

# Actividad antiinflamatoria del ácido 3-*epi*-ursólico y *docking* a la fosfolipasa A<sub>2</sub>

## Anti-inflammatory Activity of 3-*epi*-Ursolic Acid and Docking to PLA<sub>2</sub>

MARIELLA PASTORELLO<sup>1\*</sup>, CARLOS E. CIANGHEROTTI<sup>1</sup>, TRINA COLMAN<sup>2</sup>,  
ÁNGEL AMESTY<sup>2</sup>, DIOLIMAR BUITRAGO<sup>3</sup> Y ANITA ISRAEL<sup>1</sup>

### Resumen

El ácido ursólico es un triterpeno pentacíclico ampliamente estudiado por sus propiedades antiinflamatorias, analgésicas y anticancerígenas, siendo considerado como su principal mecanismo de acción la inhibición de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub>). Sin embargo, poco se conoce acerca de las propiedades farmacológicas de su epímero, el ácido 3-*epi*-ursólico (AeU). En este trabajo se evaluó la actividad antiinflamatoria del AeU, utilizando un modelo de edema agudo en la pata trasera de una rata, inducido por λ-carragenina tipo IV. El volumen desplazado por la pata fue medido antes, a la una y tres horas después de la inyección de la carragenina, mediante el uso de un pletismómetro digital. Adicionalmente se realizó un análisis del *docking* o acoplamiento del AeU a la FLA<sub>2</sub> y fue comparado con la interacción ligando-enzima del ácido ursólico. La administración oral de AeU inhibió el edema de la pata inducido por la carragenina comparado con el control, tanto a la primera como a la tercera hora post-carragenina, mostrando un efecto antiinflamatorio de un 49,8% y 54,4%, respectivamente ( $p < 0,05$ ). El efecto antiinflamatorio fue comparable al obtenido con el compuesto de referencia fenilbutazona (80 mg/kg, p.o.). La superposición de las estructuras de ambos epímeros obtuvo un rms de 0,0058, y al igual que el ácido ursólico, el AeU se inserta en el sitio catalítico de la enzima FLA<sub>2</sub> con igual orientación. Nuestros resultados demuestran que el AeU posee actividad antiinflamatoria y se predice que este efecto ocurre debido a la virtual inhibición de la FLA<sub>2</sub>.

**Palabras clave:** Ácido *epi*-ursólico, ácido ursólico, fosfolipasa A<sub>2</sub>, inflamación.

### Abstract

Ursolic acid is a pentacyclic triterpenoid widely studied for its antiinflammatory, analgesic and antineoplastic properties, being its major biological mechanism of action the inhibition of the phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). However, the pharmacological property of its epimer, 3-*epi*-ursolic acid, is unknown. In this study, we evaluated the antiinflammatory activity of this epimer in rats, using a carrageenan-induced edema (type IV λ-carrageenan) in hind paw model. Volume displacement of hind paw was measured before, 1 and 3 h after carrageenan injection, using a digital plethysmometer. Additionally, docking analysis of 3-*epi*-ursolic acid to PLA<sub>2</sub> was compared with the ursolic acid-enzyme complex interaction. Oral administration of 3-*epi*-ursolic acid inhibited the carrageenan-induced paw oedema at 1 and 3 hour period (49,8% and 54,4%, respectively;  $p < 0.05$ ). The anti-inflammatory effect was comparable to that of the reference drug phenylbutazone (80 mg/kg, p.o.). The structural superposition of both epimers resulted in a 0,0058 rms and also, both were able to be inserted to the catalytic site of PLA<sub>2</sub>. Our results showed an antiinflammatory activity of the epimer possibly due to a virtual inhibition of the PLA<sub>2</sub>.

**Key words:** *Epi*-ursolic acid, ursolic acid, phospholipase A<sub>2</sub>, inflammation.

<sup>1</sup> Unidad de Neuropeptidos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

<sup>2</sup> Laboratorio de Bioensayos y Productos Naturales, Laboratorio de Modelado Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

<sup>3</sup> Instituto de Investigaciones, Facultad de Farmacia, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

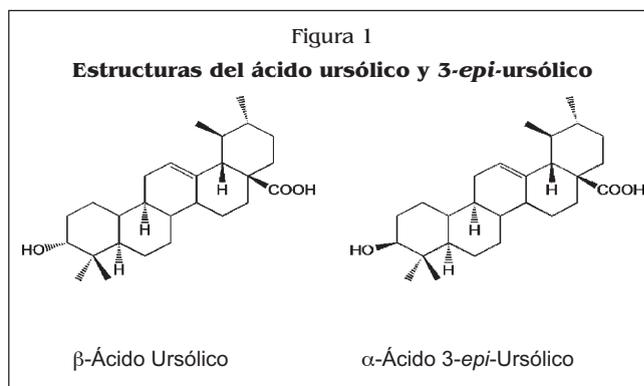
\* Correspondencia a: Mariella Pastorello, Unidad de Neuropeptidos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. e-mail: [orexcan@yahoo.com](mailto:orexcan@yahoo.com), [mariellap@hotmail.com](mailto:mariellap@hotmail.com)

## Introducción

Los triterpenos pentacíclicos constituyen una clase importante de productos naturales presentes en muchas plantas de uso medicinal, que se asemejan en su biogénesis a los esteroides en la ciclización del escualeno y sus acciones pleiotrópicas (Connolly y Hill, 2007). Un gran número de estos compuestos han sido estudiados farmacológicamente, encontrándose actividad anticancerígena y antiinflamatoria (Liu, 1995; Safayi y Sayler, 1997; Huguet y col., 2000). Las moléculas que presentan el esqueleto de lupano, oleanano y ursano son las principales responsables de la actividad antiinflamatoria de una diversidad de especies de plantas medicinales (Recio y col., 1995a; Banno y col., 2006). Asimismo, se han reportado varios de los mecanismos por medio de los cuales estos triterpenos ejercen su acción antiinflamatoria, entre los que destacan la inhibición de enzimas involucradas en la producción de eicosanoides como las ciclooxigenasas (COX<sub>1</sub> y COX<sub>2</sub>) y la fosfolipasa A<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub>); la inhibición de la liberación de citoquinas, histamina y serotonina; y la interacción con algunas serina/treonina quininas (Safayi y Sailer, 1997; Huang y col., 1998; Hasmeda y col., 1999; Zhang y col., 2005; Nataraju y col., 2007).

Las fosfolipasas A<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub>) forman una familia de enzimas claves en el recambio de los fosfolípidos de membranas y en la generación de diversas sustancias bioactivas: lisofosfolípidos, ácidos grasos libres y mediadores lipídicos de la inflamación. Existen dos grandes clases, las FLA<sub>2</sub> intracelulares o citosólicas (FLA<sub>2c</sub>), y las FLA<sub>2</sub> de secreción (FLA<sub>2s</sub>). Las formas extracelulares de las FLA<sub>2</sub> son extremadamente abundantes en las secreciones de las glándulas exocrinas como páncreas y glándulas venenosas de serpientes, abejas, escorpiones, así como en sitios inflamatorios. Tanto la isoforma secretada como la citosólica participan en procesos inflamatorios, a través de la producción de ácido araquidónico (precursor de eicosanoides pro-inflamatorios) a partir de los fosfolípidos presentes en la membrana plasmática. Por ello, la inhibición de la FLA<sub>2</sub> se ha convertido en una estrategia emergente para el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos con actividad antiinflamatoria (Yedgar y col., 2000).

Recientemente se aisló e identificó de las hojas del *Cestrum buxifolium* Kunth un compuesto de naturaleza triterpénica pentacíclica, el ácido 3-*epi*-ursólico (AeU), el cual es un epímero del carbono 3 (C-3) del ácido ursólico (figura 1) (Ciangherotti y col., 2004). Algunos triterpenos, tales como el ácido ursólico y betulínico han sido identificados como una clase de inhibidores de la FLA<sub>2</sub> (Bernard y col., 2001; Nataraju y col., 2007). Sin embargo, a diferencia de su estereoisómero, la actividad antiinflamatoria del AeU aún no ha sido reportada. No obstante, este triterpeno ha sido propuesto como supresor de la expresi



ión de la COX-2 inducida por lipopolisacáridos en macrófagos (Suh y col., 1998). Por ello, en este trabajo nos propusimos evaluar si el AeU es capaz de inhibir el desarrollo del edema agudo inducido por  $\lambda$ -carragenina inyectada en la pata trasera de una rata, como modelo experimental para determinar su posible potencial antiinflamatorio. Por otro lado, hemos realizado el estudio comparativo por modelaje molecular y análisis de *docking* o acoplamiento a la FLA<sub>2</sub>, de las propiedades electrónicas y estructurales del ácido ursólico y el AeU, para establecer la posible participación de la FLA<sub>2</sub> en el mecanismo de acción antiinflamatorio del AeU.

## Materiales y métodos

### ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

Para determinar la actividad antiinflamatoria del AeU se empleó el método de inducción del edema por inyección de carragenina en la pata de una rata (Winter, 1962; Bhatt, 1977). Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (180-220g) provenientes del Bioterio de Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (Caracas). Los animales se mantuvieron en grupos de seis, en condiciones controladas de luz y temperatura (luz desde la 6:00 hasta las 18:00), con libre acceso a alimento y agua antes del experimento. Los procedimientos aplicados en estos experimentos fueron aprobados por la Comisión de Bioterio de la Facultad de Farmacia de la UCV.

Los animales fueron divididos en tres grupos experimentales: 1. control (carboximetilcelulosa al 2%, p.o); 2. fenilbutazona (FBZ) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, 80 mg/Kg, p.o), usada como droga antiinflamatoria de referencia; y 3. AeU (80 mg/Kg, p.o). El edema fue inducido mediante la inyección de 0,1 mL de una suspensión  $\lambda$ -carragenina tipo IV al 1% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 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 AeU 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, una y tres horas después de la administración de la carragenina.

## MODELAJE MOLECULAR Y DOCKING A LA FLA<sub>2</sub>

La optimización de la geometría de los dos ácidos epímeros se realizó con el programa CAChe 6.0 (Fujitsu Limited) y los modelos tridimensionales fueron construidos con el editor; posteriormente fueron minimizados mediante mecánica molecular aplicando MM<sub>3</sub> como campo de fuerza y se realizaron cálculos de dinámica molecular a 900 °K con el fin de obtener conformaciones cercanas al mínimo. A partir de la estructura cristalina de la isoforma secretada de la enzima FLA<sub>2</sub> (código IPOE, Protein Data Bank, 2007) se determinaron las condiciones para la simulación o *docking* con el programa ArgusLab 4.0.1 (Planaria Software LLC, USA), el cual permitió realizar una exploración geométrica y la comparación de las interacciones energéticas ( $\Delta G$ : Kcal/mol) de cada ligando en el sitio activo, determinando las posiciones relativas ligando-enzima. El *docking* o acoplamiento fue llevado a cabo bajo la modalidad de enzima rígida y ligando flexible.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de la actividad antiinflamatoria fueron expresados como la media  $\pm$  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.

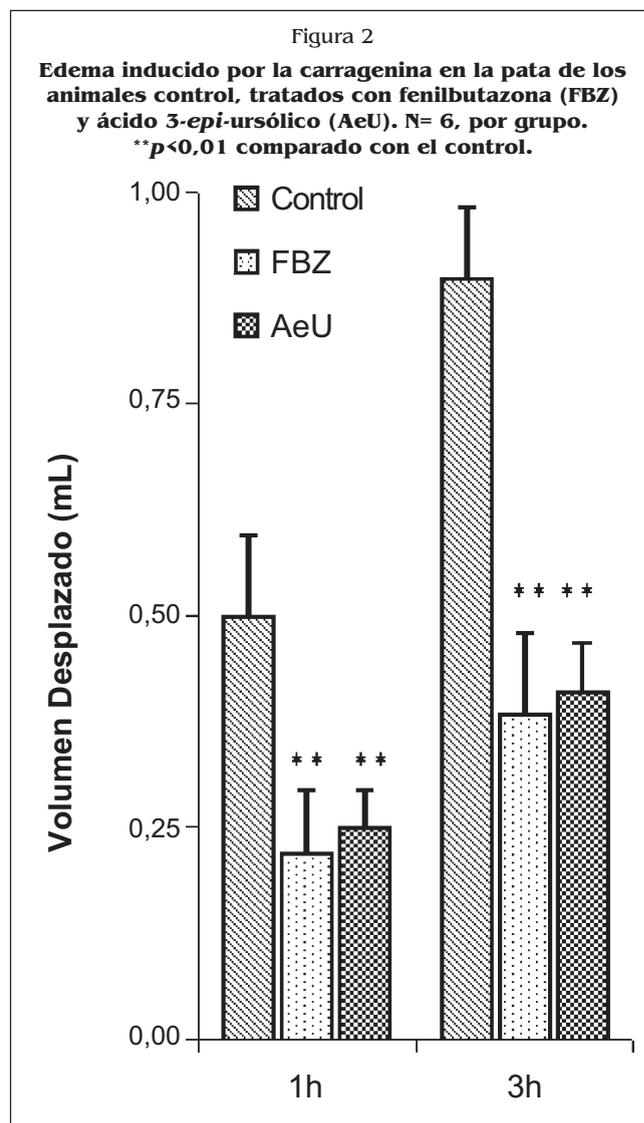
## Resultados

### 1. ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

La inyección intraplantar de la carragenina desarrolló un edema importante en la pata de la rata en el grupo control. La administración oral del ácido 3-*epi*-ursólico redujo significativamente la respuesta inflamatoria inducida por la carragenina, a la una y tres horas posteriores a la inyección (figura 2); siendo el porcentaje de inhibición de un 49,8% a la primera hora y 54,4% a la tercera hora (figura 3). Esta acción antiinflamatoria fue comparable a la producida por la droga de referencia fenilbutazona en los mismos períodos, es decir, la magnitud de la actividad antiinflamatoria de este compuesto es comparable con la de un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) típico.

### 2. MODELAJE MOLECULAR Y DOCKING A LA FLA<sub>2</sub>

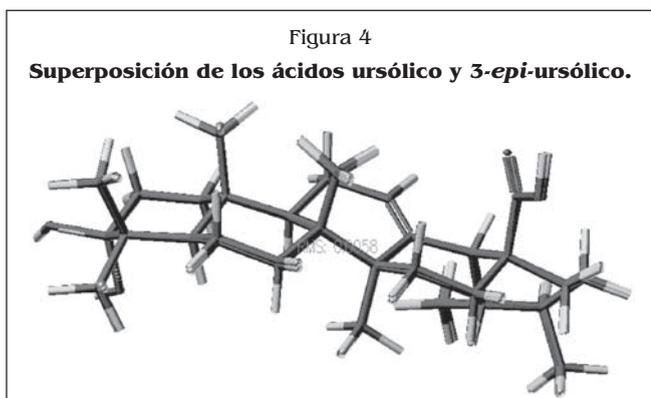
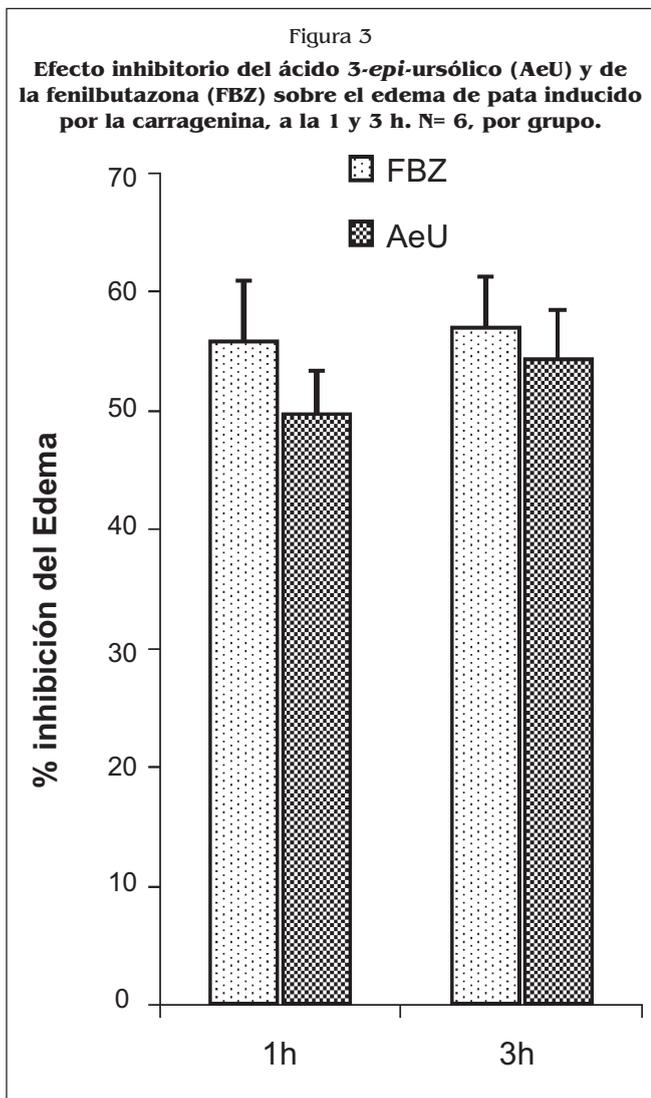
La superposición de las conformaciones más estable de los epímeros muestra una coincidencia de los esque-



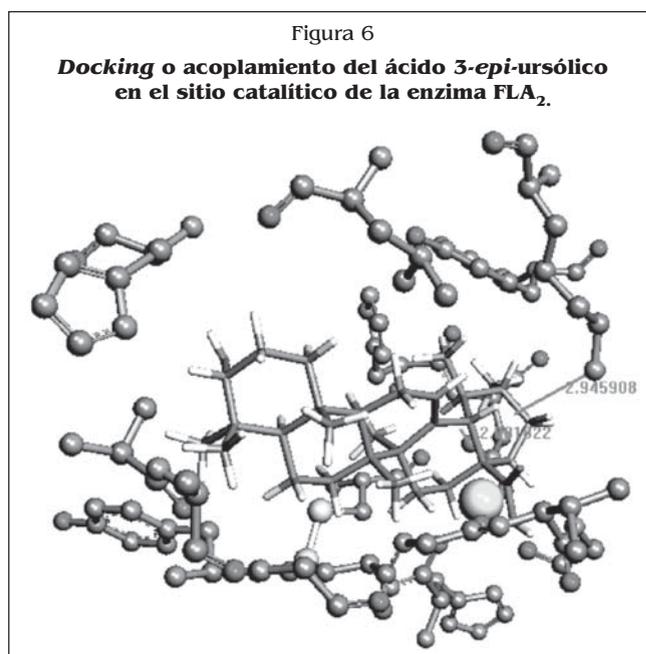
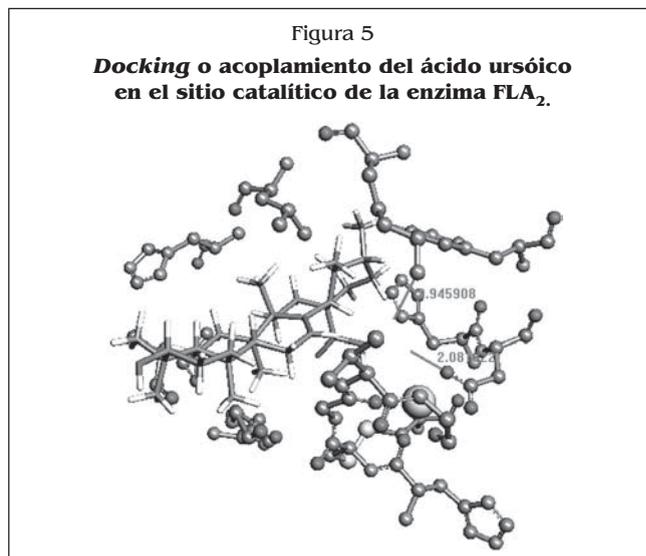
letos moleculares con un valor ideal de  $rms = 0,0058$  (figura 4). La distancia entre el átomo de oxígeno del hidroxilo y el grupo carboxílico situado en el extremo del esqueleto hidrocarbonado son muy similares entre estos dos triterpenos (datos no mostrados). El análisis *docking* del AeU al complejo, reveló la importancia del grupo carboxílico como parte del grupo farmacofórico en la orientación dentro del sitio catalítico de la enzima. El *docking* de ambos ácidos se presenta en las figuras 5 y 6, en las cuales se puede confirmar que el AeU, al igual que el ácido ursólico, se inserta en el sitio catalítico de la enzima FLA<sub>2</sub>, con energías de interacción comparables de  $13,65 \pm 0,25$  y  $13,55 \pm 0,19$  Kcal/mol, respectivamente.

## Discusión

La respuesta inflamatoria aguda resulta en una primera fase de la liberación de histamina, serotonina y citoquinas, seguida de una elevada producción de prostaglandinas, especies reactivas de oxígeno, inducción



de la ciclooxigenasa-2 e infiltración y activación local de neutrófilos. El edema de la pata inducido por la carragenina es un método ampliamente utilizado para evaluar sustancias con posible actividad antiinflamatoria, ya que por su elevado poder antigénico es capaz de disparar los mecanismos del proceso inflamatorio de forma similar a la observada en la clínica (Di Rosa y col., 1971; García y col., 1973 y Vinegar y col., 1968).



El ácido ursólico es un potente agente antiinflamatorio. Este compuesto no sólo inhibe la elastasa en los leucocitos humanos, sino además la actividad de la 5-lipoxigenasa y de la ciclooxigenasa (Safayhi y col., 1997; Najid y col., 1992). Este mismo compuesto ha demostrado ser el componente más activo en la degranulación de mastocitos y la liberación de histamina en presencia de alérgenos (Tsuruga y col., 1991). En modelos de inflamación aguda, tales como el edema de la oreja de ratón inducido por acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) o por propiolato de etilfenilo (EPP), así como en el edema de la pata de rata inducido por la carragenina, este terpeno ha exhibido actividad inhibitoria de la formación del edema (Recio y col., 1995a; Recio y col., 1995b). Similar a lo reportado previamente para su epímero, nuestros hallazgos muestran que la administración oral de AeU fue capaz de inhibir significativamente el desarrollo del

edema inducido por la carragenina, indicando que el isómero C-3- $\alpha$ -hidroxilo es activo y presenta un efecto inhibitorio comparable con la FBZ. Nuestros resultados se apoyan en lo descrito por Recio y col. (1995), quienes indican como requerimiento estructural para la actividad antiinflamatoria para los triterpenos de esqueleto ursano, la presencia de un grupo carboxílico en posición C-28 (Recio y col., 1995a), tal y como lo presentan los ácidos ursólico y *epi*-ursólico (figura 1). Asimismo, el análisis molecular comparativo entre estos isómeros, refleja una gran similitud de las estructuras moleculares y la distancia entre los grupos oxigenados (figura 4).

De los blancos moleculares y celulares del ácido ursólico propuestos hasta el presente (Yin y col., 1991; Najid y col., 1992; Ringbom y col., 1998; Nataraju y col., 2007), la enzima FLA<sub>2</sub> citosólica y la secretada han sido las de mayor importancia debido a que el complejo ligando-enzima resulta en una inhibición irreversible de la FLA<sub>2</sub> (Nataraju y col., 2007). Interesantemente, nuestros resultados del análisis del *docking* o acoplamiento del ácido *epi*-ursólico en el sitio catalítico de la enzima FLA<sub>2</sub> mostraron que el mismo es capaz de establecer una interacción en el sitio de hidrólisis enzimática, con una orientación similar y con una energía de interacción prácticamente igual al ácido ursólico (figuras 5 y 6). Este hallazgo mediante los estudios correspondientes de modelado molecular apoya la propuesta de la inhibición de la FLA<sub>2</sub> como mecanismo de acción antiinflamatorio del AeU.

La activación de las diferentes isoformas de la FLA<sub>2</sub> inducen rápidamente la producción de eicosanoides derivados del metabolismo del ácido araquidónico; éstos inducen la degranulación de células mastocíticas, liberando así histamina y serotonina, causantes del incremento de la permeabilidad vascular que participa en el desarrollo del edema (Brain, 1977; Choi, 1989; Morita, 1983). Sin embargo, este proceso no es el único signo de la inflamación, la característica central reside en la infiltración de células inmunológicas en el tejido lesionado (Larsen y col., 1983). Duque y col. (1986) demostraron que el bromuro de p-bromofenacilo, un inhibidor de la isoforma de la FLA<sub>2</sub> que está unida a la membrana de los neutrófilos, afecta la activación de estas células. Si el AeU inhibe la FLA<sub>2</sub>, no sólo estaría bloqueando la liberación de histamina y el desarrollo del edema, sino que además, suprimiría en cierta medida la respuesta inmune presente en el proceso inflamatorio.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que, al igual que el ácido ursólico, el ácido 3-*epi*-ursólico posee una potente actividad antiinflamatoria, cuyo efecto pudiera estar mediado principalmente por la inhibición de la FLA<sub>2</sub>. Será necesario realizar estudios adicionales de inhibición enzimática *in vitro* para confirmar esta hipótesis.

## Referencias bibliográficas

- BANNOA N, AKIHISA T, YASUKAWA K, TOKUDA H, TABATA K, NAKAMURA Y, NISHIMURA R, KIMURA Y Y SUZUKI T. (2006). Anti-inflammatory activities of the triterpene acids from the resin of *Boswellia carteri*. *J Ethnopharmacol.* 107:249-253.
- BERNARD P, SCIOR T, DIDIER B, HIBERT M Y BERTHON J. (2001). Ethnopharmacology and bioinformatic combination for leads discovery: application to phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors. *Phytochemistry.* 58:865-874.
- BHATT K, MEHTA R Y SHRIVASTAVA P. (1977). A simple method for recording anti-inflammatory effects on rat paw oedema. *Indian J Phy Phar.* 21:399-400.
- BRAIN S, LEWIS G Y WHITTLE B. (1977). Actions of phospholipase-A<sub>2</sub> on mast-cell histamine release and paw oedema in the rat. *Br J Pharmacol.* 59:440-441.
- CIANGHEROTTI C, BUITRAGO D Y MORALES A. (2004). Estudio de los componentes químicos de las hojas y tallos de *Cestrum buxifolium Kunth*. *Rev Fac Far.* 46:31-33.
- CHOI S, SAKAMOTO T, FUKUTOMI O, INAGAKI N, MATSUURA N, NAGAI H Y KODA A. (1989). Pharmacological study of phospholipase A<sub>2</sub>-induced histamine release from rat peritoneal mast cells. *J Pharmacobiodyn.* 12:517-522.
- CONNOLLY J Y HILL R. (2007). Triterpenoids. *Nat Prod Rep.* 24:465-86.
- DI ROSA M, GIROUD J Y WILLOUGHBY D. (1971). Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J Pathol.* 104:15-29.
- DUQUE R, FANTONE J, KRAMER C, MARASCO W Y PHAN S. (1986). Inhibition of neutrophil activation by p-bromophenacyl bromide and its effects on phospholipase A<sub>2</sub>. *Br J Pharmacol.* 88:463-472.
- GARCÍA J, HAMAMURA L, LEITE M Y ROCHA M. (1973). Pharmacological analysis of the acute inflammatory process induced in the rat's paw by local injection of carrageenin and by heating. *Br J Pharmacol.* 48: 88-96.
- HASMEDA M, KWEIFIO-OKAI G, MACRIDES T Y POLYA G. (1999). Selective inhibition of eukaryote protein kinases by anti-inflammatory triterpenoids. *Planta Med.* 65:14-18.
- HUANG F, CHAN W, MORIARTY K, ZHANG D, CHANG M, HE W, YU K Y ZILBERSTEIN A. (1998). Novel cytokine release inhibitors. Part I: Triterpenes. *Bioorg Med Chem Lett.* 8:1883-1886.
- HUGUET A, RECIO M, MARTÍNEZ S, GINER R Y RÍOS J. (2000). Effect of triterpenoids on the inflammation induced by protein kinase C activators, neuronally acting irritants and other agents. *Eur Pharmacol* 410:69-81.
- LARSEN G Y HENSON P. (1983). Mediators of inflammation. *Annu Rev Immunol.* 1:335-359.
- LIU J. (1995). Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J Ethnopharmacol.* 49:57-68.
- MORITA Y, AIDA N Y MIYAMOTO T. (1983). Role of phospholipase A<sub>2</sub> activation in histamine release from human basophils. *Allergy.* 38:413-418.
- NAJID A, SIMON A, COOK J, CHABLE H, DELAGE C, CHULIA A Y RIGAUD M. (1992). Characterization of ursolic acid as a lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitor using macrophages, platelets and differentiated HL60 leukemic cells. *FEBS Lett.* 299: 213-217.

- NATARAJU A, RAGHAVENDRA C, RAJESH R Y VISHWANATH B. (2007). Group IIA secretory PLA2 inhibition by ursolic acid: a potent anti-inflammatory molecule. *Curr Top Med Chem.* 7:801-809.
- RECIO M, GINER R, MAÑES S Y RÍOS L. (1995a.). Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural triterpenoids. *Planta Med.* 61:182-185.
- RECIO M, GINER R, MAÑES S Y RÍOS L. (1995b.). Investigations on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucomelas*. *Planta Med.* 61:9-12.
- RINGBOM T, SEGURA L, NOREEN Y, PERERA P Y BOHLIN L. (1998). Ursolic acid from *Plantago major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis. *J Nat Prod.* 61:1212-1215.
- SAFAYHI H Y SAILER E. (1997). Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. *Planta Med.* 63: 487-493.
- SAFAYHI H, RALL B, SAILER E Y AMMON H. (1997). Inhibition of boswellic acids of human leucocyte elastase. *J Pharmacol Experim Therap.* 281: 460-463.
- SUGISHITA E, AMAGAYA S Y OGIHARA Y. (1981). Anti-inflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. *J Pharmacol Dyn.* 4: 287-294.
- SUH N, HONDA T, FINLAY H, BARCHOWSKY A, WILLIAMS C, BENOIT N, XIE Q, NATHAN C, GRIBBLE G Y SPORN M. (1998). Novel triterpenoids suppress inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in Mouse Macrophages *Cancer Res* 58: 717-723.
- TAPONDJOU LA, LONTSI D, SONDEGAM BL, CHOI J, LEE KT, JUNG HJ Y 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.*26:143-436.
- TSURUGA T, CHUN YT, EBIZUKA Y Y SANKAWA U. (1991). Biologically active constituents of *Melaleuca leucadendron*: inhibitors of induced histamine release from rat mast cells. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 39:3276-3278.
- VINEGAR R, SCHREIBER W Y HUGO R. (1968). Biphasic development of carrageenin edema in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 166: 96-103.
- WINTER A, RISLEY E Y NUSS G. (1962). Carrageenin-induced Edema in Hind paw as an Assay for Anti-inflammatory Drugs. *Proc Soc Exp Biol.* 111:554-547.
- YEDGAR S, LICHTENBERG D Y SCHNITZER E. (2000). Inhibition of phospholipase A<sub>2</sub> as a therapeutic target. *Biochim Biophys Acta.* 1488:182-187.
- YING Q, RINEHART A, SIMON S Y CHERONIS J. (1991). Inhibition of human leucocyte elastase by ursolic acid. Evidence for a binding site for pentacyclic triterpenes. *Biochem J.* 277:521-526.
- ZHANG Y, DeWITT D, MURUGESAN S Y NAIR M. (2005). Cyclooxygenase-2 enzyme inhibitory triterpenoids from *Picrorhiza kurroa* sedes. *Life Sci.* 77:3222-3230.

Recibido: 28 de junio de 2007  
 Aceptado: 12 de julio de 2007