

Evaluación de extractos y fracciones de plantas colombianas en modelos de inflamación aguda, subcrónica y crónica

María Cristina González¹, Luis Fernando Ospina², Jairo Calle², Javier Rincón²

¹ Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Fax: 57-1-3165060. Correo electrónico: mcgonzalezgu@unal.edu.co

² Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Fax: 57-1-3165060.

Recibido para evaluación: 18 de junio de 2007

Aceptado para publicación: 24 de septiembre de 2007

RESUMEN

Se evaluó la actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones de las especies vegetales *Acnistus arborescens*, *Baccharis latifolia*, *Myrcianthes leucoxila*, *Physalis peruviana* y *Salvia rubescens* en los modelos *in vivo* de inflamación en edema tópico en oreja de ratón, edema plantar por carragenina en rata y bolsa de aire en ratón, con profundización en modelo de artritis por adyuvante en rata. Inicialmente se realizó el *screening* de un total de 34 fracciones en el modelo de edema auricular en ratón, de los cuales se seleccionaron dos de *Acnistus arborescens*, cuatro de *Baccharis latifolia*, dos de *Myrcianthes leucoxila* y dos de *Salvia rubescens*. Posteriormente se evaluó la actividad de dichas fracciones en el modelo de edema plantar por carragenina en rata seleccionando aquellos que mostraron mayor actividad para ser evaluados luego en el modelo de bolsa de aire en ratón. Después de esta evaluación se continuó con el estudio de fracciones de *S. rubescens*, provenientes del extracto hidroalcohólico, y otras de *A. arborescens*, que corresponde a la fracción de diclorometano. La última fase correspondió a la evaluación de algunas de estas fracciones en el modelo de artritis por adyuvante en ratas Wistar, que empleó el protocolo de evaluación de actividad preventiva en el desarrollo de artritis y se observó que no ejercieron dicha actividad.

Palabras clave: Actividad antiinflamatoria, *Acnistus arborescens*, *Baccharis latifolia*, *Myrcianthes leucoxila*, *Physalis peruviana*, *Salvia rubescens*, artritis por adyuvante en rata.

SUMMARY

Evaluation of acute, subchronic and chronic inflammation activity of extracts and extracts fractions of Colombian plants

Some extracts and fractions of *Acnistus arborescens*, *Baccharis latifolia*, *Myrcianthes leucoxila*, *Physalis peruviana* and *Salvia rubescens* were examined for antiinflamma-

tory activity *in vivo* models as mice ear oedema, carrageenan induced rat paw oedema, zimosan injected-rat air pouch and Freund's adjuvant arthritis. In initial screening on mice ear oedema model were selected two of *A. arborescens*, four of *B. latifolia* and *M. leucoxila* and two of *S. rubescens* among thirty four fractions which showed greater antiinflammatory activity. Later, these fractions were evaluated in carrageenan induced rat paw oedema model and those that showed greater activity have been selected to be evaluated in the zimosan injected-mice air pouch model. S2 and S7 fractions of *S. rubescens*, that came from hydroalcoholic extract, and AA-F of *A. arborescens*, that corresponded diclorometane fraction, were those that until this phase of the study showed greater antiinflammatory activity. The last phase corresponded to the evaluation of S2 and AA-F in the model Freund's adjuvant arthritis in Wistar rats using the protocol of evaluation of preventive activity in the development of arthritis showed that did not exhibit this activity.

Key words: Antiinflammatory activity, *Acnistus arborescens*, *Baccharis latifolia*, *Myrcianthes leucoxila*, *Physalis peruviana*, *Salvia rubescens*, Freund's adjuvant arthritis.

INTRODUCCIÓN

Dentro de las especies colombianas con empleo etnofarmacológico para procesos inflamatorios se encuentran *Acnistus arborescens*, "fruto gatillo", "gallinero", cuyas hojas se emplean en infusión para tratamiento de contusiones y esguinces; *Baccharis latifolia*, "chilco", con uso de hojas y resina en reumatismo, contusiones y hematomas; *Myrcianthes leucoxila*, "arrayán", con decocción de hojas y frutos para odontalgia; *Physalis peruviana*, "uchuva", con empleo de hojas y fruto en reumatismo, gota, contusiones y esguinces y *Salvia rubescens*, "salvia", ésta con poca información etnomédica (1-4). Para dichas especies se describen diferentes compuestos y actividades biológicas (5). Las relacionadas con inflamación incluyen para *A. arborescens* actividad citotóxica y antitumoral con referencia a presencia de witanólidos, entre otros (5). Para *B. latifolia* se describe actividad antioxidante e inhibidora de síntesis de proteínas; entre los compuestos descritos se encuentran diterpenos y sesquiterpenos (5). Para *P. peruviana*, actividad inhibidora del crecimiento de larvas, con compuestos entre los que se encuentran witanólidos, fisalinas, lípidos y flavonóides, entre otros (5). Para el compuesto arbutina (glucósido de hidroquinona) de *S. rubescens* se describe actividad antirradicalaria (6). Este estudio se realizó para evaluar la potencial actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones de las especies relacionadas sobre modelos *in vivo* de inflamación aguda, subcrónica y crónica.

METODOLOGÍA

Materiales y reactivos

El material vegetal correspondió a extractos y fracciones de *Acnistus arborescens* (AA), *Baccharis latifolia* (B), *Myrcianthes leucoxila* (ML), *Physalis peruviana* (PP)

y *Salvia rubescens*(S), obtenidos por los investigadores Jairo Calle Álvarez y Javier Rincón Velandia (Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia). Se emplearon ratas Wistar, machos y hembras, de entre 100 y 250 g, y ratones albinos ICR de 28 a 40 g, criados y mantenidos en el bioterio de experimentación del Departamento de Farmacia (Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia), en condiciones estándar de fotoperíodo (12 horas luz/12 horas oscuridad), temperatura ($21\pm 2^\circ\text{C}$), humedad ambiental controlada, suministro de aire filtrado, agua y comida (Rodentina®) *ad libitum*; alojados en jaulas de acero inoxidable, con lechos de cascarilla removidos dos veces por semana. Se emplearon los agentes aceite de croton (Sigma®), carragenina λ (Sigma®), zimosán (Sigma®), indometacina (Sigma®) y adyuvante de Freund (*Mycobacterium butyricum* disecado, Difco®).

EDEMA TÓPICO EN OREJA DE RATÓN

El irritante empleado fue aceite de croton (100 μg /oreja) con dos aplicaciones de 10 μL en cada superficie (interna y externa) del pabellón auricular derecho. El patrón empleado fue indometacina en dosis de 250 μg /oreja. Los extractos se aplicaron en dosis de 500 μg /oreja. El irritante, patrón, extractos y fracciones se disolvieron en acetona. La oreja izquierda, no tratada, permaneció como referencia. Al grupo control se le aplicó vehículo y aceite de croton. A las cuatro horas de aplicado el irritante se sacrificaron los animales por dislocación cervical, se obtuvo biopsia por sacabocado del centro del pabellón (diámetro aproximado 6 mm), y se determinó el peso (expresado en miligramos, mg). La actividad antiinflamatoria se expresó como porcentaje de inhibición del edema calculado así:

Delta de peso (mg) = Δ peso = (peso oreja inflamada - peso oreja no inflamada)

$$\% \text{ de inhibición del edema} = 100 - \left(\frac{\Delta \text{Peso de extracto}}{\Delta \text{Peso de control}} \right) \times 100$$

Se definió como criterio de selección un porcentaje de inhibición del edema mayor del 30%, al considerar que sustancias con dichos valores se relacionaban con actividad antiinflamatoria potencial, al considerar que ésta era una prueba de tamizaje inicial, con la que se buscaba seleccionar extractos para estudios posteriores de profundización.

EDEMA PLANTAR POR CARRAGENINA EN RATA

Con ayuno previo de 12 horas, se administraron por vía oral en dosis de 300 mg/Kg (volumen 1 mL/100g) las fracciones que mostraron mayor actividad antiinflamatoria

en la prueba de edema tópico en oreja de ratón. Se empleó indometacina como patrón en dosis de 5mg/Kg, y el grupo control recibió solución salina normal (SSN). El vehículo empleado para las fracciones de *Baccharis latifolia* (B1, B2, B3 y B4) fue PVP en forma de coprecipitado. Para las demás fracciones fue PEG:glicerina:agua (4:1:5). Para indometacina, el vehículo fue PEG:glicerina:bicarbonato al 1,5% (4:1:5). Después de 30 minutos se inyectaron 0,1 mL de carragenina λ al 3% en SSN, subcutánea en la superficie plantar de la pata posterior derecha, y fue éste el tiempo cero. Se midió el volumen de patas traseras con pletismómetro a la 1, 3 y 5 horas. Se calculó el edema como resultado de la diferencia entre el volumen de pata inyectada y no inyectada. Después de la quinta hora se sacrificaron los animales por dislocación cervical. Los resultados se expresaron como delta de volumen (mLx100) \pm desviación estándar (D.E.) y se calculó el porcentaje de inhibición del edema \pm D.E. El criterio de selección definido en este ensayo fue un porcentaje de inhibición del edema mayor o igual a 20% en las tres horas de evaluación, al considerar que dicho nivel de actividad permitía no descartar extractos con potencial actividad anti-inflamatoria.

Bolsa de aire en ratón

Se inyectaron 10 mL de aire estéril en el dorso del animal el día cero, con reinyección de 5 mL el día tres. El día seis el grupo control recibió 1 mL de zimosán al 1% en SSN; el grupo patrón recibió zimosán mezclado con indometacina (250 μ g/bolsa); los grupos "tratamiento" recibieron zimosán mezclado con las fracciones evaluadas (500 μ g/bolsa) y el grupo blanco recibió 1 mL de SSN. Después de cuatro horas se sacrificaron los animales por dislocación cervical. Se inyectó luego 1 mL de SSN realizando masaje sobre la bolsa y se recolectó el exudado para realizar recuento leucocitario como índice de migración celular. El recuento se realizó por la técnica de hemocitometría manual empleando la cámara de recuento de Neubauer con tinción previa del exudado con colorante de Wright. Los datos se expresaron como media del número de leucocitos $\times 10^6$ /mL \pm D.E.

Artritis por adyuvante en rata

Se administró adyuvante completo de Freund con *Mycobacterium butyricum* 10mg/mL en aceite mineral, aplicando un volumen de 0,1 mL mediante inyección subplantar en la pata trasera derecha. Se realizaron mediciones de peso corporal y volumen de patas traseras con pletismómetro los días 0, 2, 4, 7, 10 y 13. Las fracciones se administraron para observar propiedad preventiva en el desarrollo de la AAF, vía oral diaria desde día cero. El grupo control recibió vehículo (glicerina:PEG:agua, 10:10:80), el grupo patrón indometacina 2mg/Kg/día y grupos tratados: fracción AA-F (10 mg/Kg/día), y fracción S2 (30 mg/Kg/día). El volumen administrado fue de 1mL/100g de peso corporal.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Para el modelo de edema tópico en oreja de ratón se empleó diseño de bloques al azar, y el factor de bloqueo fue el peso del animal. El modelo de edema plantar por carragenina en rata se efectuó bajo un diseño de bloques al azar, con factor de bloqueo tiempo de lectura. Se empleó diseño completamente al azar para los modelos bolsa de aire en ratón y artritis por adyuvante en rata. Para todos los experimentos $n = 6$. Los datos fueron expresados como media \pm D.E., y la significancia estadística evaluada por Anova seguida de la prueba de Dunnett fue considerada $p < 0,05$. Para el manejo de datos, se emplearon los paquetes SAS Y SPSS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se resumen los valores para el patrón (indometacina) y control (vehículo) obtenidos en el modelo "edema tópico en oreja de ratón" para los diferentes experimentos realizados en el proceso de selección de las 34 fracciones probados de las cinco plantas en estudio y se señalan los resultados de las fracciones seleccionadas. Se puede observar que el patrón presentó una buena actividad con media de porcentajes de inhibición de $72\% \pm 12$.

Tabla 1. Resultados modelo edema tópico en oreja de ratón inducido por aceite de croton.

Extracto	Edema (Δ peso, mg)	% inh. del edema
S2	$4,2 \pm 0,8^*$	53 ± 9
S7	$4,8 \pm 1,0^*$	57 ± 9
B1	$2,0 \pm 1,7^*$	82 ± 15
B2	$2,5 \pm 1,2^*$	78 ± 11
B3	$4,0 \pm 1,3^*$	64 ± 11
B4	$4,5 \pm 1,0^*$	60 ± 9
AA-F	$3,2 \pm 1,3^*$	64 ± 15
AA-FD	$1,5 \pm 1,0^*$	83 ± 12
ML-EtOH	$3,4 \pm 0,9^*$	62 ± 10
ML-F	$3,8 \pm 1,0^*$	67 ± 8
ML-FD	$2,3 \pm 1,6^*$	82 ± 12
ML-FH	$4,2 \pm 1,3^*$	68 ± 10
Patrón	$2,6 \pm 1,3^*$	72 ± 12
Control	$11,2 \pm 1,6$	NA

Resultados expresados como media \pm desviación estándar. Irritante: aceite de croton 100 μg /oreja. Patrón: indometacina 250 μg /oreja. Control: vehículo + aceite de croton. Extractos y fracciones 500 μg /oreja. $n = 6$. Los valores del patrón y control corresponden al promedio de nueve experimentos. % inh.: porcentaje de inhibición. NA: no aplica *: Dunnet $p < 0,05$ frente al control. S: *Salvia rubescens*. B: *Baccharis latifolia*. AA: *Acnistus arborescens*. ML: *Myrcianthes leucoxila*. Para tipo de extractos, véase Resultados y discusión.

El grupo control mostró valores de edema altos (delta de volumen alto), como era lo esperado. Los extractos seleccionados obtenidos de *S. rubescens* (S) fueron S2, correspondiente a la fracción en diclorometano proveniente del liofilizado de la porción insoluble del extracto hidroalcohólico, y S7, fracción en diclorometano de la porción soluble del extracto hidroalcohólico, que presentaron porcentajes de inhibición de $53 \pm 9\%$ y $57 \pm 9\%$, respectivamente. Para *B. latifolia* (B), los extractos seleccionados fueron B1, correspondiente al extracto etanólico proveniente del material vegetal previamente extraído con diclorometano, B2, que es el extracto etanólico insoluble en agua, B3, fracción en acetato de etilo del extracto etanólico y B4, extracto etanólico soluble en isobutanol, los cuales presentaron porcentajes de inhibición del edema de $82 \pm 15\%$, $78 \pm 11\%$, $64 \pm 11\%$ y $60 \pm 9\%$ respectivamente.

El método de extracción aplicado al material vegetal de *A. arborescens* (AA) y *M. leucoxila* (ML) fue el sistema de partición de Kupchan modificado (7); de esta forma se asignó la nomenclatura correspondiente. De estas dos plantas se seleccionaron AA-F (fracción de diclorometano) y AA-FD (fracción en diclorometano obtenida de la fracción F tras extracción con hexano y diclorometano), que mostraron porcentajes de inhibición del edema de $64 \pm 15\%$ y $83 \pm 12\%$, respectivamente y ML-EtOH (extracto etanólico total), ML-F, ML-FD y ML-FH (fracción hexánica), que mostraron porcentajes de inhibición del edema de $62 \pm 10\%$, $67 \pm 8\%$, $82 \pm 12\%$ y $68 \pm 10\%$, respectivamente (Tabla 1). Los extractos de *P. peruviana* evaluados no mostraron buena actividad en estos ensayos. Estas plantas constituyen fuente importante de compuestos con posible actividad moduladora de inflamación (5, 8-11). Puesto que el irritante empleado en este modelo se relaciona con liberación de histamina, serotonina y derivados del ácido araquidónico (AA), en especial prostaglandinas, dichos extractos podrían actuar afectando fosfolipasa A_2 y ciclooxigenasa, entre otros posibles mecanismos de acción antiinflamatoria, lo que requiere mayor estudio para su confirmación (12-14).

En los ensayos del modelo "edema plantar por carragenina en rata", el patrón y el control presentaron los resultados descritos en la tabla 2, en la cual se observa que el patrón presentó un comportamiento de inhibición del edema mayor en la hora 1 que disminuyó poco en la tercera y quinta horas. Al realizar la prueba de Dunnet se observaron diferencias significativas del patrón con el grupo control ($p < 0,05$). El control a su vez mostró valores de delta de volumen crecientes a través del tiempo, como era lo esperado. Además del criterio de selección considerado en este ensayo,

se relacionó dicha actividad con los resultados del edema auricular, la disponibilidad de fracciones y los reportes en literatura. Al evaluar los extractos seleccionados previamente se evidenció nula actividad antiinflamatoria para todas las fracciones en la tercera y quinta horas. En la primera hora las fracciones S2, S7 y AA-F mostraron porcentajes de inhibición del edema de $40 \pm 14\%$, $14 \pm 11\%$ y $34 \pm 13\%$, respectivamente, que no resultaron significativos estadísticamente. Como este modelo se relaciona con activación de mastocitos, liberación de cininas, mediadores como histamina, derivados del ácido araquidónico y especies de oxígeno reactivas, dichas fracciones podrían contener moléculas con capacidad de modulación sobre dichos blancos (15-19).

Tabla 2. Resultados modelo edema plantar por carragenina en rata.

Extracto	Hora 1		Hora 3		Hora 5	
	Edema (Δ vol, mLx100)	% inh. de edema	Edema (Δ vol, mLx100)	% inh. de edema	Edema (Δ vol, mLx100)	% inh. de edema
S2	30 ± 7	40 ± 14	117 ± 3	6 ± 2	124 ± 3	3 ± 2
S7	43 ± 6	14 ± 11	91 ± 20	27 ± 17	101 ± 23	21 ± 19
AA-F	35 ± 7	34 ± 13	107 ± 2	7 ± 2	133 ± 6	4 ± 4
Patrón	$27 \pm 7^*$	45 ± 15	$62 \pm 21^*$	37 ± 20	$73 \pm 22^*$	33 ± 9
Control	51 ± 8	NA	99 ± 21	NA	107 ± 25	NA

Resultados expresados como media \pm desviación estandar. Irritante: carragenina λ al 3% 0,1 mL SC plantar pata posterior derecha. Patrón: indometacina 5 mg/Kg VO. Control: SSN. Extractos y fracciones 300 mg/Kg VO. n = 6. Los valores del patrón y control corresponden al promedio de cinco experimentos. % inh.: porcentaje de inhibición. NA: no aplica. *: Dunnet $p < 0,05$ frente al control. S: *Salvia rubescens*. AA: *Acnistus arborescens*. Para tipo de extractos, véase *Resultados y discusión*.

A pesar de no tener actividad inhibidora de edema en el modelo de edema plantar por carragenina con significancia estadística, pero teniendo en cuenta tanto resultados de los ensayos de edema tópico en oreja de ratón realizados y los reportes de la literatura, se evaluaron los extractos AA-F, S2 y S7 pues uno de los objetivos de esta serie de ensayos era realizar por primera vez en el Departamento de Farmacia un ensayo piloto para implementar modelos en animal entero de inflamación subcrónica y crónica (bolsa de aire en ratón y artritis por adyuvante de Freund). No se observó actividad inhibidora de migración celular para AA-F, S2 y S7, ni acción preventiva en el desarrollo de artritis respectivamente para las fracciones AA-F y S2.

Cabe anotar que las fracciones de *Baccharis latifolia* que mostraron en el modelo de edema auricular un alto porcentaje de inhibición no presentaron similar comportamiento en el de edema plantar por carragenina. Esto podría sugerir, entre otras

razones, posible interferencia de factores cinéticos y mayor actividad tópica dérmica, con mecanismos de acción para evaluar en el futuro.

Con este estudio se confirma la actividad antiinflamatoria sobre modelos de inflamación aguda para fracciones de *Acnistus arborescens*, *Bacharis latifolia*, *Myrcianthes leucoxila* y *Salvia rubescens*, y no se pudo comprobar efecto en los modelos de inflamación subcrónica y crónica empleados.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo en el Grupo de Investigación "Principios Bioactivos de Plantas Medicinales", dirigido por el doctor Roberto Pinzón, en el Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, y contó con el apoyo de Conciencias y la Universidad Nacional.

BIBLIOGRAFÍA

1. H. García Barriga, *Flora medicinal colombiana. Botánica médica*, Imprenta Nacional, Bogotá, 1975, tomo II, pp. 83, 303, tomo III, pp. 308, 44.
2. A. G. González, J. G. Luis, A. G. Ravelo, *Plantas iberoamericanas. Fuentes de moléculas bioactivas*, Aaieti. Tenerife, Bogotá, 1990, tomo II, pp. 27-28.
3. M. P. Gupta, (editor), *270 plantas medicinales iberoamericanas*, Convenio Andrés Bello, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, Bogotá, 1995, pp. 82.
4. J. E. Correa, H. Y. Bernal, *Especies promisorias de los países del Convenio Andrés Bello*, Secretaría Ejecutiva Permanente del Convenio Andrés Bello SECAB, Editora Guadalupe, Bogotá, 1989, tomo V, pp. 200-203, tomo XII, pp. 441-458.
5. Napralert, *Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (Cyted), Subprograma X. Química fina farmacéutica. Proyecto X-1. Búsqueda de principios bioactivos en plantas de la región*, septiembre 1º de 2001.
6. C. Peña, L. F. Ospina, J. Calle, R. Pinzón, Evaluación de la actividad scavenger frente a los radicales superóxido, peroxilo e hidroxilo por parte de algunos compuestos obtenidos de plantas medicinales colombianas, *Rev. Col. Cienc. Quim. Farm.*, **27**, 41 (1998).
7. K. Hostettmann, M. Hostettmann, A. Marston, *A Preparative Chromatography Techniques*, Springer Verlag, Berlin, 1986, pp. 2-5.

8. M. J. Abad, A. L. Bessa, B. Ballarin, O. Aragón, E. González, P. Bermejo, Anti-inflammatory activity of four Bolivian *Baccharis* species (Compositae), *J. Ethnopharm.*, **103**, 338 (2006).
9. F. Pérez-García, E. Martín, T. Adzet, S. Cañigueral, Activity of plants extracts on the respiratory burst and stress proteína síntesis, *Phytomedicine*, **8**, 31 (2001).
10. L. G. Verdi, I. M. C. Brighente, M. G. Pizzolatti, The *Baccharis* genus (Asteraceae): chemical, economic and biological aspects, *Quim. Nova*, **28**, 85 (2005).
11. M. Rodríguez, N. Vergel, L. F. Ospina, J. Calle, R. Pinzón, Evaluación de actividades enzimáticas elastasa y mieloperoxidasa como marcadores de desgranulación leucocitaria en modelos de inflamación aguda, *Rev. Col. Cienc. Quim. Farm.*, **34**, 35 (2005).
12. M. Payá, M. L. Ferrándiz, M. J. Sanz, G. Bustos, R. Blasco, J. L. Ríos, M. J. Alcaraz, Study of the antioedema activity of some seaweed and sponge extracts from the mediterranean coast in mice, *Phytother. Research*, **7**, 159 (1993).
13. L. F. Ospina, *Estudio de la actividad antiinflamatoria de una benzoquinona de origen natural: rapanona*, Tesis Doctoral, Universidad de Valencia, 2000, pp. 143.
14. L. Segura, R. Vila, M. P. Gupta, M. Espósito-Avella, T. Adzet y S. Cañigueral, Anti-inflammatory activity of *Anthurium cerrocampanense* croat in rats and mice, *J. Ethnopharm.*, **61**, 243 (1998).
15. R. M. Gené, C. Cartaña, T. Adzet, E. Marín, T. Parella, S. Cañigueral, Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: identification of its active constituents, *Planta Medica*, **62**, 232 (1996).
16. C. C. Tsai, C. C. Lin, Anti-inflammatory effects of Taiwan folk medicine "Teng-Khia-U" on carrageenan- and adjuvant-induced paw edema in rats, *J. Ethnopharm.*, **64**, 85 (1999).
17. C. J. Smith, Y. Zhang, C. M. Koboldt, J. Muhammad, B. S. Zweifel, A. Shaffer, J. J. Talley, J. L. Masferrer, K. Seibert, P. Isakson, Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 13313, (1998).
18. J. A. Emin, C. Souccar, M. S. Castro, R. O. Godinho, M. H. S. Cezari, L. Juliano, A. J. Lapa, Evidence for activation of the tissue kallikrein-kinin system in nociceptive transmission and inflammatory response of mice using a specific enzyme inhibitor, *Br. J. Pharmacol.*, **130**, 1099, (2000).
19. M. J. Just, M. C. Recio, R. M. Giner, M. J. Cuéllar, S. Máñez, A. R. Bilia, J. L. Ríos, Anti-inflammatory activity of unusual lupane saponins from *Bupleurum frutescens*, *Planta Medica*, **64**, 404, (1998).