

Efecto analgésico y antiinflamatorio del extracto acuoso de *Cestrum buxifolium* kunth

Analgesic and anti-inflammatory effect of *Cestrum buxifolium* Kunth aqueous extract

JUAN VICENTE GÓMEZ-BARRIOS^{1*}, CARLOS CIANGHEROTTI², MARÍA G MATOS¹,
MARIELLA PASTORELLO², DIOLIMAR BUITRAGO³, ANITA ISRAEL²
y MARGARITA SALAZAR-BOOKAMAN¹

Resumen

El *Cestrum buxifolium* Kunth es una planta perteneciente a la familia Solanaceae, la cual incluye especies con un amplio potencial toxicológico y farmacológico. En el presente trabajo se evaluó la posible actividad analgésica y antiinflamatoria del extracto acuoso de las hojas de *C. buxifolium*. La dosis tóxica 50 (DT₅₀) fue determinada por el cálculo de dosis-efecto a través del método gráfico de Litchfield y Wilcoxon. El efecto analgésico fue evaluado a través del ensayo de retirada de la cola por inducción de nocicepción térmica a través de un analgesímetro digital, mientras que la actividad antiinflamatoria fue determinada empleando un modelo de edema agudo de pata en ratas, inducido por λ -carragenina tipo IV, utilizando un pletismómetro digital. Para las pruebas de toxicidad y analgesia se emplearon ratones macho *balb-c*, y para la actividad antiinflamatoria se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley. La DT₅₀ determinada fue de 45 mg/kg. El extracto de *C. buxifolium*, a una dosis de 22,5 mg/kg.i.p. produjo un efecto analgésico estadísticamente significativo, comparado con el grupo control ($p < 0,01$), similar al observado en el grupo tratado con morfina (3 mg/kg, i.p), opiáceo de potente efecto antinociceptivo. Asimismo, este extracto inhibió significativamente el edema de pata de la rata, en comparación con el grupo control ($p < 0,05$), tanto a los 30 (70%), 60 (25%) y 180 min. (36.97%), postcarragenina. Este efecto es comparable con el de la fenilbutazona (AINES usado de referencia). Nuestros resultados demuestran que el extracto acuoso de *C. buxifolium* posee un importante efecto analgésico y antiinflamatorio. Se requieren estudios adicionales para establecer el o los compuestos presentes en este extracto, así como los posibles mecanismos de acción involucrados en estos efectos.

Palabras clave: *Cestrum buxifolium*, analgesia, inflamación, toxicidad aguda.

Abstract

Cestrum buxifolium Kunth is a plant from the Solanaceae family, which includes species with wide range toxicological and pharmacological activities. The aim of the present study was to evaluate the possible analgesic and anti-inflammatory activity of the aqueous extract of *C. buxifolium* leaves. Litchfield and Wilcoxon dose-effect method was used to determine TD₅₀. To evaluate analgesic and anti-inflammatory effects, the tail-flick and inhibition of carrageenin-induced edema were used, respectively. Analgesic and anti-inflammatory effects were studied in mice and rats, respectively. TD₅₀ value was 45mg/kg. *C. buxifolium* aqueous extract (22.5 mg/kg) i.p. produced statistically significant analgesic effect respect to control group ($p < 0.001$) and a similar effect to that observed in morphine treated group (3 mg/kg). In carrageenin test, it was observed that *C. buxifolium* aqueous extract (22.5 mg/kg) suppressed inflammatory response at 30, 60 and 180 min post treatment respect to control ($p < 0.05$). On the basis of these results we can conclude that *Cestrum buxifolium* Kunth aqueous extract has analgesic and anti-inflammatory effects. A possible mechanism to explain these effects warrants additional studies.

Key words: *Cestrum buxifolium*, analgesia, inflammation, acute toxicity.

¹ Laboratorio de Farmacología y ²Laboratorio de Neuropeptidos. Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. ³Instituto de Investigaciones. Facultad de Farmacia, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

* Correspondencia a: Juan V. Gómez-Barrios, Postgrado de Farmacología, Facultad de Farmacia, piso 7, Universidad Central de Venezuela. e-mail: gomezjv@hotmail.com

Introducción

Las plantas pertenecientes a la familia Solanaceae han sido ampliamente estudiadas desde el punto de vista farmacológico y toxicológico (Grunberg, 2007; Khalil y col., 2000; Pérez-Saad y Buznego, 2008). De esta familia se han encontrado en Venezuela algunos géneros de importancia biológica, tales como *Datura*, *Solanum*, *Nicotiana* y *Cestrum* (Benítez de Rojas y D'Arcy, 1998; Jáuregui y col., 2001), cuyas especies, contienen algunos metabolitos secundarios de reconocida actividad tóxica, como la escopolamina de *Datura stramonium* L. (Halpern, 2004), la solanina del *Solanum tuberosum* L. (Dalvi y col., 1983), la nicotina del *Nicotiana tabacum* L. (Buisson y Bertrand, 2002; Picciotto y col., 2000) y algunos glicósidos de varias especies del *Cestrum* (Chennaiah y col., 2007; Mimaki y col., 2002).

La familia Solanaceae se divide en dos subfamilias: Solanoideae, formada por siete tribus, 36 géneros y cerca de 1.400 especies, y la Cestroideae, formada por cinco tribus, 24 géneros y aproximadamente 413 especies (Hunziker, 1976). En Venezuela, el género *Cestrum* está representado por 32 especies distribuidas en los estados Amazonas, Aragua, Apure, Barinas, Bolívar, Carabobo, Cojedes, Distrito Capital, Falcón, Guárico, Lara, Mérida, Miranda, Nueva Esparta Portuguesa, Sucre, Táchira, Trujillo, Monagas, Yaracuy y Zulia (Benítez y William, 1998; Ciangherotti y col., 2004). *Cestrum buxifolium* está distribuida en los páramos andinos de Venezuela, donde es conocida como «uvito morado» (Benítez y William, 1998). Los miembros del género *Cestrum* tienen en común la presencia de numerosas saponinas esteroidales y triterpenos de importancia toxicológica y farmacológica (Begum y Goyal, 2007). Es conocido que muchos compuestos que poseen este tipo de estructura química han exhibido potencial actividad analgésica y/o antiinflamatoria (Pastorello y col., 2007; Moharram y col., 2007; Gepdiremen y col., 2007; Kim y col., 1999; Safayhi y col., 1997). El *C. diurnum* contiene derivados de la vitamina D3 como el glicósido 1,25-dihidroxi, de conocida actividad calcinogénica (Wasserman y col., 1976; Prema y Raghuramulu, 1994); y el *C. nocturnum* contiene saponinas esteroidales citotóxicas (Mimaki y col., 2001), sin embargo los extractos acuosos y orgánicos de esta especie ha mostrado significativa actividad analgésica en modelos murinos (Buznego y col., 2005a,b). Otras especies son empleadas en la medicina popular, tales como *C. Auriculatum*, cuyas hojas son utilizadas para el tratamiento de infecciones y alergias cutáneas (Rojas y col., 2003), se ha empleado como agente antihemorroidal y antirreumático

(De Feo, 1992), y para aliviar el dolor de cabeza (Hammond y col., 1998). Asimismo, el *C. parqui* ha sido utilizado como antifebril y antiinflamatorio (Backhouse y col., 1996).

En años recientes se estudiaron los componentes químicos de las hojas de *Cestrum buxifolium* Kunth, aislándose el ácido *epi*-ursólico a partir del extracto isopropanólico (Ciangherotti y col., 2004). Un estudio posterior demostró que esta molécula posee una importante actividad antiinflamatoria (Pastorello y col., 2007). Sin embargo, aún no se conocen los componentes químicos presentes en el extracto acuoso del *C. buxifolium*, y tampoco si éste posee alguna actividad biológica de importancia terapéutica. Por esta razón, en el presente trabajo se evaluó la posible actividad analgésica y antiinflamatoria del extracto acuoso de *C. buxifolium* Kunth (Cb), como un aporte a la caracterización farmacológica del género *Cestrum*, que a su vez nos conduzca al aislamiento de nuevas moléculas con potencial actividad terapéutica.

Materiales y métodos

MATERIAL BOTÁNICO

La especie *C. buxifolium* Kunth fue recolectada en el páramo de «La Culata», estado Mérida, Venezuela. Un ejemplar *voucher* fue depositado bajo el número N° DBB007 en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. El material botánico fue secado en una estufa a 60 °C por siete (7) días y posteriormente se realizó la decocción en agua a 70 °C durante una hora. Luego, el extracto acuoso fue liofilizado para la realización de las pruebas farmacológicas.

ANIMALES

Para los ensayos de toxicidad aguda y analgesia se emplearon ratones macho de la cepa *Balb-c*, con un peso de 22 ± 2 g. Para la prueba de actividad antiinflamatoria se emplearon ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, con un peso entre 150 ± 20 g. Ambas especies provenientes del Bioterio del Instituto Nacional de Higiene «Rafael Rangel», Caracas-Venezuela. Los animales se mantuvieron con libre acceso al alimento y agua antes de los experimentos.

DETERMINACIÓN DE LA DT₅₀ DEL EXTRACTO ACUOSO DE *CESTRUM BUXIFOLIUM* KUNTH

Para determinar la dosis tóxica 50 (DT₅₀) del extracto acuoso de *C. buxifolium* se utilizó el método observacional descrito por Irwin (1962) y Campbell

y Ritcher (1967). Los animales fueron divididos en seis grupos (N=6) y se les aplicaron los siguientes tratamientos: control (NaCl al 0,9%, i.p.), y *C. buxifolium* (Cb) (4, 16, 64, 128, 256 mg/kg, i.p.). Seguidamente, los ratones fueron observados a los 10, 30, 60 y 90 minutos, con el fin de identificar el efecto tóxico más frecuente. La DT₅₀ fue calculada a través del método gráfico de curva dosis-efecto tóxico de Litchfield y Wilcoxon (1949).

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANALGÉSICA DEL EXTRACTO ACUOSO DE *CESTRUM BUXIFOLIUM* KUNTH

Para determinar el posible efecto analgésico del Cb se empleó la prueba de la retirada de la cola en ratones (Davies y col., 1946). Los animales de experimentación fueron seleccionados de acuerdo con el tiempo de respuesta (retirada de la cola) al estímulo de calor radiante, descartándose aquellos animales que tenían un tiempo de respuesta mayor que seis (6) segundos. Los animales seleccionados se dividieron en cuatro grupos (N=7 c/u) y recibieron los siguientes tratamientos: 1. Control (NaCl 0,9%, i.p.); 2. extracto acuoso de *C. buxifolium* (1/2DT₅₀ (22,5 mg/kg, i.p.)); 3. Ácido acetilsalicílico (ASA) (Bayer, Venezuela; CAS A 3160) (200 mg/kg, p.o.); y 4. Morfina (MOR) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (3 mg/kg, i.p.). El estímulo nociceptivo de tipo térmico fue aplicado en la cola de los ratones utilizando un analgesímetro (LETICA, Scientific Instruments, LE 7106, España), para determinar el tiempo que tarda el animal en retirarla (período de latencia) (Davies y col., 1946). El ASA, un analgésico y antiinflamatorio no esteroideo (AINE) y la MOR, un opioide, se utilizaron como analgésicos de referencia. El período de latencia fue medido a los 10, 30, 60 y 90 minutos después de la administración de los tratamientos. El tiempo máximo de exposición al estímulo térmico fue de 15 segundos.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DEL EXTRACTO ACUOSO DE *CESTRUM BUXIFOLIUM* KUNTH

Para determinar la posible actividad antiinflamatoria de extracto acuoso del *Cestrum buxifolium* Kunth se empleó el método de inducción del edema por carragenina en la pata de la rata (Winter, 1962; Bhatt, 1977). Para ello, los animales fueron divididos en tres (3) grupos experimentales: Control (carboximetilcelulosa al 2%, p.o.), fenilbutazona (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO; 80 mg/Kg, p.o.), usada como antiinflamatorio de referencia; y extracto acuoso de Cb (22,5 mg/Kg, p.o.). El edema fue inducido por 0,1 mL de λ-carragenina tipo IV al 1% (en solución salina, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)

inyectada en la aponeurosis plantar de la pata trasera de la rata. Una vez transcurrido el tiempo de efecto pico para cada tratamiento (30 min. para el *C. buxifolium* y 1h para la FBZ), el edema desarrollado fue medido por desplazamiento de volumen de la pata, usando un pletismómetro digital (Ugo Basile 7140, Italia) antes, 30, 60 y 180 min. después de la administración de la carragenina.

Análisis estadístico

Los resultados de la prueba de la actividad analgésica fueron expresados como la media ± el error estándar de la media (EEM), y los resultados fueron analizados mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la prueba de Newman-Keul para determinar la significancia estadística. Los resultados de la actividad antiinflamatoria fueron expresados como la media ± el error estándar de la media (EEM) del volumen desplazado y como porcentaje de inhibición del edema, calculado mediante la fórmula $(1-V_t/V_c) \times 100$, donde V_t y V_c son el volumen medio de la pata de los animales tratados y control, respectivamente. La diferencia entre el grupo control y los tratados fueron analizados utilizando una prueba de *t de student* no pareada; un valor de $p < 0,05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

Resultados

OBTENCIÓN DE LA DT₅₀

Las alzas fueron el signo tóxico más frecuentemente observado en los animales tratados con el extracto acuoso del *C. buxifolium*. Este efecto se observó a partir de la dosis de 16 mg/kg y se presentó en el 50% de los ratones estudiados a la dosis de 64 mg/kg; encontrándose que el tiempo de efecto pico para el extracto fue 30 min y la DT₅₀ del *C. buxifolium* determinada fue de 45 mg/kg.

ACTIVIDAD ANALGÉSICA

El tiempo de latencia de retirada de la cola en los animales tratados con el extracto de *C. buxifolium* fue significativamente mayor en todos los tiempos evaluados, con respecto al control (Fig. 1), y comparables con los obtenidos en los grupos tratados con ASA y MOR, sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos con el *C. buxifolium* y la MOR, demostrando así que este extracto posee una potente actividad analgésica.

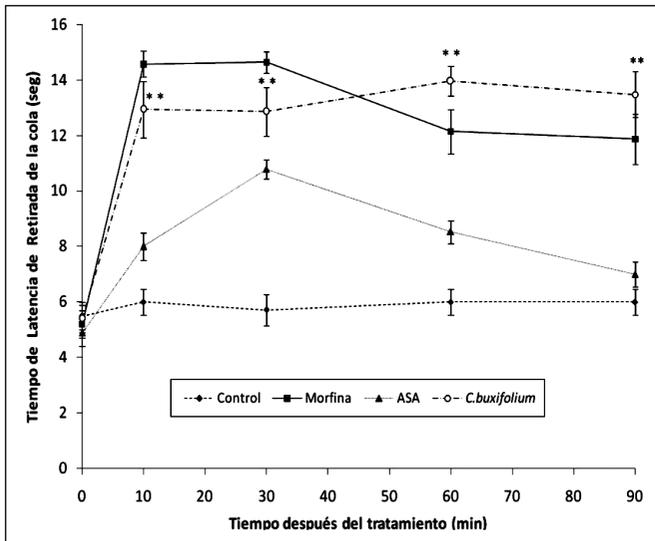


Figura 1. Efecto analgésico del extracto acuoso de *C. buxifolium* en ratones. La nocicepción térmica fue determinada por el ensayo de retirada de la cola. Los animales fueron pre-tratados con solución fisiológica (Control) (NaCl al 0,9%, i.p.), sulfato de morfina (3 mg/kg, i.p.), ácido acetilsalicílico (ASA) (200 mg/kg, i.p.) y extracto acuoso de *C. buxifolium* (22,5 mg/kg i.p.). Los resultados se expresan como la media \pm EEM de un N=7 para cada grupo (**p<0,001 comparado con el grupo control).

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

La inyección intraplantar de la carragenina provocó un edema significativo en la pata de la rata del grupo control. La administración i.p. del extracto acuoso de *C. buxifolium* suprimió significativamente la respuesta inflamatoria a los 30, 60 y 180 minutos posteriores a la inducción del edema comparados con el grupo control (Fig. 2); mostrando una potente y temprana inhibición del edema del 70% a los 30 min, la cual se mantiene a los 60 (25%) y 180 min (37%). El efecto antiinflamatorio observado a los 30 min en el grupo tratado con el extracto fue superior al obtenido con la FBZ (droga de referencia), sin embargo no hubo diferencias estadísticamente significativas entre estos dos grupos en los tiempos de estudio restantes. Estos resultados demuestran que el extracto acuoso del *C. buxifolium* Kunth posee una importante actividad antiinflamatoria.

Discusión

Los estudios realizados en las plantas del género *Cestrum* han mostrado una amplia gama de efectos farmacológicos, entre los cuales destacan la actividad antiinflamatoria, antipirética, citotóxica, antioxidante, antimalárica, antibiótica, entre otras (Begum y Goyal, 2007). Asimismo, las plantas de este género son consideradas tóxicas, en parte por los compuestos aislados de algunas especies como el 1 α , 25-dihidrocolecalfiferol presente en *C. diurnum*,

cuyo consumo produce calcinosis (Wasserman y col., 1976; Prema y Raghuramulu, 1994); o la parquina y la carboxiparquina, kaurenos tóxicos aislados de las hojas de *C. parqui* (McLennan y Kelly, 1984; Pearce y col., 1992). Nuestros resultados muestran que el extracto acuoso de las hojas de *C. buxifolium* Kunth, al igual que otras especies de *Cestrum* (Van der Lugt y col., 1992), induce un efecto tóxico agudo que se manifiesta a nivel de la locomoción, principalmente por enlentecimiento de los movimientos y dificultad para la marcha.

El uso etnobotánico como antiinflamatorio es el más común, entre las especies pertenecientes al género *Cestrum*, tales como el *C. nocturnum*, *C. parqui*, *C. auriculatum* y *C. laevigatum* (Begum y Goyal, 2007). A pesar de no haber estudios etnofarmacológicos de *C. buxifolium* Kunth, recientemente en nuestro laboratorio se demostró que el principal componente de la hoja de esta especie, el ácido *epi*-ursólico, produce un potente efecto antiinflamatorio en el modelo del edema agudo de la pata de la rata inducido por carragenina, sugiriendo la inhibición de la enzima fosfolipasa A₂ como el mecanismo antiinflamatorio responsable de este efecto (Pastorello y col., 2007). Cabe destacar que el extracto acuoso también produjo un importante efecto antiinflamatorio (figuras 2 y 3). Al tratarse del extracto acuoso, el efecto antiinflamatorio no podría ser atribuido al ácido *epi*-ursólico, ya que éste es insoluble en agua.

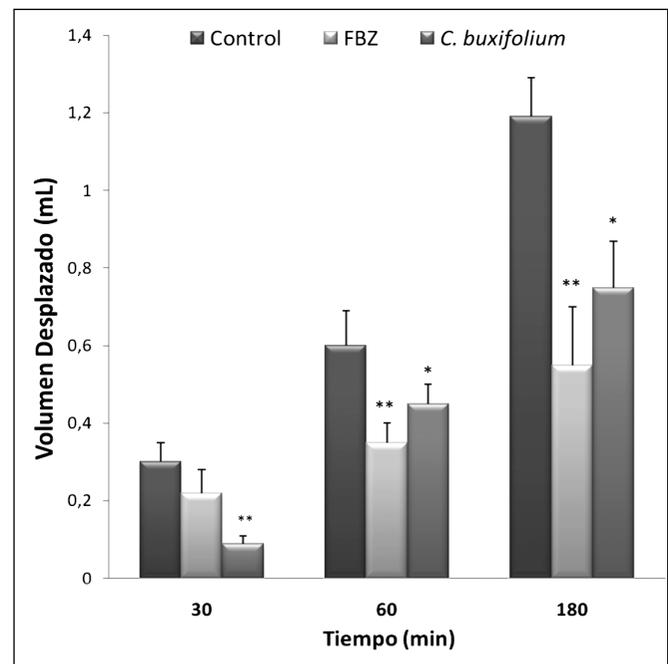


Figura 2. Edema inducido por carragenina en la pata de las ratas. Desplazamiento de volumen medido a través del ple-tismómetro en los diferentes grupos de tratamiento: control (CMC al 2%, p.o.), fenilbutazona (FBZ) y *C. buxifolium*, a los 30, 60 y 90 min postcarragenina. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de un N=6. (*p<0,05 y **p<0,01 comparado con el grupo control).

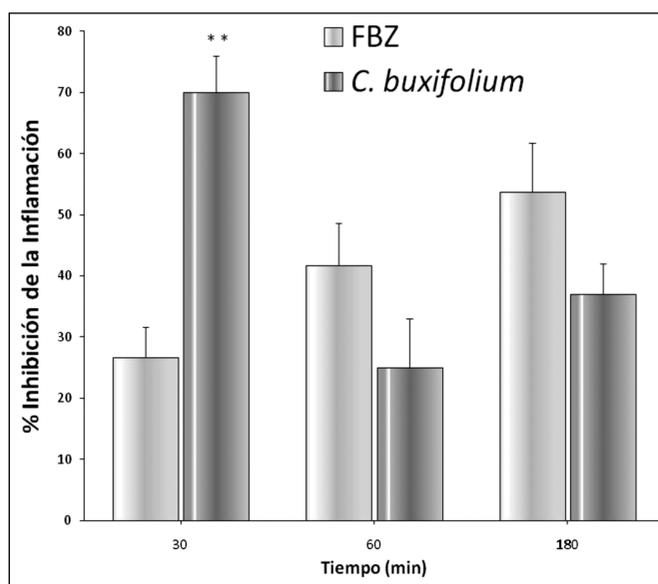


Figura 3. Efecto inhibitorio del extracto del *C. buxifolium* y la fenilbutazona (FBZ) sobre el edema de pata inducido a los 30, 60 y 180 min postcarragenina. Los resultados son expresados como la media \pm EEM del porcentaje de inhibición de la inflamación. (* $p < 0.01$ comparado con la FBZ).

Otras moléculas hidrosolubles estarían involucradas en este efecto, tal como se observa en otras especies de *Cestrum*. El *C. parqui* ha mostrado actividad en este mismo modelo de inflamación, y ésta ha sido atribuida a los paquinósidos A y B presentes en las hojas de la planta (Backhouse y col., 1996; Shehnaz y col., 1999). Asimismo, tanto el *C. parqui* como el *C. diurnum* y el *C. kunthii* contienen ácido ursólico (Bianchi y col., 1963; Catalan y col., 1992; Begum y Goyal, 2007), el cual se ha descrito como un potente antiinflamatorio (Recio y col., 1995a; Recio y col., 1995b).

Al igual que lo reportado para la especie *C. nocturnum* (Buznego y col., 2005; Pérez-Saad y Buznego, 2008), también el *C. buxifolium* Kunth posee actividad analgésica. Interesantemente, los efectos obtenidos con este extracto son comparables con la morfina en este modelo de nocicepción térmica de retirada de la cola en ratones. Estos resultados sugieren que posiblemente estemos en presencia de uno o varios compuestos de alto valor farmacológico, desde el punto de vista analgésico. Se hacen necesarios entonces, estudios adicionales a fin de obtener y caracterizar los compuestos responsables de esta actividad.

En conclusión, el extracto acuoso del *C. buxifolium* Kunth posee un importante efecto analgésico y antiinflamatorio, de forma comparable con diversos fármacos de referencia, sugiriendo la presencia de compuestos hidrosolubles de relevancia farmacológica que deberían ser aislados e identificados para su mejor aprovechamiento terapéutico.

Referencias bibliográficas

- Backhouse NC, Delparte R, Salinas P, Pinto A, Aravena S, Cassels BK. 1996. Antiinflammatory and antipyretic activities of *Cuscuta Chilensis*, *Cestrum Parqui*, and *Psorela glandulosa*. *Inter J Pharmacog* 34(1): 53-57.
- Begum M, Goyal M. 2007. Research and Medicinal Potential of the genus *Cestrum*. *Pharmacog Rev* 1: 320-332.
- Benítez de Rojas C, D'Arcy WG. 1998. The Genera *Cestrum* and *Sessea* (Solanaceae: Cestreae) in Venezuela. *Ann Missouri Bot Gard* 85:273-351.
- Benitez C, William G. 1998. The General *Cestrum* and *Sessea* (Solanaceae: Cestreae) in Venezuela. *Ann Missouri Bot Gard* 35: 273-351.
- Bhatt KR, Mehta RK, Shrivastava PN. 1977. A simple methods for recording anti inflammatory effects on rat paw edema. *Indian J Physiol Pharmacol* 21:399-400.
- Bianchi E, Girardi F, Díaz F, Sandoval R, Gonzales M. 1963. Components of the leaves and fruit of *Cestrum parqui*: tigogenin, digallogenin, digitogenin and ursolic acid. *Ann Chim* 53:1761-78.
- Buisson B, Bertrand D. 2002. Nicotine addiction: the possible role of functional upregulation *Trends Pharmacol Sci* 23:130-136.
- Buznego MT, Cuba A, Garriga E, Cuéllar A, Pérez-Saad H. 2005a. Efecto de los extractos de cloroformo y tolueno de *Cestrum nocturnum* L. sobre la conducta exploratoria y pruebas de analgesia. *Rev Cub Plant Med*. 10 (2):1-8.
- Buznego MT, Cuba A, Garriga E, Cuéllar A, Pérez-Saad H. 2005b. Efecto de los extractos acuoso y etanólico de *Cestrum nocturnum* L. sobre la conducta exploratoria y pruebas de analgesia *Rev Cubana Plant* 10 (2):1-9.
- Campbell D, Richter W. 1967. An observational method estimating toxicity and drug actions in mice applied to 68 reference drugs. *Acta Pharmac Toxicol* 25:345-363.
- Catalan CAN, Tomasini SP. 1992. Triterpenoids and sterols from *Cestrum kunthii*. *Fitoterapia* 63:551-555.
- Chennaiah S, Qadri SSSHC, Reddy VK, Rama Rao SV, Shyamsunder G, Raghuramulu N. 2007. Incorporation of *Cestrum diurnum* leaf improves intestinal Ca^{+2} transport in broilers. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103:645-650.
- Ciangherotti C, Buitrago D, Morales A. 2004. Estudio de los componentes químicos de las hojas y tallos de *Cestrum buxifolium* Kunth. *Rev Fac Far* 46:31-33.
- Dalvi R, Bowie W. 1983. Toxicology of solanine: an overview. *Vet Hum Toxicol*. 25:13-15.
- Davies O, Raventos J, Walpole L. 1946. A method for the evaluation of analgesic activity using rats. *Bri J Pharmacol* 1:255-256.
- De Feo V. 1992. Medicinal and magical plants in the northern Peruvian Andes. *Fitoterapia* 63: 417-440.
- Gepdiremen A, Mshvildadze V, Süleyman H, Elías R. 2007. Steroidal saponins from *Smilax china* and their anti-inflammatory activities. *Phytochemistry* 68:623-630.
- Grunberg NE. 2007. A neurobiological basis for nicotine withdrawal. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104:17901-17902.

- Halpern JH. 2004. Hallucinogens and dissociative agents naturally growing in the United States. *Pharmacol Therap.* 103: 131-138.
- Hammond GB, Fernández ID, Villegas LF, Vaisberg AJ. 1998. A survey of traditional medicinal plants from the Callejón de Huaylas, Department of Ancash, Perú. *J Ethnopharmacol* 61:17-30.
- Hunziker A. 1976. South American Solanaceae: A Sinoptic Survey. En: *The Biology and Taxonomy of the Solanaceae*. Editor: Hawkes, J. Eds: Linnean Society Symposium, Serie N°7. Academic Press. New York, pp. 49-85.
- Irwin S. 1962. Drug screening and evaluative procedures. *Science.* 136:123-128.
- Jáuregui D, Ríos N, Benítez de RC. 2001. Estudios anatómicos foliares en Solanaceae de Venezuela. *Anatomía foliar de diez especies de Cestrum L.* *Acta Cient Venezol* 52:248-260.
- Khalil AA, Steyn S, Castagnoli N Jr. 2000. Isolation and characterization of a monoamine oxidase inhibitor from tobacco leaves. *Chem Res Toxicol.* 13:31-5.
- Kim SY, Son KH, Chang HW, Kang SS, Kim HP. 1999. Inhibition of mouse ear edema by steroidal and triterpenoid saponins. *Arch Pharm Res.* 22:313-6.
- Litchfield J, Wilcoxon F. 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J Pharmacol Exp Therap* 96:99-113.
- McLennan MW, Kelly WR. 1984. *Cestrum parqui* (green cestrum) poisoning in cattle. *Austral Veter J* 61: 289-91.
- Mimaki Y, Watanabe K, Ando Y, Sakuma C, Sashida Y, Furuya S, Sakagami H. 2001. Flavonol glycosides and steroidal saponins from the leaves of *Cestrum nocturnum* and their cytotoxicity. *J Nat Prod.* 64(1): 17-22.
- Moharram FA, El-Shenawy SM. 2007. Antinociceptive and anti-inflammatory steroidal saponins from *Dracaena ombet*. *Planta Med* 73(10):1101-6.
- Pastorello M, Ciangherotti C, Colman T, Amesty A, Buitrago D, Israel A. 2007. Actividad antiinflamatoria del ácido epi-ursólico y docking a la fosfolipasa A₂. *Rev Fac Far* 70: 47-52.
- Pearce CM, Skelton NJ, Naylor S, Kanaan R, Kelland J, Oelrichs P, Sanders JKM, Williams DH. 1992. Parquin and carboxyparquin, toxic kaurene glycosides from the shrub *Cestrum parqui*. *J Chem Soc Perkin Trans.* 1:593-600.
- Pérez-Saad H, Buznego MT. 2008. Behavioral and antiepileptic effects of acute administration of the extract of the plant *Cestrum nocturnum* Lin (lady of the night). *Epilepsy Behav* 12(3):366-372.
- Picciotto MR, Caldarone BJ, King SL y Zachariou V. 2000. Nicotinic Receptors in the Brain: Links between molecular biology and behavioural Neuropsychopharmacol. 22(5):451-465.
- Prema TP, Raghuramulu N. 1994. Free Vitamin D₃. Metabolites in *Cestrum diurnum* Leaves. *Phytochemistry* 37(3): 677-681.
- Recio M, Giner R, Mañes S, Ríos L. 1995a. Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural triterpenoids. *Planta Med* 61:182-5.
- Recio M, Giner R, Mañes S, Ríos L. 1995b. Investigations on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucomelas*. *Planta Med* 61:9-12.
- Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernandez I, Alban J y Lock O. 2003. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 88: 199-204.
- Safayhi H, Sailer ER. 1997. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. *Planta Med* 63:487-93.
- Shehnaz D, Hamid F, Baqai FT, Ahmed VU. 1999. Effect of crude extract of *Cestrum parqui* on carageenin induced rat paw edema and aggregation of human blood platelets. *Phytother Res* 13(5): 445-7.
- Van der Lugt JJ, Nel PW, Kitching PH. 1991. The pathology of *Cestrum laevigatum* (Schlechtld.) poisoning in cattle. *Onderstepoort J Veteri Res* 58(3): 211-221.
- Wasserman R, Corradino R, Krook L, Hughes M, Haussler M. 1976. Studies on the 1 α , 25-dihidroxycholecalciferol activity in a calcinogenic plant, *Cestrum diurnum*, in the chick. *J Nutrition* 106: 457-465.
- Winter A, Risley E, Nuss G. 1962. Carrageenin-induced Edema in Hind paw as an Assay for Anti-inflammatory Drugs. *Proc Soc Exp Biol.* 111:554-547.