Controller), an autosampler (Waters 717 Plus), and a dual absorbance detector (210 and 280 nm, Waters Model 2487), using a Gemini C18-110A column (150 x 4.6 mm, Phenomenex 5 μM), with a flow rate of 1 mL / min. Gradient elution was carried out using mixtures of 0.005% formic acid (JT Baker) and acetonitrile (JT Baker).

Column chromatography (CC) was carried out using silica gel 60 (70-230 mesh, Sigma), while silica gel 200-400 mesh (Sigma) was used for flash CC; vacuum liquid chromatography (VLC) purifications were carried out using TLC-grade silica gel (Merck). Gel permeation was performed using Sephadex LH-20 (Sigma). Preparative TLC purifications were carried out using glass-backed 20x20 cm silica gel plates (0.25 mm thickness, Merck). Analytical TLC analyses were carried out using aluminum-backed silica gel plates (E. M. Merck, 0.2 mm thickness); chromatograms were examined under UV light and then visualized by dipping the plates in a solution of phosphomolybdic acid (20 g) and ceric sulfate (2.5 g) in 500 mL of sulfuric acid (5%), followed by drying and heating.

3.4.2 PLANT MATERIAL

Plant material was collected in November 2009; a voucher specimen of each species was deposited in the Herbarium of Unidad de Recursos Naturales CICY. *C. souzae* (P. Simá 3011) was collected at the 9.5 km mark of the Yaxcabá-Libre Unión highway in Yucatán, Mexico and plants of *A. pilosa* (P. Simá 3015) were collected in Nuevo Campeche, Campeche, México.

3.4.2 PREPARATION OF PLANT EXTRACTS

Dry, ground roots of *C. souzae* (2641 g) and stems of *A. pilosa* (1971 g) were extracted three times (72 h ea) by maceration with ethanol (400 mL of solvent/20 g of plant material). Evaporation of the solvent produced the corresponding crude extracts CS-1 (100.6 g) and AP-1 (65.2 g).

3.4.2.1 ISOLATION OF BIOACTIVE METABOLITES OF *A. pilosa*

The AP-1 extract was suspended in 500 mL of a 3:2 H₂O:MeOH mixture and the resulting suspension was partitioned successively between hexane and EtOAc. A portion (1.33 g) of the bioactive EtOAc fraction was passed through a Sephadex LH-20 column eluting with chloroform:MeOH:hexane 1:1:2 and 1:4:1 to yield six fractions (C1-C6). Fraction C4 (263.6 mg) was identified as rosmarinic acid (**1**) by comparing its spectroscopic data to those reported (Reza-Gohari *et al.*, 2009, Petersen and Simmonds 2003). Purification of a second portion (5.25 g) of the EtOAc fraction using column chromatography (EtOAc:acetone:hexane, 2:3:5) and multiple elution (3x) preparative-TLC (CH₂Cl₂:MeOH:hexane, 70:10:20) resulted in the isolation and identification of rosmarinic acid ethylester (**3**) (5.4 mg) and caffeic acid (**2**) (5.7 mg), identified by comparing its data with those in the literature (Olthof *et al.*, 2001, Gülçin, 2006).

3.4.2.2 ISOLATION OF BIOACTIVE METABOLITES OF *C. souzae*

The CS-1 extract was suspended in 250 mL of a 3:2 mixture of H₂O-EtOH and partitioned successively between hexane and EtOAc. VLC purification of the active hexane fraction (15 g), using a gradient elution with mixtures of hexane:acetone:MeOH produced 12 major fractions (A1-A12). Fraction A6 (2.32 g) was purified by column chromatography eluting with hexane:EtOAc:MeOH 80:18:2 to produce nine new fractions (B1-B9). Final purification of fraction B5 (289.9 mg) using flash chromatography and an isocratic elution with chloroform:hexane:MeOH 60:35:5 resulted in the isolation of pure 7-deoxynimbidiol (**4**) (95.7 mg) identified by comparing its spectroscopic data with those previously reported (Guginskiet *al.*, 2009).

3.4.3 DIPHENYL-1-PICRYLHYDRAZYL (DPPH) RADICAL SCAVENGING ASSAY

Quantitative antioxidant activity. A calibration curve of the DPPH bleaching rate by different concentrations of ascorbic acid (Sigma-Aldrich) in methanol was prepared. Methanol was used as a blank and a 1% solution of ascorbic acid in methanol was used as positive control. An equal volume of the solvent used to dissolve the samples was added to the control tubes. Measurements were carried out in triplicate. The initial DPPH concentration was calculated from the calibration curve using the equation determined by linear regression. The antioxidant activity measurements were carried out by adding DPPH aliquots to a 1% methanol solution of the test samples. After 30 min, the absorbance was measured at 517 nm using a spectrophotometer; DPPH radical scavenging activity was calculated by using the following formula: % decoloration = $1 - Ae/Ac \times 100$. Where Ae and Ac are the absorbance of the extract and the control, respectively. The antioxidant activity was expressed as EC₅₀, i.e. the amount of antioxidant necessary to decrease the initial DPPH concentration by 50%.

3.4.4 IN VIVO ASSAYS

Swiss male mice weighing approximately 35 g were randomly assigned to different groups (6-8 animals) and maintained on a commercial diet and water *ad libitum*, in an air-conditioned room at 25±2 °C (12 h light-darkness cycle, 60 to 80% humidity). All procedures in the present study followed the "Principles of Laboratory Animal Care" from NIH publication no. 85-23 and were approved by the Animal Ethics Committee of UNIVALI (Protocol numbers 599/2007 UNIVALI). The number of animals and the intensity of noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate consistent effects of the treatments.

3.4.1 MECHANICAL HYPERALGESIA INDUCED BY CARRAGEENAN, PROSTAGLANDIN E2 (PGE2) OR BRADYKININ (BK).

To evaluate mechanical hyperalgesia of the crude extract (1 mg/Kg), semipurified fractions (1 mg/Kg), and purified metabolite (0.1 mg/Kg) from *C. souzae*, samples were injected intraperitoneally (i.p) to mice that had received an intradermal (i.d) injection of carrageenan (300 µg/paw), PGE2 (3 nmol/paw) or BK (500 ng/paw), 30 min before

initiating the experiment. The vehicle (0.9% NaCl solution) used to administer the samples was used as control (10 mL/kg). When administering BK, mice were pretreated with a subcutaneous (sc) injection of Captopril (5 mg/Kg) 60 min prior to the experiment. Mechanical hyperalgesia was measured using the von Frey hairs (VFH) as follows: mice were placed individually in clear plexiglas boxes (9 × 7 × 11 cm), on elevated wire mesh platforms, to allow access to the ventral surface of the right hind-paw. The animals were allowed to acclimatize for 30 min before behavioral testing. The withdrawal response frequency was measured at different times after the injection, following 10 applications (1 s each) of VFH. The stimuli were delivered from below, to the plantar surface of the right hindpaw. The VFH of 0.6 g produces mean withdrawal frequency of about 15%, which is considered to be an adequate value for the measurement of mechanical hyperalgesia (Rocha *et al.*, 2006).

3.5 CARRAGEENAN-INDUCED PAW OEDEMA

Animals were pretreated i.p. with root extract of *C. souzae* (1mg/kg), 7-deoxynimbidol (4) (0.1mg /kg) or vehicle (0.9 % NaCl solution, 10 mL/kg); after 30 min they received an i. d injection of carrageenan (300 µg/paw) in one hindpaw (right paw). The contralateral hindpaw (left paw) received an i. d injection of saline solution and was used as control. Oedema was measured using a plethysmometer (Ugo Basile) at different time points after injection of carrageenan. Inhibition of oedema is expressed as the difference in µL between the right and left paws (Bortalanza *et al.*, 2002, Posadas *et al.*, 2004).

3.6 STATISTICAL ANALYSES

The percentages of inhibition were calculated using the entire time course of each experiment and are reported as the mean of inhibitions obtained for each individual experiment. The statistical significance of differences between groups was evaluated by means of a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post hoc test and Dunnett's post hoc test. P-values lower than 0.05 ($P < 0.05$ or less) were considered significant. Statistical analysis was carried out using the Instant Statistical Package (Graph pad software, Inc., USA).

3.7 RESULTS AND DISCUSSION

Analyses of the crude extracts of *A. pilosa* and *C. souzae* showed, in each case, the presence on TLC of a major component with antioxidant activity when tested in the DPPH

radical scavenging assay (Reza-Gohari *et al.*, 2009). The bioassay-guided purification of the extract of *A. pilosa* resulted in the isolation and identification of rosmarinic acid (1) (Petersen y Simmond, 2003), a bioactive metabolite commonly found in plants from the Boraginaceae and Lamiaceae families (Jeong *et al.*, 2011), together with two minor bioactive metabolites identified as caffeic acid (2) and rosmarinic acid ethyl ester (3) (Eun-Rhan y Mei Shan, 2004, Gülçin, 2006, Campos *et al.*, 2009, Gamaro-Duzzo *et al.*, 2011). However, the absence of the ester 3 in the HPLC chromatographic profile of the acetone extract of *A. pilosa* confirmed it being an artifact of the extraction process. Purification of the root extract of *C. souzae* resulted in the identification of 7-deoxynimbidiol (4), a metabolite previously isolated from *Celastrus hypoleucus* Oliv. Warb ex Loes (Celastraceae) and reported to have good anti-tumor activity (Guginski *et al.*, 2009) (Figure 3.1).

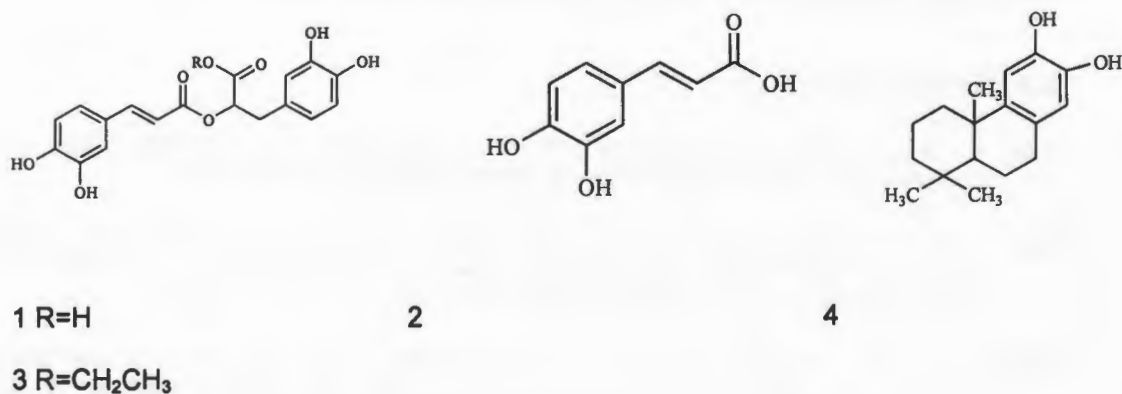


Figure 3.1 Metabolites isolated stem extract from *Acmella pilosa* rosmarinic acid (1), caffeic acid (2), rosmarinic acid ethyl ester (3) and 7-deoxynimbidiol (4) of *C. souzae* root extract.

Although the antioxidant activity of 4 in the DPPH radical scavenging assay (EC_{50} 0.60 μ M) indicated it being the main bioactive in the crude extract of *C. souzae* (EC_{50} 1.58 $\pm$ 0.02 mg/mL) and its semipurified hexane fraction (EC_{50} 0.75 $\pm$ 0.03 mg/mL), the purified metabolite did not show a significant analgesic activity when tested in the mechanical hyperalgesia induced by carrageenan assay (Xiong *et al.*, 2006), while the crude extract did show a moderate activity (30.8 %, $p < 0.01$) in the same assay. However, testing of

both the root extract of *C. souzae* and 4 for analgesic activity in the inhibition of pain induced by prostaglandin E2 (PGE2) or bradykinin (BK) (Salvemini *et al.*, 1996) showed them being active against the pain induced by PGE2 (63.0 and 52.7 %, $p < 0.001$, respectively). Additionally, the purified metabolite caused a significant reduction (40.7%, $p < 0.01$) in the oedema induced by carrageenan. These results suggest that the anti-oedematogenic effect of 4 might be due, at least in part, to its antioxidant activity and to the participation of PGE2. This is the first report of 4 as a secondary metabolite from *C. souzae* and as a bioactive metabolite with an important radical scavenging, analgesic and antiinflammatory activities.

3.8 ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Ingrid Fruze and Pascal Richomme, University of Angers, France, for HRESIMS measurements. The financial support from Mexico's Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) and Brasil's Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), through their "Programa de Cooperación Bilateral México-Brasil", is also greatly appreciated.

3.9 REFERENCES

- Ankli, A., S. Otto and H. Michael (1999). Medical ethnobotany of the Yucatec Maya: Healers consensus as a quantitative criterion. *Economic Botany*, 53(2), 144–160.
- Block, L. C., A. R. Santos, M. M. de Souza, C. Scheidt, R. A. Yunes, M. A. Santos, F. D. Monache and V. C. Filho (1998). Chemical and pharmacological examination of antinociceptive constituents of *Wedelia paludosa*. *Journal of Ethnopharmacol*, 61(1), 85–9.
- Bortalanza, L. B., J. Ferreira, S. C. Hess, F. Delle Monache, R. A. Yunes and J. B. Calixto (2002). Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. *European Journal of Pharmacology*, 453, 203–8.
- Campos, De F., C. L. Franzoi, G. Antonini, M. Fracasso, V. Cechinel-Filho, Augusto, Y. R. and R. Niero (2009). Antinociceptive properties of caffeic acid derivatives in mice. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(11), 4596–4602.
- Durán, R., J. C. Trejo-Torres and G. Ibarra-Manríquez (1998). Endemic phytotaxa of the Península of Yucatán. *Harvard University Herbaria*, 3(2), 263–314.
- Eun-Rhan, W and P. Mei Shan (2004). Antioxidative constituents from *Lycopus lucidus*. *Archives of Pharmacol Research*, 27, 173–6.

- Gamaro-Duzzo, G., E. Suyenaga, M. Borsoi, J. Lermen, P. Pereira, and P. Ardenghi (2011). Effect of rosmarinic and caffeic acids on inflammatory and nociception process in rats. *International Scholarly Research Network* 2011,1-6.
- Guginski, G., A. P. Luiz, M. D. Silva, M. Massaro, D. F. Martins, J. Chaves and A. R. S. Santos (2009). Mechanisms involved in the antinociception caused by ethanolic extract obtained from the leaves of *Melissa officinalis* (lemon balm) in mice. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 93,10–6.
- Gülçin, I (2006). Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217(2-3), 213–20.
- Jeong, C.H., H. R. Jeong, G. N. Choi, D. O. Kim, U. Lee, H. J. Heo (2011). Neuroprotective and anti-oxidant effects of caffeic acid isolated from *Erigeron annuus* leaf. *Chinese Medicine*, 6, 25.
- Koltermann, D. A., G. J. Breckon and R. R. Kowal (1984). Chemotaxonomic Studies in *Cnidioscolus* (Euphorbiaceae). II. Flavonoids of *C. aconitifolius*, *C. souzae* and *C. spinosus*. *Systematic Botany*, 7, 178–185.
- Méndez González, M. E., R. Garcia-Durán., M. S. Bobadilla-Campos and A. Dorantes Euan (2011). "Flora Medicinal in Biodiversidad y Desarrollo Humano En Yucatán", Méndez González, M. E., R. Garcia-Durán. (ed). PPD-FMAM, CONABIO, SEDUMA, Mérida Yucatán, México. pp349– 352.
- Olthof, M. R, P. C. H. Hollman, M. B Katan (2001). Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans. *Journal of Nutrition*, 131, 66–71.
- Posadas, I., M. Bucci, F. Roviezzo, A. Rossi, L. Parente, L. Sautebin and G. Cirino (2004). Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *British Journal of Pharmacology*, 142, 331–8.
- Petersen, M and M. Simmonds (2003). Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62, 121–5.
- Ranhotra, G. S., J. A. Gelroth, S. D. Leinen and M. A. Vin (1998). Nutritional Profile of Some Edible Plants from México. *Journal of Food Composition and Analysis*, 304, 298–304.
- Reza-Gohari, A. S. Soodabeh, A. R. Shahverdi, N. Yassa, M. Malmir, K. Mollazade and A. R. Naghinejad (2009). Phytochemistry and antimicrobial compounds of *Hymenocrater calycinus*. *EurAsian Journal of Biosciences*, 68, 64–68.
- Rocha, A. C., E. S. Fernandes, N. L. Quintão, M. M. Campos and J. B. Calixto (2006). Relevance of Tumour Necrosis Factor-Alpha for the Inflammatory and Nociceptive Responses Evoked by Carrageenan in the Mouse Paw. *British Journal of Pharmacology*, 148(5), 688–95.
- Salvemini, D., Z. Q. Wang, P. S. Wyatt, D. M. Bourdon, M. H. Marino, P. T. Manning and M. G. Currie (1996). Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *British Journal of Pharmacology*, 118, 829–838.
- Xiong, Y., K. Wang, Y. Pan, H. Sun and J. Tu (2006). Isolation, synthesis, and anti-tumor activities of a novel class of podocarpic diterpenes. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 16, 786–9.

- Yuan, W., S. Li, S. Ownby, Z. Zhang, P. Wang, W. Zhang and R.S. Beasley (2007). Flavonoids, coumarins and triterpenes from the aerial parts of *Cnidocolus texanus*. *Planta Medica*, 73, 1304–8.
- Zapata-Estrella, H. E., S. Sima-Polanco, F. Escalante-Erosa, K. García-Sosa, V. Cechinel-Filho, N. L. Meira-Quintão and L. M. Peña-Rodríguez (2014). Antioxidant, analgesic, and antiinflammatory activity of medicinal plants from the native flora of the Yucatán peninsula. *Journal of Ethnopharmacology*. Submitted.

CAPÍTULO IV ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, ANALGÉSICA Y ANTI-INFLAMATORIA DE LOS METABOLITOS BIOACTIVOS DEL EXTRACTO DE RAÍZ DE *Calea urticifolia*

DESCRIPCION DEL CAPÍTULO

La evaluación de la actividad antioxidante y analgésica del extracto crudo, fracciones purificadas y metabolitos puros de la raíz de *Calea urticifolia* demostró que tres isómeros del éster metílico del ácido dicafeoilquínico: 3,4-O-dicafeoilquínico (3), 3,4-O-dicafeoil-epiquínico (4) 3,5-O-dicafeoyl-epi-quínico (5) y el ácido 3,5-O-dicafeoilquínico (6) son los metabolitos responsables de la actividad antioxidante en el extracto crudo. Además los resultados mostraron que la actividad analgésica detectada en el extracto de raíz de *C. urticifolia* podría atribuirse principalmente a la mezcla de 2-isopropil-5-metilfenol (timol, 1) y 3-metil-4-isopropilfenol (2) y 4. La actividad analgésica de los derivados del éster metílico del ácido dicafeoilquínico depende del patrón de sustitución de los restos de cafeoil en el ácido quínico. Alternativamente, la similitud en la actividad anti-inflamatoria de los derivados del ácido 3,5-dicafeoilquínico sugiere que esta actividad está relacionada con su capacidad como eliminadores de radicales y que ni el patrón de sustitución, ni la esterificación del ácido carboxílico, son críticos para la expresión de este tipo de la actividad.

4.1 ANTIOXIDANT, ANALGESIC AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF BIOACTIVE METABOLITES FROM THE ROOT EXTRACT OF *CALEA URTICIFOLIA*³

Ivan Felipe Mijangos-Ramos,^{a¶} Hiatzy E. Zapata-Estrella,^{a¶} Fabiola Escalante-Erosa,^a Noemi Gómez-Ojeda,^a Karlina García-Sosa,^a Valdir Cechinel-Filho,^b Nara L. Meira-Quintão,^b Luis M. Peña-Rodríguez^{a*}

^a Laboratorio de Química Orgánica, Unidad de Biotecnología, Centro de investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, CP 97200, Mérida, Yucatán, México.

^b Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas, UNIVALI, Rua Uruguai, 458 Bloco 17 CEP 88302-202 Itajaí, S. C, Brasil.

¶ both authors contributed equally to this work

lmanuel@cicy.mx

Keywords: antioxidant, antiinflammatory, analgesic, Asteraceae, quinic acid

4.2 ABSTRACT

Calea urticifolia is a native plant of the Yucatan Peninsula used in traditional medicine to treat inflammation and pain. The bioassay-guided purification of the ethanolic extract allowed the isolation of the main bioactive metabolites, which were identified as an inseparable mixture of 2-isopropyl-5-methylphenol (thymol, 1) and 3-methyl-4-isopropylphenol (2), together with 3,4-O-dicaffeoylquinic acid methyl ester (3), 3,4-O-dicaffeoyl-epi-quinic acid methyl ester (4), 3,5-O-dicaffeoyl-epi-quinic acid methyl ester (5) and 3,5-O-dicaffeoylquinic acid (6). The metabolites were identified by comparing their spectroscopic data (IR, MS, ¹H and ¹³C-NMR) with those reported in the literature. The strong antioxidant activity observed for the dicaffeoylquinic acid methyl ester derivatives 3-5 suggested their being responsible for the antioxidant activity detected in the crude extract. Additionally, the results showed that the analgesic activity detected in the root extract of *C. urticifolia* could be attributed mainly to the mixture of 1 and 2 and to the novel

³Los resultados de este trabajo se incluyen en un manuscrito sometido para su publicación en *Planta Medica*.

3,4-O-dicaffeoyl-epi-quinic acid methyl ester (4), and that the analgesic activity of the dicaffeoylquinic acid methyl ester derivatives depends on the substitution pattern of the caffeoyl moieties in the quinic acid. Alternatively, the similarity of anti-inflammatory activity of the dicaffeoylquinic acid derivatives 3-5 suggests that this activity is related to their ability as radical scavengers and that neither the substitution pattern nor the esterification of the carboxylic acid are critical for the expression of this type of activity.

Keywords: antioxidant; anti-inflammatory; analgesic; Asteraceae; quinic acid

4.3 INTRODUCTION

One of the native plants commonly used in the practice of Yucatecan traditional medicine to alleviate pain and inflammation is *Calea urticifolia* Miller (Asteraceae), commonly known as “amargo del monte” and used as a traditional remedy for the treatment of stomachache, malaria and gastric ulcers (Méndez-González *et al.*, 2011, Ankli *et al.*, 1999, Durán *et al.*, 1998). Previous phytochemical studies of *C. urticifolia* have resulted in the isolation of sesquiterpene lactones, germacranolides, heliangolides, as well as isoeugenol and phloroglucinol derivatives (Castillo *et al.*, 1981, Yamada *et al.*, 2004). Additionally, sesquiterpene lactones from *C. urticifolia* have been reported to show various biological activities including antioxidant (Umemura *et al.*, 2008), inhibition of NF- κ B (Hehner *et al.*, 1999), induction of apoptosis (Nakagawa *et al.*, 2005), suppression of adipocyte differentiation (Matsuura *et al.*, 2005), and inhibition of melanin biosynthesis (Ohguchi *et al.*, 2009).

Recently, as part of our search for new analgesics and anti-inflammatory agents from medicinal plants of the native flora of the Yucatan peninsula, we reported the presence of both antioxidant and analgesic activities in the root extract of *C. urticifolia* (Zapata-Estrella *et al.*, 2014); we wish to report herein on the isolation and identification of the bioactive metabolites responsible for the biological activities detected in the organic crude extract of the plant.

4.4 MATERIALS AND METHODS

4.4.1 EXPERIMENTAL GENERAL

FTIR spectra were recorded in CHCl_3 or MeOH (film) using an FT-Nicolet Magna Protégé 460 spectrophotometer. GC-MS analyses were carried out using an Agilent Technologies 6890N Gas Chromatographer coupled to a 5975B Mass Selective Detector (GC conditions: JyC Ultra 1 column 25 m long, ID 0.32 mm, film 0.5 mm), flow rate (Helium) of 1 mL/min and a temperature program of $T_1 = 75^\circ\text{C}$ (4 min), $T_2 = 200^\circ\text{C}$ (11 min), gradient = $5^\circ\text{C}/\text{min}$. Mass spectra were obtained using a JEOL-JMS-SX102 mass spectrometer.

NMR spectra (^1H , ^{13}C) and two-dimensional experiments (COSY, HSQC and HMBC) were acquired on a JEOL GSX 270 MHz (Jeol Europe, France) and Avance III 500 system (Bruker, Germany). HRESIMS were measured using an LC (D)ESI/LTQ Orbitrap (Thermo Scientific).

Analytical TLC analyses were carried out using aluminum-backed silica gel (60F254) plates (E.M. Merck, 0.2 mm thickness); the plates were first examined under UV light (254 and 366 nm) and the various components in the chromatograms were visualized by dipping the plates in a solution of phosphomolybdic acid (20 g) and ceric sulfate (2.5 g) in 500 mL of sulfuric acid (5%), followed by drying and gentle heating. For the detection of components with radical scavenging activity, the plates were sprayed with a 0.2% solution of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) in ethanol. Gravity column chromatography purifications were performed using silica gel (Aldrich 70-230 mesh); TLC-grade silica gel 60 GF₂₅₄ (E.M. Merck) was used for vacuum liquid chromatography (VLC).

4.4.2 PLANT MATERIAL

Plant material was collected in November 2009 at the 9.5 km mark of the Yaxcabá-Libre Unión highway, Yucatan State, Mexico and identified by field specialist Paulino Simá-Polanco; a voucher specimen was deposited in the Herbarium of Unidad de Recursos Naturales CICY (P. Simá 3010).

4.4.3 EXTRACTION AND ISOLATION

Roots of *C. urticifolia* (738 g) were first dried for three days at room temperature and then for three days in an oven at 50°C . The plant material was ground and extracted three

times by maceration with ethanol (14 L, 400 mL of solvent/20 g of plant material) at room temperature for 72 h. The solvent was eliminated under reduced pressure to produce the corresponding crude extract CUR (46 g, 6.23%).

4.4.2.1 ISOLATION OF BIOACTIVE METABOLITES OF *C. urticifolia*

The CUR (46 g) extract was suspended in 370 ml of 3:2 H₂O-MeOH and the resulting suspension was partitioned successively between hexane (2.5 L) and ethylacetate (2.5 L). The active hexane fraction (Hex; 23.79 g, 51.71 %) was fractionated by VLC on silica gel (5 x 20 cm) using a gradient elution with mixtures of Hex-CH₂Cl₂ (1 L) to produce 6 fractions (1A-F). Final purification of fraction 1E (1.90 g, 7.98 %) using column chromatography (3.5 x 3 cm) on silica gel eluting with Hex-An 9:1 (800 mL) resulted in the isolation of a fraction (140.7 mg, 7.73%) containing an inseparable mixture of components identified by GC-MS as 2-isopropyl-5-methylphenol (thymol, 1) and 3-methyl-4-isopropylphenol (2) (Figure 4.1). The active ethylacetate fraction (EtOAc; 8.59 g, 18.76 %) was fractionated by VLC (5 x 20 cm) using a gradient elution with mixtures of CH₂Cl₂-Hx-MeOH (3 L) and CH₂Cl₂-MeOH-H₂O (1.5 L). The fractions were monitored by TLC (CH₂Cl₂-MeOH-H₂O 14:7:1) and those showing a similar composition were combined to produce eight major fractions (2A-H). Fraction 2G (6.52 g, 79.90 %) was purified by VLC (5 x 20 cm) using an isocratic elution with CHCl₃-MeOH-AcOEt-H₂O 2:2:4:1, to yield eight major fractions (3A-H). Fraction 3D (2 g, 30.67 %) was purified by column chromatography (3.5 x 3 cm) using an isocratic elution with CHCl₃-MeOH-H₂O 70:30:10 + 50 µl of formic acid for each 10 ml of solvent mixture to produce 3,4-O-dicaffeoylquinic acid methyl ester (3, 98.2 mg, 4.91 %) and 3,4-O-dicaffeoyl-epi-quinic acid methyl ester (4, 50.2 mg, 2.51 %) in pure form, together with a fraction 4A (0.57 g, 8.78 %) which was purified to yield 3,5-O-dicaffeoyl-epi-quinic acid methyl ester (5, 108 mg, 5.40 %) and 3,5-O-dicaffeoylquinic acid (6, 30.9 mg, 1.54 %) (Figure 4.1).

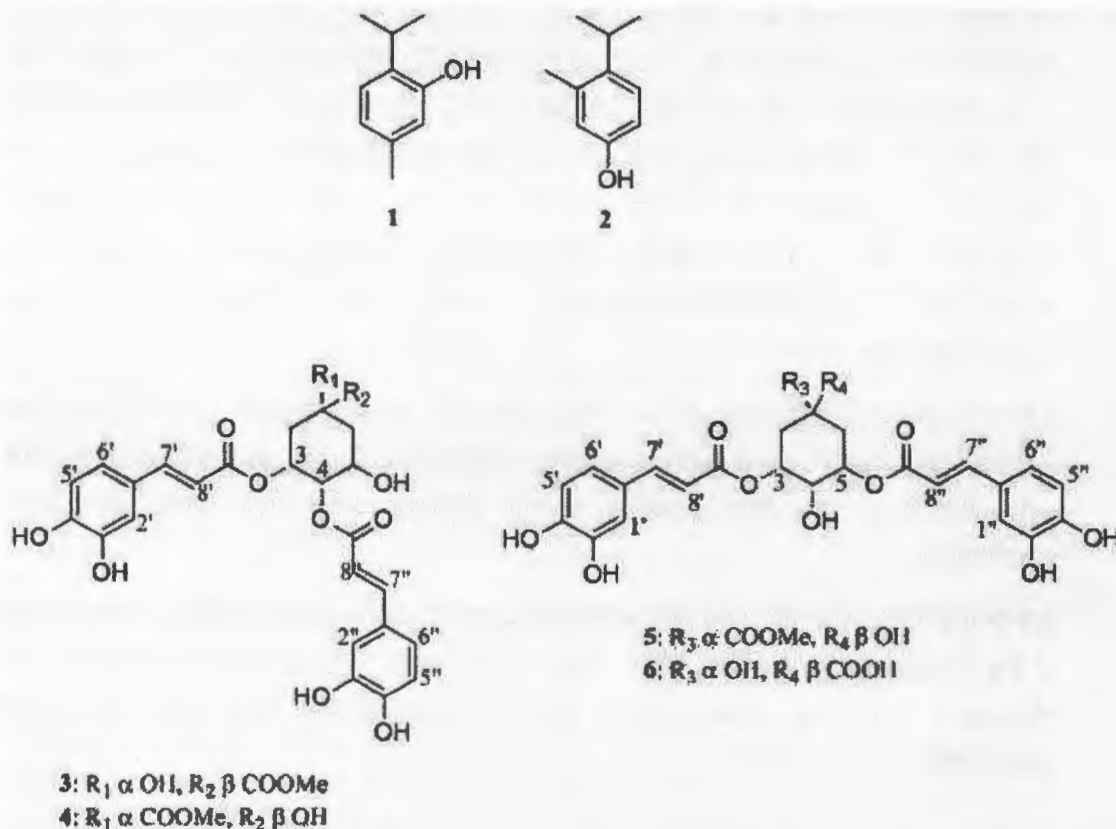


Figure 4.1 Bioactive metabolites from the root extract of *Calea urticifolia*.

Thymol (1), 3-methy-4-isopropylphenol (2), 3,4-O-dicaffeoylquinic acid methyl ester (3), 3,4-O-dicaffeoyl-epi-quinic acid methyl ester (4), 3,5-O-dicaffeoyl-epi-quinic acid methyl ester (5) and 3,5-O-dicaffeoylquinic acid (6).

3,4-O-dicaffeoylquinic acid methyl ester (3): yellow powder; spectral data identical to those reported in the literature (Zhang *et al.*, 2000). Copies of the original spectra are obtainable from the corresponding author. Spectroscopic data listed as Supporting Information (Figure 4.1).

3,4-O-dicaffeoyl-epi-quinic acid methyl ester (4): yellow powder; R_f = 0.52 silica gel 60 F_{254} ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 70:30:10 + 50 μl of formic acid for each 10 ml of solvent mixture); IR (film) λ_{max} : 3390, 2955, 1695, 1598 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ 2.18 (2H, m, H-2), 2.33 (2H, dd, J = 3.85, 14.45 Hz, H-6), 4.32 (1H, ddd, J = 4.3, 8.45, 8.40 Hz, H-5), 5.03 (1H, dd, J = 3.20, 8.20 Hz, H-4), 5.62 (1H, dd, J = 3.70, 5.10 Hz, H-3), 6.26 (1H, d, J = 15.90 Hz, H-8''), 6.26 (1H, d, J = 15.85 Hz, H-8'), 6.73 (1H, d, J = 8.15 Hz, H-5'), 6.76 (1H,

d, $J = 8.20$ Hz, H-5''), 6.88 (1H, dd, $J = 1.60, 8.20$ Hz, H-6''), 6.91 (1H, dd, $J = 1.65, 8.20$ Hz, H-6''), 7.02 (1H, d, $J = 1.85$ Hz, H-2''), 7.03 (1H, d, $J = 1.80$ Hz, H-2'), 7.54 (1H, d, $J = 15.85$ Hz, H-7''), 7.55 (1H, d, $J = 15.85$ Hz, H-7') ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD): δ 176.12 (C-7), 168.52 (C-9'), 168.44 (C-9''), 149.68 (C-4'), 149.64 (C-4''), 147.39 (C-3', 3''), 146.81 (CH, C-7', 7''), 127.70 (C-1'), 127.63 (C-1''), 123.25 (CH, C-6'), 123.14 (CH, C-6''), 116.53 (CH, C-5'), 116.46 (CH, C-5''), 114.94 (CH, C-2', 2''), 114.80 (CH, C-8', 8''), 75.56 (C-1), 75.12 (CH, C-4), 69.82 (CH, C-3), 66.03 (CH, C-5), 53.00 (CH_3 , C-8), 41.00 (CH_2 , C-6), 36.40 (CH_2 , C-2); HRESIMS (positive ion mode) m/z 569.1055 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (Calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{O}_{12}\text{K}$: 569.1061).

3,5-O-dicaffeoyl-epi-quinic acid methyl ester (5); yellow powder; spectral data identical to those reported in the literature (Zhang *et al.*, 2000). Copies of the original spectra are obtainable from the corresponding author. Spectroscopic data listed as Supporting Information.

3,5-O-dicaffeoylquinic acid (6); yellow powder; spectral data identical to those reported in the literature (Wald *et al.*, 1989, Pauli *et al.*, 1998). Copies of the original spectra are obtainable from the corresponding author. Spectroscopic data listed as Supporting Information.

4.5.2 ANTIOXIDANT ACTIVITY

Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DFPH) radical reduction assay. The assay was carried out as previously described (Zapata-Estrella *et al.*, 2011).

4.5.3 IN VIVO ASSAYS.

Animals. Conditions were similar to those previously described (Zapata-Estrella *et al.*, 2011).

4.5.3.1 MECHANICAL HYPERALGESIA INDUCED BY CARRAGEENAN, PROSTAGLANDIN E₂ (PGE₂) OR BRADYKININ (BK).

The assay was carried out as previously described (Zapata-Estrella *et al.*, 2011).

4.5.3.2 CARRAGEENAN-INDUCED PAW OEDEMA.

The assay was carried out as previously described (Zapata-Estrella *et al.*, 2011).

4.6 STATISTICAL ANALYSIS.

The percentages of inhibition were calculated using the entire time course of each experiment and are reported as the mean of inhibitions obtained for each individual experiment. The statistical significance of differences between groups was evaluated by means of a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post hoc test and Dunnett's post hoc test. P-values lower than 0.05 ($P < 0.05$ or less) were considered significant. Statistical analysis was carried out using the Instant Statistical Package (Graph pad software, Inc., USA).

4.7 RESULT AND DISCUSSION

The initial fractionation of the bioactive root extract of *C. urticifolia* produced two semi-purified fractions that showed a strong antioxidant activity when tested in the DPPH radical scavenging assay. The bioassay-guided purification of the low-polarity hexane fraction (Hex; EC_{50} 2.069 ± 0.59 mg/mL) resulted in the isolation of a fraction showing a single bioactive spot on TLC; a GC-MS analysis of the purified fraction showed the presence of two components at t_R 12.03 and 12.23 min (ca. 45% and 55%, respectively; Figure 4.1), both showing a parent ion peak at m/z 150 (Figure. 4.2), but each having a different fragmentation pattern that, when compared to those in the database of the equipment, suggested their corresponding to 2-isopropyl-5-methylphenol (thymol, **1**) and 3-methyl-4-isopropylphenol (**2**). The identification of the two metabolites was confirmed by comparing their 1H and ^{13}C NMR data with those reported in the literature (Spectral Database for Organic Compounds SDBS) and by comparing the GC-retention time of **1** with that of an authentic sample. The ubiquitous thymol (**1**) has been reported to have antioxidant (Aeschbach *et al.*, 1994) analgesic (Esmaeili *et al.*, 2011) and antimicrobial (Mastelić *et al.*, 2008) activities. Similarly, 3-methyl-4-isopropyl phenol (**2**), which has been previously isolated from *Plectranthus amboinicus*, is also reported as a bioactive metabolite with antimicrobial, antioxidant and analgesic activity (Uma *et al.*, 2011).

A similar bioassay-guided purification of the medium-polarity ethylacetate fraction (EtOAc; EC_{50} 0.467 ± 0.010 mg/mL) resulted in the isolation of three bioactive isomers of dicaffeoylquinic acid methyl ester (**3-5**) and a derivative of dicaffeoylquinic acid (**6**). The ESIMS analyses of **3**, **4** and **5** showed the same parent ion peak at m/z 530,

corresponding to a molecular formula of $C_{26}H_{26}O_{12}$ for the three metabolites. Metabolite **3** showed strong hydroxyl (3432 cm^{-1}) and carbonyl (1694 cm^{-1}) absorption bands in its IR spectrum, together with six aromatic (δ 6.93, 6.69, 6.85, 6.95, 6.67, 6.82) and four vinylic one-proton signals (δ 7.52, 6.21, 7.42, 6.09) in its $^1\text{H-NMR}$; this suggested a structure having both hydroxyl and carbonyl groups, with two aromatic trisubstituted rings and two double bonds, which accounted for 10 of the 14 unsaturation sites implied by the molecular formula. The $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of **3** confirmed the presence of 19 sp^2 carbons, corresponding to the two aromatic rings (126.11, 125.94, 113.58, 113.58, 145.25, 145.22, 148.23, 148.15, 114.98, 114.94, 121.66, 121.50 ppm), two double bonds (113.12, 166.97, 146.18, 112.94 ppm), and three carbonyl groups (173.66, 166.97 and 166.39 ppm). This data, together with the presence of three methine protons bonded to oxygen-bearing carbons at δ 4.26, 5.03, 5.45, a methoxyl methyl group singlet at δ 3.63, and two two-proton multiplets at δ 2.19 and 2.06 in the $^1\text{H-NMR}$ spectrum, strongly indicated **3** as having an esterified quinic acid structure. The two 3J correlations observed in the HMBC experiment between the protons of the oxy-methine groups at δ 4.26 and 5.03 and the sp^2 carbons at 166.97, 166.39 ppm identified the esterified positions. A literature search allowed the identification of **3** as 3,4-O-dicaffeoylquinic acid methyl ester (Zhang *et al.*, 2000), a metabolite commonly isolated from Asteraceae plant species (Park, 2010) and recognized as having antioxidant and anti-inflammatory activities (Hung *et al.*, 2006).

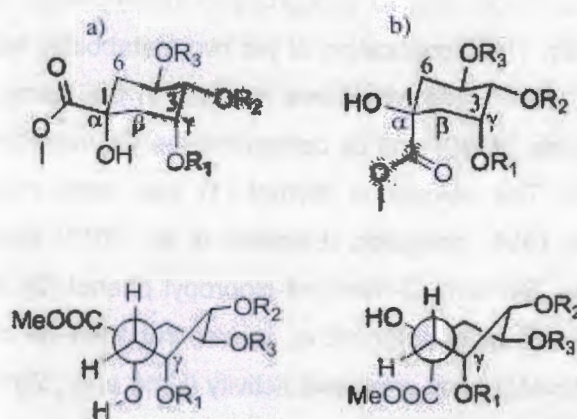


Figure 4.2 Chair conformation and Newman projection of (a) 3,4-dicaffeoylquinic acid methyl ester (**3**) and (b) 3,4-dicaffeoyl-epi-quinic acid methyl ester (**4**) to show the steric γ effect between the hydroxyl group in C-1 and carbons C-3 and C-6.

The ^1H and ^{13}C NMR spectra of metabolite 4 proved to be very similar to those of 3, with key differences in the chemical shift values of C-1 (79.19 in 3, 75.56 ppm in 4) and the ester carbonyl carbon (173.66 ppm in 3, 176.12 ppm in 4), which coincided with the differences reported for the same carbons in 3,5-O-dicaffeoylquinic acid and its C-1 epimer (Wang,2009). Furthermore, the small downfield chemical shifts observed for C-3 (67.00 ppm in 3, 69.82 ppm in 4) and C-6 (36.45 ppm in 3, 41.00 ppm in 4) were in agreement for those resulting from a γ -steric effect that occurs when a heteroatom is located in a gauche conformation with respect to the carbon in the gamma position (Figure 4.2) (Luo *et al.*, 2013). This allowed the identification of 4 as 3,4-O-dicaffeoyl-epi-quinic acid methyl ester, a dicaffeoyl-epi-quinic acid derivative that, to the best of our knowledge, has not been described before.

Metabolite 5 showed similar ^1H and ^{13}C NMR data to those of 4, with the main differences being observed in the in the HMBC experiment, specifically the 3J correlations between H-3 and H-5 (δ 5.31 and 5.23) and the ester carbonyl carbons at 167.12 and 166.32 ppm, respectively. This correlations identified C-3 and C-5 as the esterified positions having the two caffeoyl units, and allowed the identification of 5 as 3,5-O-dicaffeoyl-epi-quinic acid methyl ester (Zhang *et al.*,2000), a bioactive metabolite with antioxidant and anti-inflammatory activities previously isolated from Asteraceae plant species (Hung *et al.*, 2006, Wang, 2009).

The HRESIMS analysis of the last metabolite showed a protonated ion peak at m/z 517, indicating a molecular formula of $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$. The ^1H and ^{13}C NMR data proved to be very similar to those of 5, except for the absence of the methoxyl group methyl signal at δ 3.60 which allowed its identification as the well known 3,5-O-dicaffeoylquinic acid (6) (Wald *et al.*, 1989, Pauli *et al.*,1989), a metabolite reported to have a strong antioxidant activity in both the DPPH radical scavenging assay (Wu *et al.*,2007, Dan *et al.*,2008) and the peroxynitrite scavenging assay (Agung *et al.*, 2009), as well as being hepatoprotective (Wu *et al.*,2012) and anti-inflammatory (Hung *et al.*,2006, Peluso *et al.*,1995, Park *et al.*, 2009).

The caffeoylquinic acid derivatives represent an important group of natural products, commonly found in plants of the Asteraceae family as mono- or dicaffeoylquinic acid derivatives, with the carboxylic acid at C-1 often methylated (Fraisie *et al.*, 2011, Kim *et al.*,2005). Although quinic acid is most commonly found as the parent skeleton, epi-quinic acid derivatives can also occur (Agung *et al.*, 2009).

The strong antioxidant activity observed for the dicaffeoylquinic acid methyl ester derivatives 3-5 when tested in the DPPH radical scavenging assay, suggested their being responsible for the antioxidant activity detected in the crude extract and the medium polarity EtOAc fraction (Table 4.1). These results are in agreement with literature reports describing caffeoylquinic acid derivatives as the major antioxidant metabolites commonly isolated from Asteraceae plant species (Fraisie *et al.*, 2011, Thuong *et al.*, 2009). It is interesting to point out that the antioxidant activity observed for the terpenoid mixture (1 and 2) is lower than that reported for thymol alone (Mastelić *et al.*, 2008).

The antioxidant activity of the dicaffeoylquinic acid methyl ester derivatives 3-5 and of the root extract from *C. urticifolia*, is in agreement with previous reports which have found that there exists a significant correlation between the total content of caffeoylquinic acid derivatives and the DPPH-radical scavenging ability of crude extract from plants of the Asteraceae family (Fraisie *et al.*, 2011) It has also been reported that the catechol moiety, combined with the unsaturated ester moiety in the structure of the caffeoylquinic acid derivatives, is essential for the radical-scavenging activity of these metabolites (Parejo *et al.*, 2004, Jie *et al.*, 2008).

Table 4.1 Radical scavenging activity (expressed as EC₅₀) of the organic crude extract (CUR), semipurified hexane (Hex) and ethylacetate (EtOAc) fractions, and purified metabolites 1-5 from *C. urticifolia*

Sample	DPPH radical EC ₅₀ ± SEM
CUR	0.542±0.010 mg/mL
Hex	2.069±0.590 mg/mL
EtOAc	0.467±0.010 mg/mL
tymol + 3-methyl-4-isopropyl phenol (1+ 2)	0.136±0.012 mg/mL
3,4-O-dicaffeoylquinicacid methyl ester (3)	0.12 ±0.0010 µM
3,4-O-dicaffeoyl-epi-quinic methyl ester (4)	0.89±0.0005 µM
3,5-O-dicaffeoyl-epi-quinic methyl ester (5)	0.15±0.0010 µM
Ascorbic acid	0.26± 0.0001 µM

Each value represents the mean ± S.E.M. *Values are means of triplicate determinations.

Testing of the terpenoid mixture (1 and 2) and the dicaffeoylquinic acid methyl ester derivatives 3-5 in the model of persistent pain induced by carrageenan, showed that the analgesic activity detected in the root extract of *C. urticifolia* (CUR), observed as a significant dose-dependent and persistent reduction of the mechanical hypernociceptive response that was sustained for up to 24 h after the carrageenan injection, could be attributed mainly to the mixture of 1 and 2 and to the novel 3,4-O-dicaffeoyl-epi-quinic acid methyl ester (4) (Figure 4.3 A-F; * $p < 0.05$). These results coincide with previous reports about 1 exhibiting antinociceptive and local anaesthetic effects (Haeseler *et al.*, 2002) as well as anti-inflammatory activity when evaluated in the carrageenan-induced hindpaw edema model (Riella *et al.*, 2012). Similarly, a number of caffeoylquinic acid derivatives have been reported to show analgesic activity, including 4,5-O-dicaffeoylquinic acid and 3,4,5-O-tricaffeoylquinic acid, which showed analgesic activity when tested in the acetic acid writhing induction test (Dos Santos *et al.*, 2005).

The strong analgesic activity demonstrated by metabolite 4 and the lack of activity observed in the isomeric metabolite 5 (Figure 4.3 E and F) suggests that the activity depends on the substitution pattern of the caffeoyl moieties in the quinic acid.

Furthermore, it is interesting to point out that while **5** did not show analgesic activity in the persistent pain induced by carrageenan model, 3,5-O-dicaffeoyl-epi-quinic acid has been reported to show analgesic activity when tested in the acetic acid writhing induction test (Dos Santos *et al.*, 2011); these findings suggest that for the dicaffeoylquinic acid methyl ester derivative **5**, esterification of the carboxylic acid results in a significant reduction of activity.

The investigation of the effect of metabolites **4** and **5** in the mechanical hypernociception induced by PGE2 and BK, recognized as important mediators involved in pain and inflammation (Vasquez *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2005, Dutra *et al.*, 2013), showed that the strong analgesic activity of **4** can be explained, at least in part, by its ability to inhibit PGE2 (50.9 %, $p < 0.01$) but not BK (30% , $p < 0.01$). Furthermore, the lack of analgesic activity of **5** can be explained by its low inhibition of both PGE2 and BK (30% ea, $p < 0.01$)

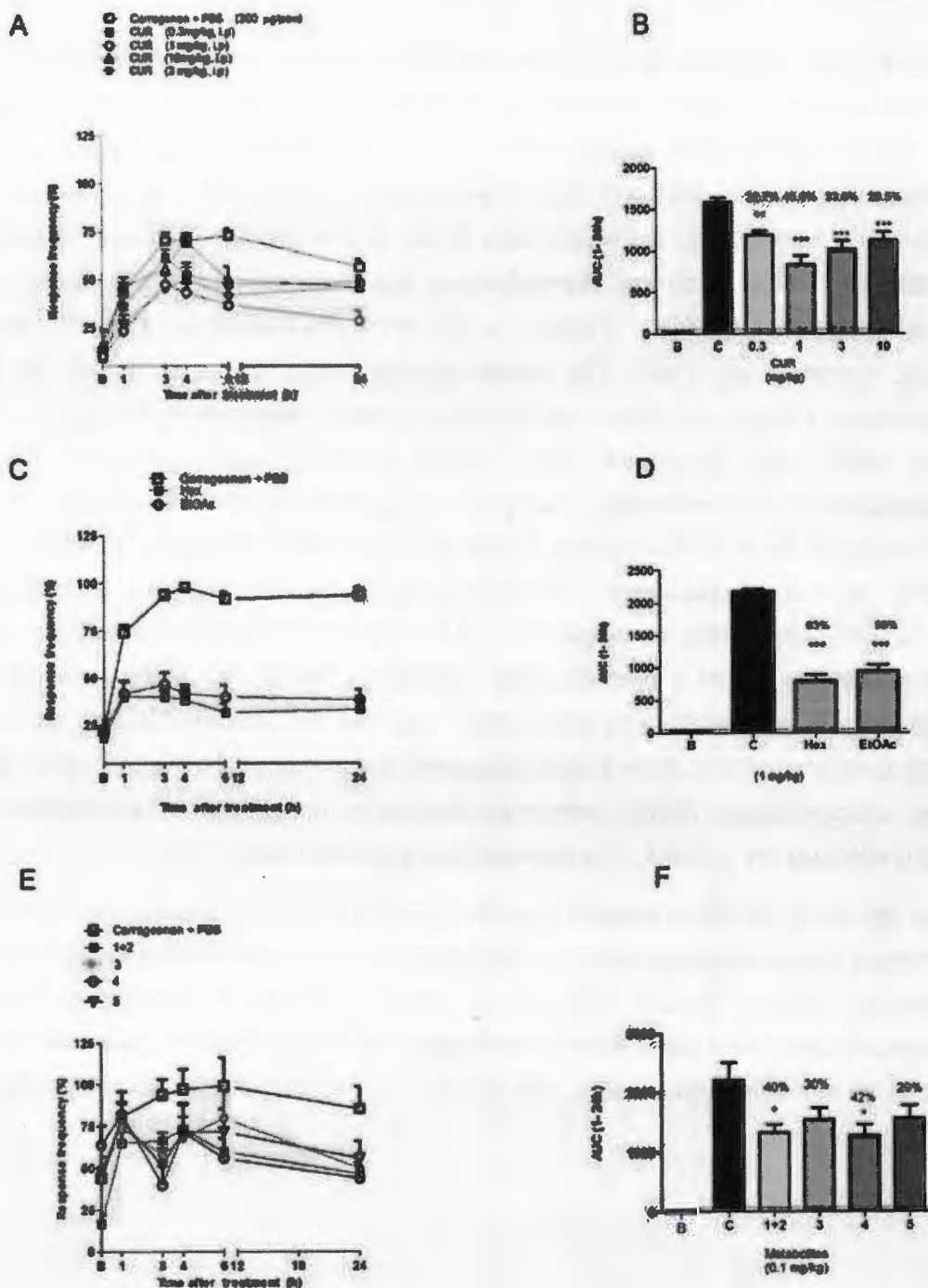


Figure 4.3 Effect of the crude extract (A-B), semipurified hexane (Hex) and ethylacetate (EtOAc) fractions (C-D), and purified metabolites 1-5 (E-F) from *C. urticifolia* on mechanical hypernociception induced by i.p. injection of carrageenan (300 µg/paw) in mice. AUC: area under

the curve. B: baseline withdrawal threshold. The symbols denote significant difference: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ PBS. Each group represents the mean and $\pm$ S.E.M of 5 to 8 of animals.

In view of the analgesic activity shown by the CUR extract and the bioactive metabolites **1-5**, and taking into account that pain is a characteristic of inflammatory process (Guillot *et al.*, 2012), the anti-inflammatory effect of the pure metabolites was evaluated in the carrageenan-induced paw oedema, an animal model where the inflammatory response induced by carrageenan is characterized mainly by the rapid production of inflammatory mediators such as histamine, prostaglandins, kinins, nitric oxide, and cytokines, among others (Seibert *et al.*, 1994, Salvemini *et al.*, 2011, Posadas *et al.*, 2012, Cunha *et al.*, 2005, Rocha *et al.*, 2006). The results showed similar levels of activity for all the metabolites (Figure 4.4), with a slightly higher activity observed for the dicaffeoylquinic acid methyl ester derivatives. These results showed a clear correlation with those corresponding to the antioxidant activity described previously (Table 4.1), suggesting that, in this case, the anti-inflammatory activity of the purified metabolites is related to their ability as radical scavengers. The observed correlation between antioxidant and antiinflammatory activity of metabolites **3-5** is in agreement with that previously reported for metabolites **3** and **5** (Beattie, 2009); additionally, the results obtained in this study, together with the anti-inflammatory activity reported for 5-O-caffeoylquinic acid methyl ester (Lee *et al.*, 2013) and 4,5-O-dicaffeoylquinic acid (Toffoli-Kadri *et al.*, 2014), indicate that, unlike analgesic activity, neither the substitution pattern nor the esterification of the carboxylic acid are critical for the expression of antiinflammatory activity.

The results of this study suggest that the terpenoid mixture of metabolites **1** and **2**, and particularly the dicaffeoylquinic acid derivatives **3-6**, are the metabolites responsible for the biological activities detected in the crude extract of the root of *C. urticifolia* and for the traditional use of the plant. The dicaffeoylquinic acid derivatives represent an important class of secondary metabolites with potential to develop novel ant-inflammation and analgesic agents.

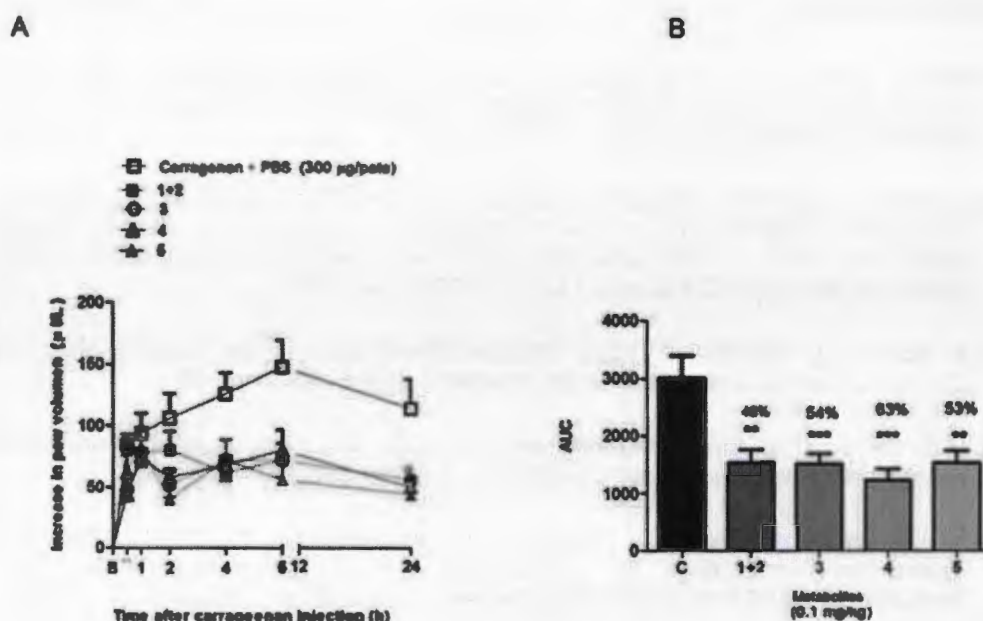


Figure 4.4 Effect of purified metabolites 1-5 from *C. urticifolia* on paw oedema induced by carrageenan in mice (A-B).

AUC: area under the curve. The symbols denote significant difference: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ PBS, each group represents the mean and $\pm$ SEM of 5 to 8 animals.

4.8 ACKNOWLEDGMENTS.

The authors wish to thank Ingrid Fruze and Pascal Richomme, University of Angers, France, for ESIMS and HRESIMS measurements, and Nihat Knispel and Wolfgang Eisenreich, Technische Universität München, for NMR measurements. The financial support from Mexico's Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) and Brasil's Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), through their "Programa de Cooperación Bilateral México-Brasil", is also greatly appreciated.

The authors declare no conflict of interest in this investigation.

4.9 REFERENCES

- Aeschbach R, Loliger J, Scott BC, Murcia A, Butler J, Halliwell B, Aruoma OI (1994). Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *FOOD and CHEMICAL Toxicology*, 3: 31-36.
- Agung N, Kim KH, Lee KR, Badrul-Alam M, Choi JS, Kim WB, Park HJ (2009). Qualitative and Quantitative Determination of the Caffeoylquinic Acids on the Korean Mountainous Vegetables Used for Chwinamul and Their Peroxynitrite-Scavenging Effect. *Archives of Pharmacal Research*, October doi:10.1007/s12272-009-2003-6.
- Ankli A, Sticher O, Heinrich M (1999). Medical Ethnobotany of the Yucatec Maya: Healers Consensus as a Quantitative Criterion. *Economic Botany*, 53: 144–160.
- Beattie KD (2009). Phytochemical studies and bioactivity of *Centipeda* and *Eremophila* species. Lismore, NSW: Southern Cross University,.
- Castillo, JB, Manresa-Ferrero MT, Rodriguez L, Vazquez-Bueno P (1981). Research Article Salvadorian Compositae. II. Juanislamin and 2,3-Epoxy-Juanislamin, Two New Sesquiterpenic Lactones From *Calea Urticifolia*. *Journal Natural Products*, 44: 348–350.
- Cunha TM, Verri WA. Jr, Silva JS, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH (2005). A Cascade of Cytokines Mediates Mechanical Inflammatory Hypernociception in Mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 1755–60
- Dan T, Li HJ, Chen J, Guo CW, Li P (2008). Rapid and Simple Method for Screening of Natural Antioxidants from Chinese Herb Flos *Lonicerae Japonicae* by DPPH-HPLC-DAD-TOF/MS. *Journal of Separation Science*, 31: 3519–26.
- Dos Santos MD, Gobbo-Neto L, Albarella L, de Souza GE, Lopes NP (2005). *Analgesic Activity of Di-Caffeoylquinic Acids from Roots of Lychnophora Ericoides (Arnica Da Serra)*. *Journal of Ethnopharmacology*, 96: 545–9.
- Dos Santos, MD, Chen G, Almeida MC, Soares DM, de Souza GE, Lopes NP, Lantz RC (2011). *Effects of Caffeoylquinic Acid Derivatives from Lychnophora Ericoides on in Vitro Inflammatory Mediator*. *Natural Product Communications*, 5: 733–740.
- Durán, R, Trejo-torres, JC, Ibarra-manríquez G (1998). *Endemic Phytotaxa of the Peninsula of Yucatán*. *Harvard University Herbaria*, 3: 263–314.
- Dutra RC, Bento AF, Leite DF, Manjavachi MN, Marcon R, Bicca MA, Pesquero JB, Calixto JB (2013). The Role of Kinin B1 and B2 Receptors in the Persistent Pain Induced by Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) in Mice: Evidence for the Involvement of Astrocytes. *Neurobiology of Disease*, 54: 82–93.
- Esmaeili A, Khodadadi A (2011). *Antioxidant Activity of a Solution of Thymol in Ethanol*. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*; 14; 14–18.
- Fraisse D, Felgines C, Odile T, Lamaison JL (2011). Caffeoyl Derivatives: Major Antioxidant Compounds of Some Wild Herbs of the Asteraceae Family. *Food and Nutrition Sciences*, 181–192.

- Guillot X, Semerano L, Decker P, Falgarone G, Boissier MC (2012). *Pain and Immunity*. Joint Bone Spine, 79: 228-36.
- Haeseler G, Maue D, Grosskreutz J, Bufler J, Nentwig B, Piepenbrock S, Dengler R, Leuwer M (2002). *Voltage-dependent block of neuronal and skeletal muscle sodium channels by thymol and menthol*. European Journal of Anaesthesiology, 19: 571-579.
- Hegner SP, Hofmann TG, Dröge W, Schmitz M L (1999). The Antiinflammatory Sesquiterpene Lactone Parthenolide Inhibits NF-Kappa B by Targeting the I Kappa B Kinase Complex. Journal of Immunology, 163: 5617-23.
- Hung TM., Na M, Thuong PT, Su ND, Sok D, Song KS, Seong YH, Bae, K (2006). *Antioxidant activity of caffeoyl quinic acid derivatives from the root of Dipsacus asper Wall*. Journal of Ethnopharmacology, 108: 188-192.
- Jie H , Weng X, Bi K (2008). Antioxidants from a Chinese Medicinal Herb – Lithospermum Erythrorhizon. Food Chemistry, doi:10.1016/j.foodchem.2007.01.031.
- Kim HJ, Lee YS (2005). Identification of New Dicafeoylquinic Acids from Chrysanthemum Morifolium and Their Antioxidant Activities. Planta Medica, 71: 871-6.
- Lee SY, Moon E, Kim SY, Lee KR (2013). Quinic acid derivatives from Pimpinella brachycarpa exert anti-neuroinflammatory activity in lipopolysaccharide-induced microglia. Bioorganic y Medicinal Chemistry Letters, 23: 2140-2144.
- Luo SH, Hua J, Niu XM, Liu Y, Li CH, Zhou YY, Jing SX, Zhao X, Li SH (2013). *Defense sesterterpenoid lactones from Leucosceptum canum*. Phytochemistry, 86: 29-35.
- Mastelić J, Jerković I, Blazević I, Poljak-Blazi M, Borović S, Ivancić-Baće I, Smrecki V (2008). *Comparative Study on the Antioxidant and Biological Activities of Carvacrol, Thymol, and Eugenol Derivatives*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56: 3989-96.
- Matsuura N, Yamada M, Suzuki H, Hasegawa N, Kurosaka C, Ubukata M, Tanaka T, Iinuma M (2005). *Inhibition of Preadipocyte Differentiation by Germacranolides from Calea Urticifolia in 3T3-L1 Cells*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 69: 2470-4.
- Méndez-González ME, García-Durán R, Bobadilla-Campos MS, Dorantes Euan A (2011). *Flora medicinal*. In: *Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán.*, eds. Mérida Yucatán, México: CICY, PPD-FMAM, CONABIO, SEDUMA.: 349-352.
- Nakagawa Y, Iinuma M, Matsuura N, Yi K, Naoi M, Nakayama T, Nozawa Y, Akao Y (2005). A Potent Apoptosis-Inducing Activity of a Sesquiterpene Lactone , Arucanolide , in HL60 Cells : a Crucial Role of Apoptosis-Inducing Factor. Journal of Pharmacological Sciences; 97 : 242-252.
- Ohguchi K, Ito M, Yokoyama K, Iinuma M, Itoh T, Nozawa Y, Akao Y (2009). *Effects of Sesquiterpene Lactones on Melanogenesis in Mouse B16*. Biological and Pharmaceutical Bulletin; 32: 308-310.
- Parejo I, Viladomat F, Bastida J, Schmeda-Hirschmann G, Burillo J, Codina C (2004). Bioguided Isolation and Identification of the Nonvolatile Antioxidant Compounds from Fennel (*Foeniculum Vulgare* Mill.) Waste. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 1890-7.

- Park HJ (2010). Chemistry and Pharmacological Action of Caffeoylquinic Acid Derivatives and Pharmaceutical Utilization of Chwinamul (Korean Mountainous Vegetable). *Archives Pharmacol Research*; 33: 1703-1720.
- Park KH, Park M, Choi SE, Jeong MS, Kwon JH, Oh MH, Choi HK, Seo SJ, Lee MW (2009). *The Anti-Oxidative and Anti-Inflammatory Effects of Caffeoyl Derivatives from the Roots of Aconitum Koreanum R. RAYMOND*. *Biological y Pharmaceutical Bulletin*, 32: 2029–33.
- Pauli GF, Poetsch F, Nahrstedt A (1998). Structure assignment of natural quinic acid derivatives using proton nuclear magnetic resonance techniques. *Phytochemical Analysis*, 9: 177-185.
- Peluso G, De Feo V, De Simone F, Bresciano E, Vuotto ML(1995). Studies on the Inhibitory Effects of Caffeoylquinic Acids on Monocyte Migration and Superoxide Ion Production. *Journal of Natural Products*, 58: 639–46.
- Posadas, I, Bucci M, Roviezzo F, Rossi A, Parente L, Sautebin L, and Cirino G (2012). Carrageenan-Induced Mouse Paw Oedema Is Biphasic, Age-Weight Dependent and Displays Differential Nitric Oxide Cyclooxygenase-2 Expression. *British Journal of Pharmacology*, 142: 331–8.
- Riella KR, Marinho RR, Santos JS, Pereira-Filho RN, Cardoso JC, Albuquerque-Junior RLC, Thomazzi SM (2012). *Anti-Inflammatory and Cicatrizing Activities of Thymol, a Monoterpene of the Essential Oil from Lippia Gracilis, in Rodents*. *Journal of Ethnopharmacology*, 143: 656–63.
- Rocha AC, Fernandes ES, Quintão NL, Campos MM, Calixto JB (2006). Relevance of Tumour Necrosis Factor-Alpha for the Inflammatory and Nociceptive Responses Evoked by Carrageenan in the Mouse Paw. *British Journal of Pharmacology*, 148: 688–95.
- Salvemini D, Little JW, Doyle T, Neumann WL(2011). *Roles of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Pain*. *Free Radical Biology y Medicine*, 51: 951–66.
- Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P (1994). *Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain*. *Proceedings of the NATIONAL ACADEMY of Sciences*, 91: 12013-7.
- Spectral Database for Organic Compounds SDBS. http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre_index.cgi.
- Thuong, PT, Su ND, Ngoc TM, Hung TM, N. H., Dang ND, Thuan K, Bae KH, Oh WK (2009). Antioxidant activity and principles of Vietnam bitter tea Ilex kudingcha. *Food Chemistry*; 113: 139–145.
- Toffoli-Kadri MC, Carollo CA, Lourenço LD, Felipe JL, Néspoli JH, Wolff LG, Resende GM, de Lima JR, Franco VN, Vieira MC, de Siqueira JM (2014). *In vivo and in vitro anti-inflammatory properties of Achyrocline alata (Kunth) DC*. *Journal of Ethnopharmacology*, 153: 461–468.
- Uma M, Jothinayagi S, Kumaravel S, Kalaiselvi P (2011). Determination of Bioactive Components of *Plectranthus amboinicus* Lour by GC–MS Analysis. *New York Science Journal*, 4: 66-9.
- Umemura K, Itoh T, Hamada N, Fujita Y, Akao Y, Nozawa Y, Matsuura N, Iinuma M, Ito M (2008). *Preconditioning by Sesquiterpene Lactone Enhances H₂O₂-Induced Nrf2/ARE Activation*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 368: 948–54.

- Vasquez E, Bär KJ, Ebersberger A, Klein B, Vanegas H, Schaibl HG (2001). Spinal Prostaglandins Are Involved in the Development But Not the Maintenance of Inflammation-Induced Spinal Hyperexcitability. *The Journal of Neuroscience*;21: 9001–9008.
- Wald B, Wray V, Galensa R, Herrmann K (1989). *Malonated Flavonol Glycosides and 3,5-Dicaffeoylquinic acid from pears*. *Phytochemistry*, 28: 663-664.
- Wang H, Tatsuro K, Fumimasa A, Gary JB, Nobuko I, Andrew A, Ru-Rong Ji, Clifford JW (2005). Bradykinin Produces Pain Hypersensitivity by Potentiating Spinal Cord Glutamatergic Synaptic Transmission. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25: 7986–92.
- Wang Y (2009). Isolation and Structure Elucidation of Bioactive Secondary Metabolites from Mongolian Medicinal Plants. [dissertation]. Heinrich-Heine Universität Düsseldorf,.
- Wu C, Feng C, Xi W, Yonnie W, Meidui D, Guoqing H, Ronald DG, Lilin H, Guohui H (2007). *Identification of Antioxidant Phenolic Compounds in Feverfew (Tanacetum Parthenium) by HPLC-ESI-MS/MS and NMR*. *Phytochemical Analysis*, 18: 401–10.
- Wu YH, Hao BJ, Shen E, Qing-Li Meng, Hu MH, and Zhao Y (2012). Protective Properties of Laggera Alata Extract and Its Principle Components Against d-Galactosamine-Injured Hepatocytes. *Scientia Pharmaceutica*, 80: 447–56.
- Yamada M, Nobuyasu M, Hiroto S, Chihiro K, Naoko H, Makoto U, Toshiyuki T, Munekazu I (2004). *Geranacranolides from Calea Urticifolia*. *Phytochemistry* December; doi:10.1016/j.phytochem..08.040.
- Zapata-Estrella HE, Sima-polanco P, Escalante-Erosa F, García-Sosa K, Cechinel Filho V, Meira-Quintão NL, Peña-Rodríguez LM. *Antioxidant, Analgesic, and Antiinflammatory Activity of Medicinal Plants from the Native Flora of the Yucatan Peninsula*. *Pharmaceutical Biology*. Submitted.
- Zhang, WD, Tam HT, Chen WS, Kong DY, Li HT, Wang YH, Fouraste I (2000). *Two new caffeoyl conjugation from Erigeron breviscapus*. *Journal of Asian Natural Products Research.*; 2: 283-288.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 DISCUSIÓN GENERAL

En los últimos años han aumentado las publicaciones e investigaciones relacionadas con los mecanismos y las moléculas involucradas en el proceso inflamatorio y en la percepción del dolor. En el proceso inflamatorio global intervienen muchos mecanismos, algunos mediados por una variedad de moléculas de señalización. Los mediadores incluyen aminas biógenas (histaminas), proteínas y péptidos (enzimas hidrolíticas, citoquinas, factores de crecimiento, anticuerpos, quininas), lípidos (FAP, prostanoides y leucotrienos) y las ERO, (anión superóxido, hidroperóxido, radicales hidroxilos). Las ERO inician, mantienen, agravan y modulan el curso de un gran número de enfermedades que cursan con procesos inflamatorios. Los datos en la literatura demuestran que los antioxidantes poseen la capacidad de inhibir específicamente a las ERO que contribuyen al proceso inflamatorio. En consecuencia los antioxidantes representan una opción atractiva como blancos novedosos en la búsqueda de nuevos fármacos antiinflamatorios y analgésicos.

Existen diversos reportes sobre evaluación de la actividad antioxidante, analgésica y antiinflamatoria que se han realizado tanto en extractos crudos como en metabolitos secundarios aislados de fuentes naturales. Estos trabajos se han realizado utilizando diferentes modelos antioxidantes y farmacológicos tanto *in vivo* como *in vitro*.

En la península de Yucatán existen una extensa y documentada información etnomédica de las especies de la flora nativa empleadas para resolver problemas inflamatorios y aliviar el dolor. Por lo anterior, en este trabajo se evaluó la posible relación entre la capacidad de atrapar radicales libres, con las propiedades analgésicas y/o antiinflamatorias atribuidas *A. pilosa*, *C. urticifolia*, *C. souzae*, *C. aromatisans* y *S. gaumeri*, especies de la flora nativa Yucateca utilizadas en la medicina tradicional para tratar problemas inflamatorios y de dolor.

Con el fin de establecer la actividad antioxidante y analgésica de las especies vegetales se utilizaron los métodos de reducción del DPPH y el ensayo de las contorciones inducidas en ratones por ácido acético, respectivamente.

Los extractos con mayor actividad antioxidante fueron los de hojas de *C. urticifolia*, *A. pilosa* y *S. gaumeri*, seguidos de los extractos de raíz de *A. pilosa*, *C. souzae* y *C. urticifolia*, identificándolos como una buena fuente de productos con actividad antioxidante.

Los extractos de hojas de todas las especies presentaron también la mayor actividad analgésica en comparación con los extractos de tallo y raíz; siendo en los extractos de *C. aromatisans* y *S. gaumeri* el efecto analgésico central y periférico. La bioactividad reportada por la etnobotánica yucateca podría fundamentarse no sólo en los diferentes mecanismos ejercidos por los metabolitos, sino además al efecto sinérgico del conjunto de metabolitos secundarios lo que contribuiría a explicar los usos otorgados en la medicina tradicional.

Sin embargo los resultados observados indican que la capacidad de captación de radicales de estos extractos no está relacionada con su actividad analgésica. Estos resultados no concuerdan con lo reportado en la literatura donde la actividad antioxidante del extracto de *Taxillus liquidambaricola* está relacionada con su actividad antinociceptiva y anti-inflamatoria. Considerando la diversidad de la composición química de los extractos de hoja de *C. urticifolia*, *A. pilosa* y *S. gaumeri*, posiblemente los metabolitos con actividad antioxidante no necesariamente son los mismos que poseen actividad analgésica.

Considerando los resultados previos se determinó que los metabolitos responsables de la capacidad de atrapar radicales libres de extractos de raíz de *A. pilosa* y *C. souzae*, son el ácido rosmarínico, el ácido cafeico y el 7-deoxinimbidiol, respectivamente. Específicamente, los metabolitos con grupos funcionales fenólicos son reconocidos como poseedores de actividad antioxidante lo que confirma lo observado. Ácidos tales como caféico, ferúlico y vainílico, entre otros, son de amplia distribución en el reino plantae y reconocidos por su papel antioxidante. En general se afirma que los fitofenólicos exhiben actividad antioxidante/prooxidante, dependiendo de factores como el potencial reductor de metales, el comportamiento quelante, el pH, las características de solubilidad, de su conformación estructural, de la cantidad de grupos hidroxilos disponibles en la molécula.

El 7-deoxynimbidiol no presentó una actividad analgésica en el modelo de dolor inducido carragenina, pero si en el edema en el mismo modelo. Interesantemente el metabolito 7-deoxynimbidiol es capaz de inhibir el dolor inducida por PGE2.

En este trabajo se determinó también que la actividad antioxidante del extracto de raíz de *C. urticifolia* es debida a la mezcla de monoterpenos timol y 3-metil-4-isopropil fenol, así

como tres derivados de ésteres metílicos isoméricos del ácido cafeoilquínico: 3,4-O-dicafeoilquínico, 3,4-O-dicafeoyl-epi-quínico y 3,5-O-dicafeoil-epiquinico. La actividad antioxidante de los derivados de éster metílico del ácido quínico concuerda con informes anteriores que reportan una correlación significativa entre el contenido total de derivados de ácido cafeoil quínico y la capacidad reductora de radicales libres en las especies pertenecientes a la familia Asteraceae. Este es el primer reporte de actividad antioxidante de los ésteres metílicos del ácido 3,4-O-dicafeoyl-epi-quínico y 3,5-O-dicafeoyl-epi-quínico. Se ha reportado que poseer un grupo catecol, combinado con la presencia de un éster insaturado, en la estructura de los derivados de ácido cafeoilquinico es esencial para la captación de los radicales libres. Asimismo la actividad antioxidante de los derivados del ácido cafeico se debe a la presencia de los grupos oxhidrilo (fenol) que contienen en su estructura.

Las propiedades analgésicas de *C. urticifolia* se atribuyen a la mezcla de moterpenos timol y 3-metil-4-isopropil fenol y al ácido de metil éster 3,4-O-dicafeoil-epi-quínico. Previamente se ha reportado que el timol posee actividad analgésica y anti-inflamatoria. Sin embargo, es interesante señalar que mientras que el ácido 3,5-di-O-epi-cafeoilquinico ha sido reportado con actividad analgésica, su correspondiente éster de metilo 3,5-O-dicafeoilquinico no mostró actividad analgésica en el modelo de dolor inducido por carragenina. Además, la fuerte actividad analgésica mostrada por metabolito ácido metilester 3,4-O-dicafeoil-epi-quinico y la falta de actividad observada en su isómero 3,5-O-dicafeoil-epi-quinico sugieren que, además de la esterificación del ácido carboxílico en C-1, la ubicación de los grupos cafeoil en el esqueleto de ácido quínico, es esencial para la expresión de la actividad.

Al evaluar la actividad analgésica de los metabolitos 3,4-O-dicafeoil-epi-quínico y 3,5-O-di cafeoil-epi-quínico por los inductores de dolor PGE2 y BK se confirmó que la actividad analgésica de 3,4-O-dicafeoil-epi-quínico está relacionada por su capacidad para inhibir la PGE2. Reportes previos demuestran que a bajas concentraciones el ácido 3,5-di-O-epi-cafeoilquinico inhibe PGE2. Además, la falta de actividad analgésica de 3,5-O-dicafeoil-epi-quinico puede explicarse por su baja inhibición tanto de PGE2 y BK.

La mezcla de terpenoides y los metabolitos purificados ésteres metílicos de 3,4-O-dicafeoilquínico, 3,4-O-dicafeoil-epi-quínico y 3,5-O-dicafeoil-epiquinico presentaron actividad antiinflamatoria, siendo los más activos los derivados del ácido cafeoilquinico. Los metabolitos que presentaron mayor actividad antioxidante presentaron una marcada

actividad antiinflamatoria. La acción captadora de radicales libres generados en los procesos inflamatorios, es considerada como uno de los tantos mecanismos de acción mediante los cuales una compuesto puede ejercer un efecto antiinflamatorio. Estos resultados demuestran correlación entre la capacidad de reducir los radicales libres con su actividad anti-inflamatoria.

En este estudio las especies de *C. souzae* y *C. urticifolia* que mostraron promisorio actividad, antioxidante, analgésica y antiinflamatoria, y éstos constituyen la base de futuros estudios encaminados hacia el planteamiento de los posibles mecanismos de acción implicados en sus efectos farmacológicos.

5.2 CONCLUSIONES

El presente estudio demostró que las especies *C. urticifolia*, *A. pilosa*, *S. gaumeri* y *C. souzae* representan una buena fuente de antioxidantes naturales con posible uso medicinal. Por otra parte, es importante una mayor comprensión de las propiedades antioxidantes de los extractos de *C. urticifolia*, *A. pilosa*, *S. gaumeri* y *C. souzae*, que podría obtenerse aplicando una amplia variedad de sistemas antioxidantes teniendo en cuenta que la efectividad de los extractos antioxidantes es, en gran medida, dependiente de las propiedades físicas y químicas del sistema al cual se les evalúa y de los métodos analíticos *in vitro* utilizados.

La actividad analgésica de los metabolitos de *C. urticifolia* está determinada por el sitio de unión de las unidades de ácido cafeico al esqueleto del ácido quínico.

La bioactividad reportada por la etnomedicina Yucateca podría fundamentarse no solo por los metabolitos bioactivos sino además al efecto sinérgico del conjunto de metabolitos secundarios que pudieron evidenciarse en las plantas en el tratamiento y remedio de dolor e inflamación.

5.3 PERSPECTIVAS

Determinar si la capacidad de atrapar radicales libres de los metabolitos 7-deoxynimbidiol, y los ésteres isoméricos del ácido 3,4-O-dicafeoilquínico, 3,4-O-dicafeoil-epi-quínico y 3,5-O-dicafeoil-epi-quínico está relacionada con la inhibición del factor transcripcional NF- κ B o el factor NF κ R/ ARE.

Asimismo, es importante determinar si la actividad antioxidante presente en los ésteres isoméricos del ácido-dicafeoilquínico está relacionada con otras actividades biológicas, i.e. productos finales de la glicación avanzada (AGEs).

Finalmente, para el caso de los metabolitos con actividad analgésica, sería conveniente determinar si ésta es debida a la influencia del sistema opioide o del sistema de alfa (α)-adrenérgico, además de identificar los demás mediadores antiinflamatorios involucrados.

6 APENDICE

Acmella pilosa R. K. Cansen.

Familia: Asteraceae.

Nombre común: tripa de gallina.

Descripción: planta herbácea perenne de hasta 40 cm. Tallo rastrero o erecto, densamente piloso, enraizando en los nudos. Hoja, ovalada a linear-lanceolada o elíptica, de 1-6 cm de largo, de 0.7 a 2 cm de ancho; obtusa a aguda en el ápice, truncada a cordada en la base, margen entero a dentoculado o irregularmente serrado, ciliado, trinervada, densamente pilosa en ambas caras. Cabezuelas (inflorescencias de flores densas y sésiles) solitarias o agrupadas por pocas en los extremos de las ramas, las brácteas dispuestas en 2 series, ovadas a lanceoladas, de 2.5-7 mm de largo, romas a acuminadas en el ápice, ciliadas. Flores liguladas (periféricas) generalmente 11, su tubo de 1-2 mm de largo, piloso, lámina elíptico-oblonga, de 2-4 mm de largo, amarillo-anaranjada, glabra; las flores del disco 70-300, de 1.5-3 mm de largo, también amarillas-anaranjadas, glabras, anteras cerca de 1 mm de largo, cafés oscuras a negruzcas. Frutos en Aquenios obovados a oblongos, comprimidos, los exteriores trígonos (con tres lados), de 1-2 mm de largo, negros o negruzcos, márgenes callosos, glabros en las caras, vilano por lo general ausente.

Distribución: México (Yucatán, Campeche, Quintana Roo y Chiapas) y Centroamérica (Guatemala y Belice).

Hábitats en la Península de Yucatán: Selva Mediana Subperennifolia, Selva Baja Caducifolia.

Calea urticifolia (Mill.) DC.

Familia: Asteraceae.

Nombres comunes: Tok'aban, tsikin, xtokában, amargo del monte.

Descripción: arbusto de 1 a 3 m de altura, algunas veces leñoso en la base del tallo, con hojas y ramas opuestas. Hojas estrecha o ampliamente ovadas, rara vez lanceoladas, de 5 -11 cm de longitud por 2-5 cm de ancho, agudas o semiagudas, redondeadas en la base, márgenes aserrados o crenado-serrados con 6 a 12 dientes en cada lado, lustrosas en ambos lados. Flores en cabezuelas frecuentemente muy numerosas, en fascículos o agrupaciones parecidas a umbelas en pedúnculos delgados de 0.5 a 2.5 cm de longitud; cabezuelas campanuladas, de 6 a 10 mm de longitud. Flores liguladas, amarillo brillante obovadas; flores del disco de 10 a 25, de color amarillo pálido; corola del disco de 4.5 a 5.5 mm de longitud, tubo 2 mm de longitud, lóbulos angostos de 2 mm de longitud; anteras amarillas. Fruto en aquenios negros, comprimidos o triangulares de 2 a 2.8 mm de longitud, lisos.

Distribución: amplia en México y Centroamérica.

Hábitats en la Península de Yucatán: Selva Baja Caducifolia con Caceas Columnares, Matorral de Duna costera, Selva baja caducifolia.

Cnidoscolus souzae McVaugh.

Familia: Euphorbiaceae.

Nombres comunes: chaya silvestre, mala mujer, ts'iim, ts'iim chaay.

Descripción: arbusto arborescente perenne de hasta 6 m de altura, tallos delgados, posee abundantes espinas delgadas, rectas, de color blanco, savia lechosa. Hojas alternadas palmadamente lobuladas de hasta 32 cm de largo y 30 cm de ancho, con pecíolos hasta de 28 cm de largo; lámina con pelos urticantes, glándulas petiolares. Flores blancas en racimos terminales de ramificación dicotómica; monoicas, con flores masculinas y femeninas separadas, cada una con partes no funcionales del otro sexo; brácteas y bractéolas pequeñas. Fruto una cápsula, ovoide o subglobosa, hispida; columela presente, delgada. Semillas globosas, con arilo y carúncula. Aunque la floración es más común en los meses de verano, se puede encontrar flores y frutos todo el año.

Distribución: endémica de la porción mexicana de la Provincia Biótica Península de Yucatán.

Hábitats: Selva Mediana Subcaducifolia.

Critonia aromatisans (DC.) R. M. King y H. Rob. (*syn Eupatorium hemipteropodium* B. L. Rob)

Familia: Asteraceae.

Nombre común: chi' op' le', chiople'.

Descripción: arbusto perenne aromático de hasta 4 m; tallos herbáceos, huecos, estriados y mayormente glabros. Hojas opuestas, ovadas u ovado-lanceoladas, de 10 -28 cm de largo y de 4. 5-20 cm de ancho, acuminadas en el ápice, con la base truncada a cuneada, y bruscamente estrechada en el pecíolo alado, margen aserrado y nervios prominulos en el envés. Inflorescencia en panículas anchas, multicéfalas y con capítulos oblongos; las flores blancuzcas y de 5 mm. Fruto en aquenio, pelosos en la base y con vilano del largo de la flor.

Distribución: México (Yucatán, Campeche y Quintana Roo) y las Antillas.

Hábitats en la Península de Yucatán: Selva Baja Caducifolia.

Scutellaria gaumeri Leonard.

Familia: Lamiaceae.

Nombres comunes: albahaca; ya'ax kakaltuum.

Descripción: planta herbácea perenne, pubescente. Hojas opuestas, simples, ovadas, de base elíptica, aguda, margen dentado, ápice obtuso; peciolo de 1. 5-2. 5 cm. de largo. Flores en racimos axilares; cáliz corto, tubular, con una protuberancia prominente en la parte superior; corola actinomorfa (con simetría bilateral), de color violeta pálido de 8 mm. de largo, con la guía de néctar blanco en el lóbulo inferior. Fruto en cuatro núculas (bellotas) encerradas en el cáliz persistente.

Distribución: México (Yucatán, Campeche, Quintana Roo y Veracruz) y de Centroamérica a Honduras.

Hábitats en la Península de Yucatán: Selva Baja Caducifolia, Selva Mediana Subcaducifolia, Selva Mediana Sunperennifolia.