

Actividad analgésica del ácido *epi*-ursólico aislado de las hojas de *Cestrum buxifolium* Kunth Comparación con el ácido ursólico

Analgesic activity of *epi*-ursolic acid isolated from *Cestrum buxifolium* Kunth leaves Comparison with ursolic acid

CARLOS CIANGHEROTTI^{A,B,*}, JAIRO BERMÚDEZ^C, MARÍA RODRÍGUEZ^C,
DAMAYZZA ESCALONA^B, GIOVANNINA ORSINI^D, MARGARET VALDERRAMA^E,
MARGARITA SALAZAR-BOOKAMAN^B, ANITA ISRAEL^{A,*}

Resumen

El ácido *epi*-ursólico es un inusual triterpeno pentacíclico presente en algunas plantas. Este compuesto ha sido aislado por nuestro grupo de investigación a partir de las hojas de *Cestrum buxifolium* Kunth, una planta que crece en los páramos venezolanos y tiene actividad analgésica y anti-inflamatoria. El ácido *epi*-ursólico ha sido estudiado por sus propiedades antineoplásicas y anti-inflamatorias, siendo la disminución de la síntesis de prostaglandinas el mecanismo más destacado. En este trabajo se evaluó la actividad analgésica de este triterpeno y se comparó con su isómero, el ácido ursólico, un conocido analgésico y anti-inflamatorio. La evaluación del efecto antinociceptivo se llevó a cabo en ratones, por el método químico de contorsiones inducidas por el ácido acético y por el método térmico de retirada de la cola. El ácido *epi*-ursólico fue capaz de disminuir el número de contorsiones y de incrementar el tiempo de reacción (latencia) a la aplicación del calor en la cola del ratón, en comparación con el grupo control. En el método químico, 40 mg/Kg de ácido *epi*-ursólico produjo una mayor actividad analgésica que 40 mg/Kg de ácido ursólico ($85,63 \pm 2,50\%$ y $74,93 \pm 3,59\%$ de antinocicepción, respectivamente) y que 100 mg/Kg de ácido acetilsalicílico ($70,98 \pm 3,59\%$). Asimismo, en el método térmico el ácido *epi*-ursólico produjo tiempos de reacción más prolongados que su isómero, a los 60 ($p < 0,01$) y 90 minutos ($p < 0,05$) de observación, respectivamente. Estos resultados muestran, por primera vez, al ácido *epi*-ursólico como antinociceptivo y sientan las bases para el estudio de los mecanismos por medio de los cuales ejerce este efecto farmacológico.

Palabras clave: ácido *epi*-ursólico, analgesia, *Cestrum buxifolium*, Solanaceae, ácido ursólico.

Abstract

Epi-ursolic acid is an unusual pentacyclic triterpene present in some plants. This compound has been isolated by our research group from *Cestrum buxifolium* Kunth leaves, a plant that grows in the Venezuelan wasteland (páramo) and has analgesic and anti-inflammatory activity. *Epi*-ursolic acid has been studied for its antineoplastic and anti-inflammatory properties, being a decrease in prostaglandin synthesis the most prominent mechanism. In this work we assessed the analgesic activity of this triterpene and compared it with its isomer, ursolic acid, a known analgesic and anti-inflammatory agent. Evaluation of the antinociceptive effect was carried out by the chemical method of acetic acid-induced writhing in mice and by the thermic method of tail flick in mice. *Epi*-ursolic acid was able to decrease writhing numbers and increase tail flick reaction time (latency) compared to the control group. In the chemical method, 40 mg/Kg of *epi*-ursolic acid produced a greater analgesic activity than 40 mg/Kg of ursolic acid ($85.63 \pm 2.50\%$ and $74.93 \pm 3.59\%$ of antinociception, respectively) and that of 100 mg/Kg of acetylsalicylic acid ($70.98 \pm 3.59\%$). Likewise, in the thermic method *epi*-ursolic acid showed longer reaction times than its isomer, at 60 ($p < 0.01$) and 90 minutes ($p < 0.05$) of observation, respectively. These results show, for the first time, *epi*-ursolic acid as a antinociceptive agent and provide the basis for studying the mechanisms by which it exerts this pharmacological effect.

Key words: *epi*-ursolic acid, analgesia, *Cestrum buxifolium*, Solanaceae, ursolic acid.

- A Laboratorio de Neuropeptidos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.
B Laboratorio de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.
C Laboratorio de Productos Naturales, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.
D Herbario "Victor Manuel Ovalles", Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.
E Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.
* Correspondencia: carlosciangherotti@yahoo.com; astern88@gmail.com.

Introducción

Los triterpenos pentacíclicos son considerados fármacos promisorios para el tratamiento de varios procesos patológicos, tales como: la diabetes (Alqahtani y col., 2013), el cáncer (Ghante y Jamkhande, 2019), las infecciones parasitarias (Isah y col., 2016) y la inflamación (Safayhi y Sailer, 1997). Uno de los más estudiados ha sido el ácido ursólico (AU), un triterpeno aislado de un gran número de especies vegetales, que ha demostrado actividad anti-inflamatoria, analgésica, antineoplásica, antibacteriana, anti-diabética, neuroprotectora, entre otras actividades farmacológicas (Seo y col., 2018; Mlala y col., 2019). En los últimos años el AU ha sido objeto de varios estudios clínicos, entre los que se destacan los de Fase I en pacientes con tumores sólidos y de Fase II en pacientes con síndrome metabólico (Zhu y col., 2013; Quian y col., 2015; Ramírez-Rodríguez y col., 2017). A diferencia del AU, el ácido *epi*-ursólico (*epi*-AU) ha sido muy poco estudiado. El *epi*-AU es el isómero 3- α -hidroxi del AU (**figura 1**), el cual ha mostrado actividad citotóxica sobre varias líneas celulares de cáncer (Qamar y col., 2010; Elsbaey y col., 2017), actividad anti *Mycobacterium tuberculosis* (Woldemichael y col., 2003) y actividad anti-inflamatoria (Pastorello y col., 2007). A pesar de la gran similitud estructural entre estos dos compuestos, algunos hallazgos han mostrado diferencias en cuanto sus efectos citotóxicos en cáncer (Qamar y col., 2010) y a la inhibición de mediadores de la inflamación en macrófagos (Suh y col., 1998), en donde el *epi*-AU fue el isómero activo en la inhibición de la liberación de prostaglandina E2 (PGE2) y del incremento de la expresión de la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS)

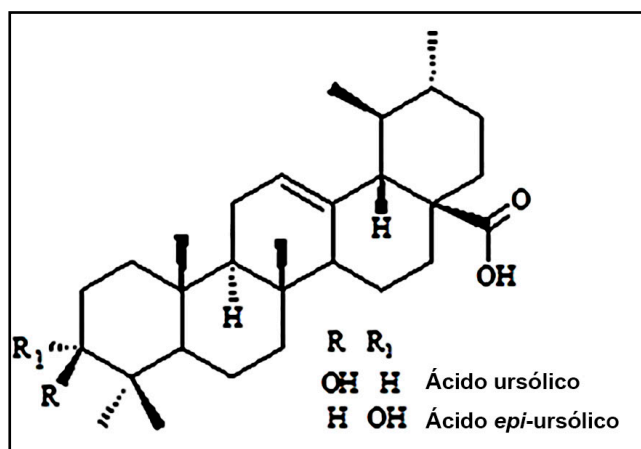


Figura 1. Estructura de los ácidos ursólico y *epi*-ursólico.

estimulado por el lipopolisacárido (LPS). Pastorello y col. (2007) demostraron la actividad anti-inflamatoria del *epi*-AU utilizando el modelo del edema de la pata inducido por la carragenina en ratas y se propuso a la fosfolipasa A₂ (PLA₂) como uno de los posibles blancos anti-inflamatorios de este triterpeno. Está bien establecido que la disminución de la síntesis de PGE2 es parte del mecanismo antinociceptivo de varios analgésicos, incluyendo a los agentes anti-inflamatorios no esteroideos (Kawabata, 2011).

El *epi*-AU es mucho menos abundante en la naturaleza que el AU. En la **tabla I** se muestran las especies de plantas de donde ha sido aislado este compuesto. Ciangherotti y col. (2004) aislaron el *epi*-AU de las hojas de *Cestrum buxifolium* Kunth (Solanaceae), una planta que crece en los páramos venezolanos cuyo extracto acuoso de las hojas produce efecto anti-inflamatorio y potente actividad analgésica (Gómez-Barrios y col., 2008). Cabe la posibilidad de que esta especie sea una de las fuentes naturales principales de *epi*-AU, por lo que es necesario hacer un análisis del rendimiento de la extracción.

Tabla I
Plantas que contienen ácido *epi*-ursólico. Los nombres fueron actualizados de acuerdo con The plant list (2013)

Especie	Familia	Referencia
<i>Alocasia macrorrhizos</i> (L.) G. Don	Araceae	Elsbaey y col., 2017
<i>Brilliantaisia palisotii</i> Lindau (<i>B. lamia</i> (Nees) Benth.)	Acanthaceae	Berrondo y col., 2003
<i>Calceolaria pinifolia</i> Cav.	Calceolariaceae	Woldemichael y col., 2003
<i>Cestrum buxifolium</i> Kunth	Solanaceae	Ciangherotti y col., 2004
<i>Eriobotrya japonica</i> (Thunb.) Lindl.	Rosaceae	Zhang y col., 2015
<i>Lavandula officinalis</i> Chaix (<i>L. angustifolia</i> Mill.)	Lamiaceae	Hatem y Najah, 2016
<i>Mentha aquatica</i> L.	Lamiaceae	Ferhat y col., 2017
<i>Miconia albicans</i> (Sw.) Steud.	Melastomataceae	Pieroni y col., 2011
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Lamiaceae	Qamar y col., 2010
<i>Pavetta indica</i> L. var. <i>tomentosa</i> (Roxb. ex Sm.) Hook. f. (<i>P. tomentosa</i> Roxb. ex Sm.)	Rubiaceae	Khare, 2016
<i>Salvia lanata</i> Roxb. (<i>S. mukerjeei</i> Bennet & Raizada)	Lamiaceae	Mukherjee y col., 1982
<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge	Lamiaceae	Duke, 1992
<i>Salvia nicolsoniana</i> Ramamoorthy, Ined.	Lamiaceae	Pereda y col., 1986
<i>Salvia officinalis</i> L.	Lamiaceae	Duke, 1992, Rodrigues y col., 2012
<i>Scurrula parasitica</i> L.	Loranthaceae	Liu y col., 2016
<i>Verbena officinalis</i> L.	Verbenaceae	Deepak y Handa, 2000
<i>Vitex trifolia</i> L.	Lamiaceae	Liu y col., 2014

Con base en la información sobre las acciones farmacológicas del *epi*-AU y de manera de poder establecer las bases para el desarrollo pre-clínico y clínico de este inusual triterpeno pentacíclico, se realizó la evaluación comparativa del efecto analgésico del AU y del *epi*-AU aislados del *C. buxifolium*, mediante el uso de un modelo térmico y químico de nocicepción en ratones.

Materiales y métodos

MATERIAL BOTÁNICO

La planta fue recolectada en los alrededores del Hotel Los Frailes, en la carretera trasandina, Sector Los Frailes, Edo. Mérida, a una altitud de 2800 m snm, en el mes de enero de 2013. La identificación de la especie se llevó a cabo en el Herbario "Víctor Manuel Ovalles" (MYF) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, a través de un análisis morfo-anatómico empleando la clave botánica de los expertos en el género (Benitez de Rojas y D'Arcy, 1998). Un ejemplar testigo (*voucher*) se encuentra depositado bajo el número MYF 28570.

OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

El material vegetal fue secado a temperatura ambiente. Las hojas fueron sometidas a pulverización mecánica con ayuda de un molino de disco de atrición. Para la preparación del extracto las hojas molidas fueron maceradas con metanol (2L x 3) durante 6 días a temperatura ambiente. El extracto fue evaporado al vacío utilizando un rotaevaporador.

AISLAMIENTO DEL ÁCIDO *EPI*-URSÓLICO

El extracto metanólico (73 g) de las hojas de *Cestrum buxifolium* fue fraccionado por cromatografía líquida al vacío (VLC) sobre sílica gel utilizando los siguientes solventes y mezclas para la obtención de fracciones: n-Hexano (100%), DCM:MeOH (90:10, v/v), MeOH (100%), MeOH:H₂O (50:50, v/v) y H₂O (100%). La fracción DCM:MeOH fue sometida a una a separación a través de una columna de celita y carbón activado, para eliminar la clorofila de la fracción. Una vez evaporado el solvente, la fracción fue sometida a separación por cromatografía

de columna, utilizando sílica gel como fase estacionaria y eluida con mezclas de solventes de polaridad creciente. El fraccionamiento y la purificación del *epi-AU* fueron monitoreados por cromatografía de capa fina (TLC) utilizando un patrón de *epi-AU*.

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para los ensayos de antinocicepción se emplearon ratones machos de la cepa Balb-c, con un peso de 21 ± 4 g, 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.

ACTIVIDAD ANALGÉSICA

Para los experimentos *in vivo* los animales fueron divididos en 5 grupos de 7 animales cada uno ($n=7$): Control (carboximetilcelulosa 1%, VO); *epi-AU* (40 mg/kg VO); AU (40 mg/kg, VO); Ácido acetilsalicílico (Bayer Venezuela, CAS A 3160) (100 mg/kg, VO); y Morfina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (3mg/kg, i.p.). El ácido acetilsalicílico, un agente anti-inflamatorio no esteroideo (AINE) y la morfina, una agonista de los receptores opiáceos, fueron utilizados como analgésicos de referencia.

CONTORSIONES INDUCIDAS POR EL ÁCIDO ACÉTICO

Se utilizó el método descrito por Koster y col. (1959). Luego de 30 minutos de la administración de los tratamientos, los animales recibieron, vía intraperitoneal, una solución de ácido acético al 0,6% i.p. (0,01 μ L/g de peso). Posteriormente fue registrado el número de contorsiones abdominales inducidas por el ácido acético durante 30 minutos.

MODELO DE RETIRADA DE LA COLA

Se utilizó el método descrito por Davies y col. (1946). Los animales de experimentación fueron seleccionados de acuerdo con el tiempo de respuesta (retirada de la cola o latencia) al estímulo de calor radiante, descartándose aquellos animales que tenían un tiempo de respuesta mayor que seis(6) segundos. El estímulo nociceptivo de tipo térmico fue aplicado en la cola de los ratones utilizando un analgesímetro (LETICA, Scientific Instruments, LE7106, España) y 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.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se presentan como la media \pm el error estándar de la media. Los datos fueron analizados con el programa Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA, USA) mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y por comparaciones múltiples de Bonferroni. Los resultados con valores de $p < 0,05$ fueron considerados como estadísticamente significativos.

Resultados

El fraccionamiento total consistió en una separación robusta por VLC de 70 g del extracto crudo de *C. buxifolium*. La fracción DCM:MeOH (90:10, v/v) fue de 3,7393 g de masa y tuvo un rendimiento de 5,12% del total del extracto crudo. Luego de someter esta fracción a elución sobre celita y carbón activado, se obtuvo 2,2895 g de la misma (61,23%). La separación de los constituyentes químicos de la fracción DCM:MeOH, a través de cromatografía de adsorción en columna, resultó en 185 fracciones de polaridad

creciente (proporciones diferentes de Hx, AcOEt y MeOH). La fracción 99, eluida con Hx:AcOEt 50:50 v/v, resultó ser un sólido blanco abundante (0,48 g), el cual fue identificado como ácido *epi*-ursólico a través de TLC, utilizando un patrón aislado y caracterizado por Ciangherotti y col. (2004) de las hojas de esta especie. El factor de retención de la fracción 99 es de 0,28 en comparación con 0,27 del *epi*-AU de referencia.

El *epi*-AU produjo un efecto analgésico en ambos modelos de nocicepción (**figuras 2 y 3**). Cuarenta mg/Kg de este isómero del ácido ursólico fueron capaces de inhibir en un $85,63 \pm 2,50\%$ las contorsiones abdominales inducidas por el ácido acético mostrando una mayor potencia que el AU (40 mg/Kg), el cual inhibió las contorsiones en un $74,93 \pm 3,59\%$ (**Tabla II**). En la **figura 2** se observa el número de contorsiones abdominales con respecto al tratamiento que recibieron los animales, 30 minutos previos a la administración i.p. de la solución de ácido acético al 0,6%. La disminución de las contorsiones por el *epi*-

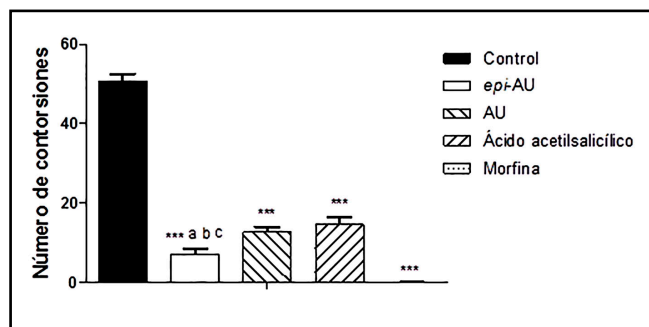


Figura 2. Efecto de los ácidos *epi*-ursólico y ursólico sobre las contorsiones inducidas por el ácido acético en ratones. Los valores representan la media \pm E.S.M. Control: carboximetilcelulosa 1% VO. *epi*-AU: ácido *epi*-ursólico 40 mg/Kg VO. AU: ácido ursólico 40 mg/Kg VO. Ácido acetilsalicílico: 100 mg/Kg VO. Morfina: 3 mg/Kg, i.p. *** $p < 0,001$ con respecto al grupo control. ^a $p < 0,05$ con respecto al grupo AU. ^b $p < 0,01$ con respecto al grupo ácido acetilsalicílico. ^c $p < 0,001$ con respecto al grupo morfina.

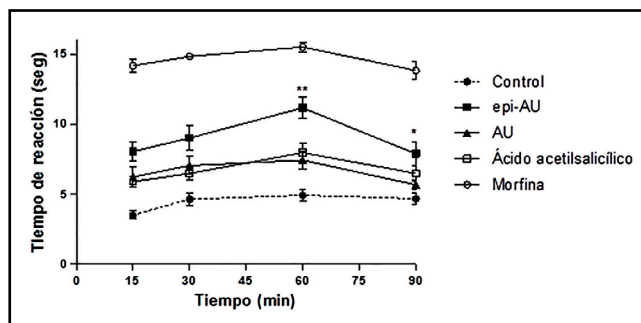


Figura 3. Tiempo de reacción o latencia de retirada de la cola en el modelo de nocicepción térmica en ratones. Los valores representan la media \pm E.S.M. Control: carboximetilcelulosa 1%, VO. *epi*-AU: ácido *epi*-ursólico 40 mg/Kg, VO. AU: ácido ursólico 40 mg/Kg, VO. Ácido acetilsalicílico: 100 mg/Kg, VO. Morfina: 3 mg/Kg, i.p. ** $p < 0,01$ con respecto al grupo AU. * $p < 0,05$ con respecto al grupo AU.

AU fue significativamente mayor que la del AU ($p < 0,01$) y que el AINE de referencia, el ácido acetilsalicílico ($p < 0,01$); sin embargo, el efecto fue significativamente inferior al producido por 3 mg/kg de morfina ($p < 0,001$).

En el modelo de térmico de nocicepción se observó un incremento del tiempo de reacción en los ratones tratados con el *epi*-AU con respecto al grupo control a todos los tiempos de evaluación (**figura 3**). Asimismo, el *epi*-AU mostró mejor efecto antinociceptivo que el ácido acetilsalicílico a los 15 ($p < 0,05$), 30 ($p < 0,05$) y 60

Tabla II
Actividad antinociceptiva en el modelo de contorsiones inducidas por el ácido acético

Tratamiento	% de antinocicepción*
Ácido <i>epi</i> -ursólico	$85,63 \pm 2,50$
Ácido ursólico	$74,93 \pm 2,78$
Ácido acetilsalicílico	$70,98 \pm 3,59$
Morfina	$99,72 \pm 0,28$

*Los valores representan la media \pm E.S.M. Control: carboximetilcelulosa 1%, VO. Ácido *epi*-ursólico (*epi*-AU): 40 mg/Kg, VO. Ácido ursólico (AU): 40 mg/Kg, VO. Ácido acetilsalicílico: 100 mg/Kg, VO. Morfina: 3 mg/Kg, i.p.

($p < 0,01$) minutos de observación. De manera interesante, el *epi*-AU produjo un mayor efecto antinociceptivo que su isómero beta (AU), mostrando mayores tiempos de reacción a los 60 ($p < 0,01$) y 90 minutos ($p < 0,05$), respectivamente. El analgésico opiode produjo un efecto analgésico significativamente mayor que el de todos los demás tratamientos en este modelo.

Discusión

Las plantas del género *Cestrum* se han caracterizado por producir efecto analgésico en modelos experimentales, destacándose las especies *C. nocturnum* (Buznego y col., 2005), *C. auriculatum* y *C. hediundinum* (Kawano y col., 2009). Nuestro grupo ha demostrado que el extracto acuoso de la especie *C. buxifolium* es un potente analgésico en el modelo térmico de retirada de la cola en ratones (Gómez-Barrios y col., 2008), contribuyendo con el conocimiento farmacológico de este género. Nuestros resultados indican la presencia de *epi*-AU en las hojas de *C. buxifolium*, sin embargo su contribución en el efecto analgésico del extracto acuoso de las hojas de esta planta puede ser muy limitado, debido a la pobre solubilidad del *epi*-AU en agua.

Se ha propuesto al AU como un marcador fitoquímico del género *Cestrum*, sobre la base de que la mayoría de las especies estudiadas contienen este triterpeno pentacíclico. Tal es el caso de *C. parqui* (Bianchi y col., 1963), *C. diurnum* (Chakravarti y col., 1964), *C. nocturnum* (Bhattacharya y col., 1977), *C. laurifolium* (Ferrer y col., 2007) y *C. ruizteranianum* (Galarraga y col., 2011). En contraste, el *epi*-AU no es un triterpeno común en el género *Cestrum*, ya que solamente ha sido reportado en *C. buxifolium* (Ciangherotti y col., 2004).

Las propiedades analgésicas del AU han sido bien establecidas (Tapondjou y col., 2003; Taviano y col., 2007; González-Trujano y col., 2012; Martínez y col., 2012; Rodríguez y col., 2012; Déciga-Campos y col., 2013; Verano y col., 2013). Martínez y col. (2012) reportaron que el AU produce un efecto analgésico de manera dependiente de la dosis, en el modelo de contorsiones inducidas por el ácido acético (0,6%), en donde 100 mg/kg de AU mostraron un $97,7 \pm 1,3\%$ de antinocicepción y dosis menores como las de 30 y 10 mg/kg mostraron alrededor del 80% de actividad antinociceptiva. Nuestros resultados muestran que 40 mg/Kg de AU producen un $74,93 \pm 2,78\%$ de antinocicepción (**Tabla II**). Esta diferencia de actividad puede deberse a la susceptibilidad de las cepas de ratones utilizadas, siendo ratones Balb/c en nuestro caso y ratones suizos en los trabajos de Martínez y col. (2012). El AU ha sido asociado a la inhibición de las ciclooxigenasas 1 y 2 (COX-1 y COX-2) y a la disminución de citocinas proinflamatorias (Silva y col., 2017; Ahmad y col., 2018; Zhao y col., 2019); no obstante, en el caso de la actividad analgésica se ha atribuido al incremento de los niveles de GMPc y a un efecto aditivo sinérgico con los receptores de serotonina 5HT_{1A}, aunado a una actividad antagonística con el receptor de potencial transitorio V1 (TRPV1) (Verano y col., 2013). La actividad analgésica del AU en el ensayo de formalina no fue modificado por la naloxona o el flumazenil, lo que sugiere que el mecanismo antinociceptivo no involucra a los receptores de opiodes, ni al receptor GABA_A (Verano y col., 2013). Sin embargo, esta relación no está del todo clara, ya que Taviano y col. (2007) demostraron que la naloxona revierte el efecto analgésico de AU (20 mg/Kg, VO) en el ensayo de la placa caliente en ratones, un modelo térmico de nocicepción

ampliamente utilizado. Tomando todo en conjunto se puede establecer que existe una estrecha relación entre los mecanismos anti-inflamatorios y analgésicos.

En nuestro laboratorio se demostró que el principal componente de la hoja de esta especie, el ácido *epi*-AU, produce un potente efecto anti-inflamatorio 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 anti-inflamatorio responsable de este efecto (Pastorello y col., 2007). El presente estudio muestra, por primera vez, el efecto analgésico del *epi*-AU. Sin embargo, no se conocen con certeza los mecanismos implicados en la actividad antinociceptiva de este compuesto. El *epi*-AU es capaz de disminuir la PGE2 en el modelo de inflamación *in vitro* de macrófagos estimulados por el LPS (Suh y col., 1998). El incremento de la síntesis de prostaglandinas es un mecanismo común de inflamación y dolor. Ramalho y col. (2014) demostraron que *epi*-AU es un inhibidor de la catepsina L humana, una cisteína proteasa responsable de la producción de muchos neuropéptidos. Esta enzima está involucrada en la nocicepción, y su inhibidor Clk148 produce efecto analgésico en el modelo de las contorsiones inducidas por el ácido acético (Gu y col., 2013). Por esta razón se sugiere la realización de experimentos adicionales para demostrar si la inhibición de la catepsina L está involucrada en la actividad analgésica de este triterpeno.

De manera interesante, los resultados demuestran que el *epi*-AU produce mayor efecto analgésico que el AU. No es la primera vez que se observan efectos diferentes entre estos dos isómeros. Suh y col. (1998) mostraron que el *epi*-AU a

diferencia del AU, bloqueó el incremento de la PGE2, la expresión de COX-2 y la iNOS estimulada por LPS en los macrófagos. La activación de macrófagos está involucrada en la nocicepción inducida por el ácido acético administrado intraperitonealmente (Ribeiro y col., 2000). Por otro lado, el *epi*-AU es más potente que el AU en la inhibición de la catepsina L, con CI_{50} de $6,50 \pm 0,9 \mu\text{M}$ y $39,50 \pm 4,7 \mu\text{M}$, respectivamente (Ramalho y col., 2014), siendo esto otra posible explicación al efecto analgésico diferencial. A pesar de la indudable similitud estructural entre estos compuestos, en la predicción de la actividad anti-inflamatoria asistida por computadora, el *epi*-AU mostró mejor biodisponibilidad oral con respecto al AU y *drug-likeness* es decir, "moléculas que contienen grupos funcionales y/o tienen propiedades físicas consistentes con la mayoría de las drogas conocidas" (Zhang y col., 2015).

En resumen, este trabajo establece al *epi*-AU como un potencial analgésico, con mayor actividad que el ácido acetilsalicílico y que su isómero, el AU. Asimismo, contribuye a la comprensión de la relación entre la composición química y la actividad antinociceptiva de las plantas del género *Cestrum*, en especial *C. buxifolium*. Por otra parte, sienta las bases para el estudio de los mecanismos mediante los cuales el *epi*-AU ejerce su efecto analgésico, en miras del desarrollo de este potencial fármaco.

Referencias bibliográficas

- Ahmad A, Abuzinadah MF, Alkreathy HM, Banaganapalli B, Mujeeb M. 2018. Ursolic acid rich *Ocimum sanctum* L. leaf extract loaded nanostructured lipid carriers ameliorate adjuvant induced arthritis in rats by inhibition of COX-1, COX-2, TNF- α and IL-1: pharmacological and docking studies. PLoS One 13(3): e0193451.

- Alqahtani A, Hamid K, Kam A, Wong KH, Abdelhak Z, Razmovski-Naumovski V, Chan K, Li KM, Groundwater PW, Li GQ. 2013. The pentacyclic triterpenoids in herbal medicines and their pharmacological activities in diabetes and diabetic complications. *Curr Med Chem* 20(7): 908–931.
- Benitez de Rojas C, D'Arcy W. 1998. The genera *Cestrum* and *Sessea* (Solanaceae: Cestreae) in Venezuela. *Ann Missouri Bot Garden* 85(2): 273–351.
- Berrondo L, Teixeira F, de Oliveira D, de Sousa F. 2003. Dirhamnosyl flavonoid and other constituents from *Brillanta isiapalisatii*. *Quim Nova* 26(6): 922–923.
- Bhattacharya T, Vedantham T, Sankarasubramanian S. 1977. Components of *Cestrum nocturnum*. *Current Science* 46(7): 244. <http://www.jstor.org/stable/24081569>
- 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: 1761–1778.
- Buznego M, Cuba A, Garriga E, Cuéllar A, Pérez-Saad H. 2005. Efecto de los extractos acuoso y etanólico de *Cestrum nocturnum* L. sobre la conducta exploratoria y pruebas de analgesia. *Rev Cubana Plant Med* 10(2). Disponible en <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v10n2/pla05205.pdf>
- Chakravarti RN, Datta S, Mitra MN. 1964. Tigogenin and ursolic acid from *Cestrum diurnum* Linn. *Experientia* 20(4): 200.
- Ciangherotti C, Buitrago D, Morales A. 2004. Study of the chemical compounds of the leaves and stems of *Cestrum buxifolium* Kunth. *Rev Fac Farm (UCV)* 46: 31–33.
- Davies O, Raventos J, Walpole L. 1946. A method for the evaluation of analgesic activity using rats. *Brit J Pharmacol* 1: 255–256.
- Déciga-Campos M, Cortés A, Pellicer F, Díaz-Reval I, González-Trujano ME. 2014. Isobolographic analysis of the antinociceptive interaction between ursolic acid and diclofenac or tramadol in mice. *Planta Med* 80(2-3): 139–145.
- Deepak M, Handa SS. 2000. Anti-inflammatory activity and chemical composition of extracts of *Verbena officinalis*. *Phytother Res* 14(6): 463–465.
- Duke J. Handbook of phytochemical constituent grass, herbs and other economic plants: herbal reference library. CRC Press Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA, 2017.
- Elsbaey M, Ahmed KF, Elsebai MF, Zaghloul A, Amer MM, Lahloub MI. 2017. Cytotoxic constituents of *Alocasia macrorrhiza*. *Z Naturforsch C J Biosci* 72(1-2): 21–25.
- Ferhat M, Kabouchea Z, Fujimoto Y, Araya H. 2017. Two new triterpenes and other compounds from *Mentha aquatica* (Lamiaceae). *Nat Prod Commun* 12(4): 483–486.
- Ferrer A, Hernández M, Pérez C, Basterrechea M, Fuentes V, Ferrer M. 2007. Aislamiento de ácido ursólico de las hojas de *Cestrum laurifolium* L'Herit. *Revista CENIC Ciencias Químicas*. Centro Nacional de Investigaciones Científicas Cuba. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/1816/181621661008.pdf>
- Galarraga E, Mitaine-Offer AC, Amaro-Luis JM, Miyamoto T, Tanaka C, Pouységu L, Quideau S, Rojas LB, Lacaille-Dubois MA. 2011. Steroidal saponins from the fruits of *Cestrum ruizteranianum*. *Nat Prod Commun* 6(12): 1825–826.
- Ghante MH, Jamkhande PG. 2019. Role of pentacyclic triterpenoids in chemoprevention and anticancer treatment: an overview on targets and underlying mechanisms. *J Pharmacopuncture* 22(2): 55–67.
- Gomez-Barríos J, Ciangherotti C, Matos M, Pastorello M, Salazar-Bookaman M, Israel A. 2008. Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of *Cestrum buxifolium* Kunth. *Rev Fac Farm (UCV)* 71: 42–47.
- González-Trujano ME, Ventura-Martínez R, Chávez M, Díaz-Reval I, Pellicer F. 2012. Spasmolytic and antinociceptive activities of ursolic acid and acacetin identified in *Agastache mexicana*. *Planta Med* 78(8): 793–796.

- Gu WW, Ao GZ, Zhu YM, Sun SC, Zhou Q, Fan JH, Nobuhiko K, Ishidoh K, Zhang HL, Gao XM. 2013. Autophagy and cathepsin L are involved in the antinociceptive effect of DMBC in a mouse acetic acid-writhing model. *Acta Pharmacol Sin* 34(8): 1007–1012.
- Hatem N, Najah Z. 2016. Isolation and elucidation of some chemical constituents of *Lavandula officinalis*. *J Chem Pharmaceutical Res* 8(3): 394–401.
- Isah MB, Ibrahim MA, Mohammed A, Aliyu AB, Masola B, Coetzer TH. 2016. A systematic review of pentacyclic triterpenes and their derivatives as chemotherapeutic agents against tropical parasitic diseases. *Parasitology* 143(10): 1219–1231.
- Kawabata A. 2011. Prostaglandin E2 and pain—an update. *Biol Pharm Bull* 34(8): 1170–1173.
- Kawano M, Otsuka M, Umeyama K, Yamazaki M, Shiota T, Satake M, Okuyama E. 2009. Anti-inflammatory and analgesic components from “hierba santa,” a traditional medicine in Peru. *J Nat Med* 63(2): 147–158.
- Khare C. *Ayurvedic pharmacopoeial plant drugs: expanded therapeutics*. CRC Press Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA, 2016.
- Koster R, Anderson M, De Beer EJ. 1959. Acetic acid for analgesic screening. *Federation Proceedings* 18: 412–417.
- Liu QY, Chen YS, Wang F, Chen SW, Zhang YH. 2014. Chemical of *Vitex trifolia*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 39(11): 2024–2028.
- Liu QY, Feng S, Zhang YH, Ni F. 2016. Chemical constituents of *Scurrula parasitica*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 41(21): 3956–3961.
- Martínez AL, González-Trujano ME, Chávez M, Pellicer F. 2012. Antinociceptive effectiveness of triterpenes from rosemary in visceral nociception. *J Ethnopharmacol* 142(1): 28–34.
- Mlala S, Oyedeji AO, Gondwe M, Oyedeji OO. 2019. Ursolic acid and its derivatives as bioactive agents. *Molecules* 24(15): pii: E2751.
- Mukherjee K, Bhattacharya M, Ghosha P. 1982. Triterpene acid constituent of *Salvia lanata*. *Phytochemistry* 21(9): 2416–2417.
- Pastorello M, Ciangherotti C, Colman T, Amesty A, Israel A. 2007. Anti-inflammatory activity of *epi*-ursolic acid and phospholipase A2-docking. *Rev Fac Farm (UCV)* 70: 47–52.
- Pereda R, Delgado G, Romo A. 1986. New triterpenoids from *Salvia nicolsoniana*. *J Nat Product* 49(2): 225–230.
- Pironi LG, de Rezende FM, Ximenes VF, Dokkedal AL. 2011. Antioxidant activity and total phenols from the methanolic extract of *Miconia albicans* (Sw.) Triana leaves. *Molecules* 16(11): 9439–9450.
- Qamar K, Dar A, Siddiqui B, Kabira N, Aslam H, Ahmed S, Erum S, Habib S, Begum S. 2010. Anticancer activity of *Ocimum basilicum* and the effect of ursolic acid on the cytoskeleton of MCF-7 human breast cancer cells. *Lett Drug Design Discovery* 7: 726–736.
- Qian Z, Wang X, Song Z, Zhang H, Zhou S, Zhao J, Wang H. 2015. A phase I trial to evaluate the multiple-dose safety and antitumor activity of ursolic acid liposomes in subjects with advanced solid tumors. *Biomed Res Int* 2015: 809714.
- Ramalho SD, De Sousa LR, Nebo L, Maganhi SH, Caracelli I, Zukerman-Schpector J, Lima MI, Alves MF, Da Silva MF, Fernandes JB, Vieira PC. 2014. Triterpenoids as novel natural inhibitors of human cathepsin L. *Chem Biodivers* 11(9): 1354–1363.
- Ramírez-Rodríguez AM, González-Ortiz M, Martínez-Abundis E, Acuña Ortega N. 2017. Effect of ursolic acid on metabolic syndrome, insulin sensitivity, and inflammation. *J Med Food* 20(9): 882–886.
- Ribeiro RA, Vale ML, Thomazzi SM, Paschoalato AB, Poole S, Ferreira SH, Cunha FQ. 2000. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur J Pharmacol* 387(1): 111–118.
- Rodrigues MR, Kanazawa LK, das Neves TL, da Silva CF, Horst H, Pizzolatti MG, Santos AR, Baggio CH, Werner MF. 2012.

- Antinociceptive and anti-inflammatory potential of extract and isolated compounds from the leaves of *Salvia officinalis* in mice. *J Ethnopharmacol* 139(2): 519–526.
- Safayhi H, Sailer ER. 1997. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. *Planta Med* 63(6): 487–493.
- Seo DY, Lee SR, Heo JW, No MH, Rhee BD, Ko KS, Kwak HB, Han J. 2018. Ursolic acid in health and disease. *Korean J Physiol Pharmacol* 22(3): 235–248.
- Silva RHM, Lima NFM, Lopes AJO, Vasconcelos CC, de Mesquita JWC, de Mesquita LSS, Lima FCVM, Ribeiro MNS, Ramos RM, Cartágenes MDSS, García JBS. 2017. Antinociceptive activity of *Borreria verticillata*: *in vivo* and *in silico* studies. *Front Pharmacol* 8:283.
- Suh N, Honda T, Finlay HJ, Barchowsky A, Williams C, Benoit NE, Xie QW, Nathan C, Gribble GW, Sporn MB. 1998. Novel triterpenoids suppress inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in mouse macrophages. *Cancer Res* 58(4): 717–723.
- Tapondjou LA, Lontsi D, Sondengam BL, Choi J, Lee KT, Jung HJ, Park HJ. 2003. *In vivo* anti-nociceptive and anti-inflammatory effect of the two triterpenes, ursolic acid and 23-hydroxyursolic acid, from *Cussonia bancoensis*. *Arch Pharm Res* 26(2): 143–146.
- Taviano MF, Miceli N, Monforte MT, Tzakou O, Galati EM. 2007. Ursolic acid plays a role in *Nepeta sibthorpii* Benthams CNS depressing effects. *Phytother Res* 21(4): 382–385.
- The Plant List. 2013 (en línea). Version 1.1. Disponible en: <http://www.theplantlist.org/> (última consulta: octubre 2019).
- Verano J, González-Trujano ME, Déciga-Campos M, Ventura-Martínez R, Pellicer F. 2013. Ursolic acid from *Agastache mexicana* aerial parts produces antinociceptive activity involving TRPV1 receptors, cGMP and a serotonergic synergism. *Pharmacol Biochem Behav* 110: 255–264.
- Woldemichael GM, Franzblau SG, Zhang F, Wang Y, Timmermann BN. 2003. Inhibitory effect of sterols from *Ruprechtia triflora* and diterpenes from *Calceolaria pinnifolia* on the growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *Planta Med* 69(7): 628–631.
- Zhang J, Li Y, Chen SS, Zhang L, Wang J, Yang Y, Zhang S, Pan Y, Wang Y, Yang L. 2015. Systems pharmacology dissection of the anti-inflammatory mechanism for the medicinal herb *folium eriobotryae*. *Int J Mol Sci* 16(2): 2913–2941.
- Zhao J, Zheng H, Sui Z, Jing F, Quan X, Zhao W, Liu G. 2019. Ursolic acid exhibits anti-inflammatory effects through blocking TLR4-MyD88 pathway mediated by autophagy. *Cytokine* 123: 154726.
- Zhu Z, Qian Z, Yan Z, Zhao C, Wang H, Ying G. 2013. A phase I pharmacokinetic study of ursolic acid nanoliposomes in healthy volunteers and patients with advanced solid tumors. *Int J Nanomedicine* 8: 129–136.

Recibido: 20-10-2019
Aceptado: 04-11-2019