

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de sistemas biológicos Licenciatura

en Química Farmacéutica Biológica

TESINA DE SERVICIO SOCIAL

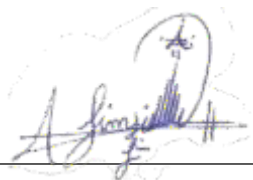
Búsqueda de compuestos con actividad antiinflamatoria de *Cascabela thevetioides*

Alumna:

Claudia Itzel Zamora López

Matrícula:

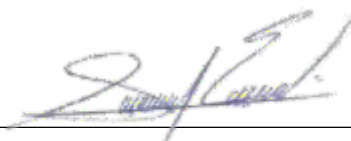
2212029351



Asesor Externo

Dra. Nimsi Campos Xolalpa

900061



Asesor Interno

Dr. Ernesto Sánchez Mendoza

35036

Fecha de inicio: 02/Diciembre/2024

Fecha de término: 02/Junio/2025

Contenido

1. Introducción	3
2. Antecedentes	4
2.1 Prevalencia de Enfermedades Inflamatorias en México	4
2.2 Inflamación.....	4
2.2.1 Proceso inflamatorio	4
2.2.2 Tipos de inflamación	5
2.2.3 Fármacos antiinflamatorios.....	6
2.2.4 Fármacos Antiinflamatorios No Esteroideos (AINEs).....	7
2.2.5 Clasificación de los AINEs	7
2.3 Compuestos farmacoterapéuticos.....	8
2.4 Medicina tradicional mexicana.....	8
2.5 <i>Cascabela thevetioides</i>	9
3. Objetivos	11
4. Justificación	12
5. Hipótesis.....	12
6. Metodología.....	13
6.1. Recolección de la planta.....	13
6.2. Obtención del extracto	13
6.3. Separación cromatográfica biodirigida del extracto activo	13
6.4. Identificación de los compuestos aislados	14
6.5. Edema auricular en ratón inducido por TPA	14
6.6. Toxicidad aguda oral	15
6.7. Ensayo de viabilidad celular.....	16
6.8. Determinación de la producción de óxido nítrico mediante la reacción de Griess	17
6.9. Estabilización de membrana de glóbulos rojos humanos (HRBC)	18
7. Resultados y discusión	20
7.1. Rendimiento de los extractos.....	20
7.2. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos	20

7.3.	Toxicidad aguda oral del extracto de diclorometano	21
7.4.	Separación biodirigida del extracto de diclorometano	22
7.5.	Actividad antiinflamatoria de las fracciones	23
7.6.	Análisis estructural del sólido obtenido de <i>C. thevetioides</i>	24
7.7.	Viabilidad celular.....	29
7.8.	Determinación de óxido nítrico	31
7.9.	Determinación de estabilización de membrana HRBC	33
8.	Conclusión	36

1. Introducción

La inflamación es una respuesta natural del sistema inmunitario que protege al organismo frente a agresiones físicas, químicas o biológicas. Cuando esta reacción se mantiene por periodos prolongados, puede volverse crónica y favorecer la aparición de enfermedades degenerativas y autoinmunes. Para controlar los procesos inflamatorios se utilizan de forma habitual fármacos antiinflamatorios, del tipo esteroideos y/o no esteroideos. No obstante, el uso continuo de estos fármacos puede provocar efectos adversos relevantes en los sistemas gastrointestinal, renal y cardiovascular. Esto ha impulsado el interés por la búsqueda de alternativas terapéuticas de origen natural que ofrezcan eficacia clínica sin representar un riesgo tóxico para el organismo.

A lo largo del tiempo, las plantas medicinales han sido una fuente clave de compuestos bioactivos. Su estudio científico ha permitido identificar metabolitos secundarios con propiedades analgésicas, antioxidantes y antiinflamatorias, que han dado origen a diversos medicamentos. En México, la gran diversidad vegetal y el conocimiento tradicional sobre sus usos terapéuticos representan un patrimonio valioso tanto para la ciencia como para la cultura.

En este marco, *Cascabela thevetioides* se emplea en la medicina tradicional para tratar problemas de la piel, molestias bucales y alteraciones circulatorias. Sin embargo, aún existen pocos estudios químicos y farmacológicos que respalden su eficacia. Por ello, este trabajo se centra en buscar, aislar e identificar los compuestos con actividad antiinflamatoria presentes en *Cascabela thevetioides*, utilizando técnicas cromatográficas y bioensayos. El propósito es generar evidencia científica sobre su potencial terapéutico y verificar su uso tradicional como una posible fuente natural de agentes antiinflamatorios.

2. Antecedentes

2.1 Prevalencia de Enfermedades Inflamatorias en México

En México, las enfermedades inflamatorias representan un desafío importante para la salud pública. Diferentes estudios nacionales y análisis de bases de datos muestran una carga sostenida y en aumento de enfermedades como la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico y la enfermedad inflamatoria intestinal (Miguel-Lavariega et al., 2023; Etchegaray-Morales et al., 2022; Ciapponi et al., 2020). Se estima además que alrededor del 1.6 % de la población padece artritis reumatoide, una enfermedad que afecta de manera significativa la calidad de vida y genera altos costos para el sistema de salud (González-Chávez et al., 2020).

2.2 Inflamación

La inflamación es una respuesta protectora del organismo, indispensable para mantener su equilibrio y asegurar la supervivencia. Se activa frente a diversas agresiones, como infecciones, lesiones físicas o químicas, y la presencia de agentes patógenos (Gómez-Sánchez et al., 2019; NCI, 2024). En el proceso inflamatorio intervienen de manera coordinada la inmunidad innata y la adaptativa, cuyo objetivo es contener y eliminar el agente dañino, además de favorecer la reparación del tejido afectado (Chahín-Parra et al., 2024). A nivel local, la inflamación se manifiesta mediante los signos clásicos: rubor, calor, dolor, edema y pérdida funcional, consecuencia del reclutamiento de leucocitos, proteínas plasmáticas y fluidos hacia la zona lesionada (Gómez-Sánchez et al., 2019).

2.2.1 Proceso inflamatorio

El proceso inflamatorio comienza con la liberación de mediadores químicos por células residentes del tejido, entre ellas los mastocitos. Estos mediadores actúan sobre los vasos sanguíneos locales, provocan vasodilatación y aumentan la permeabilidad capilar, lo que facilita la salida de líquido hacia los tejidos y favorece la formación de edema. De manera simultánea, inicia el reclutamiento de leucocitos: neutrófilos, monocitos y linfocitos son guiados hacia el sitio de la lesión mediante un proceso secuencial que incluye marginación, rodamiento, adhesión y paso a través

del endotelio. Una vez en la zona afectada, estas células eliminan al agente agresor mediante fagocitosis (Gómez-Sánchez et al., 2019). Cuando la respuesta inflamatoria avanza de forma adecuada, se activa una fase de regulación y resolución para evitar daños adicionales. Esta etapa se caracteriza por la liberación de mediadores antiinflamatorios, como la interleucina-10 (IL-10), y por el inicio de los mecanismos de reparación del tejido.

2.2.2 Tipos de inflamación

Según su evolución temporal y características fisiopatológicas, la inflamación se clasifica principalmente en dos tipos:

1. **Inflamación Aguda:** Es la respuesta inicial, de comienzo rápido (minutos u horas) y de corta duración, donde predominan los cambios vasculares y la infiltración de neutrófilos. Su objetivo principal es la eliminación rápida del agente agresor. Si es incontrolada, puede progresar a un Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS) o sepsis (Gómez-Sánchez et al., 2019).
2. **Inflamación Crónica:** Surge cuando la respuesta inflamatoria aguda no logra resolver la agresión inicial, prolongándose durante días, semanas, meses o incluso años. Este tipo de inflamación se distingue por la infiltración de células mononucleares, principalmente macrófagos y linfocitos, así como por la proliferación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) y de tejido conectivo (fibrosis), lo que provoca un daño tisular sostenido. Este estado inflamatorio persistente, a menudo de bajo grado, se encuentra estrechamente relacionado con la patogénesis de diversas enfermedades crónicas, entre ellas el cáncer, la diabetes, las afecciones cardiovasculares y las enfermedades autoinmunes (Chahín-Parra et al., 2024; NCI, 2024).

La inflamación crónica es un proceso patológico persistente que no logra eliminar por completo el estímulo dañino. Esto mantiene al sistema inmunitario en un estado de activación continua y genera un impacto sistémico que participa en el origen de numerosas enfermedades crónicas, degenerativas y autoinmunes (Furman et al.,

2019). Entre las condiciones más estrechamente relacionadas con este tipo de inflamación se encuentran la diabetes tipo 2, las enfermedades cardiovasculares, la enfermedad renal crónica y diversas afecciones autoinmunes e inflamatorias inmunomediadas (IMID), como la artritis reumatoide, la artritis psoriásica y la enfermedad inflamatoria intestinal (Qin et al., 2025; Cao et al., 2025).

La inflamación sistémica de larga duración también puede alterar el funcionamiento normal del sistema inmunológico, incrementando la susceptibilidad a infecciones. Asimismo, se ha vinculado con el desarrollo de trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer, y con algunos tipos de cáncer, en los que la persistencia del proceso inflamatorio favorece cambios celulares y su proliferación descontrolada (Abid et al., 2025; Henriksson et al., 2018).

2.2.3 Fármacos antiinflamatorios

Los fármacos antiinflamatorios funcionan regulando o bloqueando las rutas bioquímicas que desencadenan el proceso inflamatorio. Su principal objetivo es reducir la producción de mediadores inflamatorios, lo que ayuda a aliviar síntomas como dolor, enrojecimiento, calor, hinchazón y pérdida de función en los tejidos.

Estos fármacos se dividen principalmente en dos grupos: los glucocorticoides (GC) y los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) (Brune & Maier, 2019). Los glucocorticoides tienen efectos antiinflamatorios, antialérgicos e inmunosupresores y derivan del cortisol o hidrocortisona, hormona producida por la corteza suprarrenal en situaciones de estrés. Su acción se basa en inhibir la síntesis de prostaglandinas y otras proteínas fundamentales en la cascada inflamatoria (Buttgereit & Sander, 2020). No obstante, su uso prolongado puede ocasionar efectos adversos importantes, como osteoporosis, diabetes, hipertensión, alteraciones en la piel, supresión de la función suprarrenal y glaucoma, además de favorecer el desarrollo de resistencia al tratamiento (Rojas & García, 2021).

2.2.4 Fármacos Antiinflamatorios No Esteroideos (AINEs)

Los AINEs constituyen uno de los grupos farmacológicos más prescritos y utilizados a nivel mundial, gracias a su eficacia para reducir la inflamación, aliviar el dolor y controlar la fiebre, ejerciendo efectos antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos (García Rodríguez et al., 2023). Su mecanismo de acción se basa principalmente en la inhibición de las enzimas ciclooxigenasas (COX), responsables de la síntesis de prostaglandinas (PGs) y tromboxanos a partir del ácido araquidónico (García Rodríguez et al., 2023).

Existen dos isoformas principales de la enzima COX:

- COX-1 (Constitutiva): Se expresa en la mayoría de los tejidos y está involucrada en procesos fisiológicos normales, como la protección de la mucosa gástrica, la función renal y la agregación plaquetaria.
- COX-2 (Inducible): Se expresa principalmente en el foco de la inflamación y es la responsable de la síntesis de PGs que median el dolor y la inflamación.

2.2.5 Clasificación de los AINEs

La clasificación de los AINEs depende de su selectividad por las enzimas COX, lo que también determina el tipo de efectos secundarios que pueden provocar. Los AINEs clásicos o no selectivos inhiben la COX-1 y COX-2 (como ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco). La inhibición de la COX-1 aumenta el riesgo de efectos gastrointestinales y de alteraciones en la función plaquetaria (Khalil et al., 2024). Los inhibidores selectivos de la COX-2 (coxib): actúan principalmente sobre la COX-2 (como celecoxib y etoricoxib). Al preservar la actividad de la COX-1, ofrecen mayor seguridad gastrointestinal; sin embargo, en algunos pacientes pueden incrementar el riesgo cardiovascular debido a su impacto en la homeostasis vascular (Kang et al., 2020; Curtis et al., 2019).

Los AINEs son fundamentales para tratar enfermedades crónicas como la osteoartritis, ya que permiten controlar el dolor y la inflamación de manera efectiva. Aun así, su uso prolongado debe evaluarse con cautela por los riesgos asociados,

y en el caso de los AINEs clásicos es recomendable considerar el empleo de protectores gástricos (Da Costa et al., 2021).

2.3 Compuestos farmacoterapéuticos

Los compuestos farmacoterapéuticos son moléculas o agentes activos diseñados para prevenir, tratar o diagnosticar enfermedades, y constituyen uno de los pilares de la medicina moderna. El desarrollo de un fármaco es un proceso complejo y estrictamente regulado que abarca tres etapas principales: la fase de descubrimiento, donde se identifican moléculas con potencial terapéutico; la fase preclínica, centrada en estudios de toxicidad y en la evaluación de sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas; y la fase clínica, en la que se determina su eficacia y seguridad en pacientes (Zhang et al., 2025).

En años recientes, la integración de tecnologías como la inteligencia artificial y la genómica ha transformado este proceso, impulsando la medicina personalizada y permitiendo terapias más precisas, efectivas y con menos efectos secundarios (Fang et al., 2024). Además, la investigación actual explora el reposicionamiento de fármacos ya disponibles para nuevas indicaciones y el desarrollo de macrociclos peptídicos, que destacan por su mayor estabilidad y mejor permeabilidad celular frente a sus versiones lineales (Geylan et al., 2024; Liu et al., 2023). Estos avances han sido fundamentales para mejorar la esperanza y la calidad de vida de pacientes con enfermedades crónicas y patologías graves, como el cáncer.

2.4 Medicina tradicional mexicana

La medicina tradicional ha sido una fuente esencial de conocimiento para el desarrollo de nuevos fármacos. A lo largo de la historia, distintas culturas han utilizado plantas medicinales para tratar enfermedades inflamatorias, inicialmente administradas en formas como tinturas, infusiones, cataplasmas, polvos y otras preparaciones y en muchos casos, las moléculas aisladas de las plantas han servido como base para la síntesis de medicamentos modernos (Bahramsoltani et al., 2020). Se estima que existen alrededor de 5,000 especies vegetales con propiedades medicinales documentadas, muchas de ellas empleadas

tradicionalmente para atender procesos inflamatorios, lo que las convierte en un recurso valioso para la investigación farmacológica (Martínez et al., 2021).

En la actualidad, una parte de la población mundial sigue recurriendo a la medicina tradicional como una opción para la atención primaria de salud (Shao et al., 2022; Ali et al., 2021).

Las plantas producen una amplia gama de compuestos bioactivos, se ha demostrado que estos compuestos pueden poseer propiedades antimicrobianas, antiparasitarias, anticancerígenas, cicatrizantes, analgésicas, antiinflamatorias y regenerativas, entre otras. Estas características las convierten en una alternativa terapéutica prometedora en el tratamiento de diversas enfermedades (Mishra et al., 2021; López-Villarreal et al., 2022).

2.5 *Cascabela thevetioides*

La familia Apocynaceae se distribuye principalmente en regiones tropicales y subtropicales, y presenta una gran diversidad en México, sobre todo en las zonas centro y sur del país. Está conformada por 375 géneros y cerca de 5,000 especies que incluyen hierbas anuales o perennes, así como arbustos y pequeños árboles. La mayoría de estas plantas produce látex a través de estructuras especializadas conocidas como laticíferos (Martínez et al., 2021) y se tiene registro sobre su uso alimenticio (Ali et al., 2020).

Las especies de Apocynaceae suelen presentar hojas simples, ya sean persistentes o caducas, y flores que pueden ser hermafroditas o actinomorfas, con variaciones importantes en tamaño y forma. Desde el punto de vista bioquímico, destacan por su riqueza en compuestos como alcaloides, terpenoides, flavonoides y glucósidos, elementos que explican muchas de sus propiedades medicinales (Ali et al., 2020).



Reino
Plantae
 Phylum o división
Tracheophyta
 Clase
Magnoliopsida
 Orden
Gentianales
 Familia
Apocynaceae
 Género
Cascabela
 Especie
Cascabela thevetioides

Ilustración 1. Descripción
 taxonómica de *C. thevetioides*

Cascabela thevetioides es una planta endémica del centro y sur de México, se encuentra en los estados de Guanajuato, Guerrero, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro y Veracruz (Ramírez et al., 2020). Entre sus nombres comunes en español se incluyen: "Yollotl" (corazón en lengua Nahuatlí), "camé", "fraile", "codo de fraile", "hueso de fraile", "yoyote", "joyote", "calaveritas", y "narciso amarillo" (Jiménez et al., 2021). La Ilustración 1 presenta la descripción taxónima de *Cascabela thevetioides*.

Cascabela thevetioides es un arbusto perenne que puede alcanzar entre 6 y 8 metros de altura, con tallos de tonalidad grisácea y hojas de color verde oscuro y brillante, de 12 a 15 cm de largo y 1 a 2 cm de ancho. Sus flores, de un amarillo intenso, son efímeras y se agrupan en la parte terminal de las ramas con forma de embudo.

Los frutos son drupas subglobosas de aproximadamente 6 cm de largo y 4 cm de alto, que cambian de verde a marrón conforme maduran (González et al., 2019; López et al., 2022).

Tradicionalmente, *C. thevetioides* se emplea para aliviar el dolor, tratar afecciones de la piel, para ingestión, de igual forma como auxiliar para bajar de peso o como desparasitante. Estudios recientes han identificado actividad biológica relevante en sus compuestos, entre ellos glucósidos cardíacos con efectos analgésicos (Balderas-López et al., 2019).

3. **Objetivos**

3.1. **Objetivo general**

Determinar la actividad antiinflamatoria de extractos y compuestos aislados de *Cascabela thevetioides*

3.2. **Objetivos particulares**

- Obtener los extractos con disolventes de diferente polaridad
- Evaluar actividad antiinflamatoria de los extractos en modelos *in vivo*
- Realizar la separación biodirigida del extracto con mayor actividad antiinflamatoria
- Aislar los metabolitos con la actividad antiinflamatoria
- Evaluar la actividad antiinflamatoria de los metabolitos aislados en modelos *in vitro*

4. Justificación

La inflamación es una defensa vital, pero cuando se prolonga, se convierte en un riesgo severo para la salud. A nivel celular, la cronicidad implica la liberación descontrolada de citocinas y Especies Reactivas de Oxígeno (EROs). Por ello, es imperativo prevenir que la inflamación pase de ser aguda a crónica. Si bien los AINEs son el tratamiento estándar, su uso extendido causa graves efectos secundarios, estableciendo una problemática esencial: la eficacia terapéutica se obtiene a costa de efectos secundarios graves. Esta limitación impulsa la búsqueda urgente de nuevos compuestos antiinflamatorios más seguros.

Las plantas medicinales representan un valioso reservorio de química natural. Específicamente, México destaca por su megadiversidad y por albergar un rico conocimiento etnobotánico sobre el uso tradicional de su flora para aliviar la inflamación. Consecuentemente, investigar de forma sistemática estas especies mexicanas no solo permite validar el saber ancestral, sino que también ofrece una vía sostenible y prometedora para identificar fitocompuestos que sirvan como agentes antiinflamatorios más efectivos y con menos toxicidad que las opciones sintéticas actuales.

5. Hipótesis

El compuesto aislado de la especie *Cascabela thevetioides* presentará actividades farmacológicas significativas, específicamente exhibiendo un efecto antiinflamatorio y/o una acción citotóxica.

6. Metodología

6.1. Recolección de la planta

Cascabela thevetioides fue recolectada en septiembre de 2022 en el municipio de Huitzilac, Morelos. El M. en C. Gabriel Flores del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIByC) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) identificó la planta y un espécimen se depositó en el herbario de esta universidad bajo el código HUMO 31929.

6.2. Obtención del extracto

El material vegetal se secó a la sombra a temperatura ambiente y después se molió. Posteriormente, se pesaron 30 gramos de la planta seca y molida y los extractos se obtuvieron por maceración con 250 mL de diclorometano (Dic) o metanol (Met) durante 7 días. Posteriormente los extractos se filtraron y los disolventes se eliminaron en un evaporador rotatorio a presión reducida. En seguida el disolvente remanente se eliminó a baño maría y después en una estufa de vacío durante 24 horas. Se calculó el rendimiento de cada extracto con respecto al peso de la planta seca con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Peso del extracto (g)}}{\text{Peso de la planta seca (g)}} \times 100 \dots\dots\dots \text{Fórmula 1:}$$

6.3. Separación cromatográfica biodirigida del extracto activo

La actividad antiinflamatoria de los extractos, fracciones y compuestos activos se evaluó en el modelo de edema auricular inducido con 13-Acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA). Las fracciones activas fueron purificadas para la obtención e identificación de los metabolitos activos. Para la separación cromatográfica del extracto activo se usó una columna de vidrio empacada con sílice gel (Macherey-Nagel 60, MERCK) malla 0.063-0.2 mm, como fase estacionaria y como fase móvil se utilizó una mezcla de disolventes de hexano- acetato de etilo. La polaridad se incrementó gradualmente con 5 % de acetato de etilo. Las

fracciones colectadas fueron de 150 mL. Se realizó una cromatografía en capa fina de cada fracción para unir las fracciones que presentaron el mismo patrón.

6.4. Identificación de los compuestos aislados

El análisis de los compuestos aislados se llevó a cabo en dos etapas: primero se procedió a determinar el punto de fusión del compuesto puro obtenido. Luego, la elucidación estructural detallada se realizó mediante la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Se obtuvieron espectros de RMN de ^{13}C y ^1H , junto con experimentos bidimensionales para identificar las conexiones entre los átomos de la molécula. Los análisis se llevaron a cabo en un equipo de Resonancia Magnética Nuclear modelo Agilent DD2 600 (600 MHz a 299 K), utilizando DMSO-*d*6 como disolvente.

Los datos espectrales se procesaron con el software MestReNova y realizó la asignación precisa de las señales de los desplazamientos químicos de la estructura molecular.

6.5. Edema auricular en ratón inducido por TPA

Se utilizaron ratones machos (*Mus musculus*, cepa CD-1) con un peso aproximado de 25-30 g. Los ratones se mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad 12 h/12 h, con alimento y agua *ad libitum*. Los animales fueron proporcionados por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

Los ratones se dividieron al azar en cuatro grupos de ocho ratones cada uno. Los grupos asignados fueron: Control positivo el cual se trató con 2 mg/oreja de indometacina disuelto en 20 μL de acetona; Control negativo el cual fue tratado con 20 μL de acetona/ oreja; Control prueba Dic tratado con 2 mg/oreja de ratón de extracto de diclorometano disuelto en 20 μL de diclorometano y Control prueba Met tratado con 2 mg/oreja de ratón de extracto de metanol disuelto en 20 μL de metanol. A todos los ratones se les indujo la inflamación con 13-Acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) (1 μg /oreja) disuelto en 20 μL de acetona, del cual se aplicó 10 μL vía tópica en la superficie externa e interna de la oreja derecha del

animal, transcurridos 30 minutos se aplicó el tratamiento al grupo positivo y al grupo prueba.

Los ratones fueron sacrificados 6 horas después de la aplicación del agente inflamatorio, posteriormente se realizó la perforación de ambas orejas de cada ratón en círculos de 6 mm de diámetro y se registró el peso del tejido auricular para calcular el porcentaje de inhibición de la inflamación a partir de la siguiente fórmula (De Young et al., 1989):

$$\% \text{ inhibición: } \frac{(Ct-Co)_{\text{control}} - (Ct-Co)_{\text{tratado}}}{(Ct-Co)_{\text{control}}} \times 100 \dots\dots\dots \text{Fórmula 2:}$$

Dónde:

Ct = peso de la circunferencia de la oreja tratada.

Co = peso de la circunferencia de la oreja sin tratamiento.

Control = control negativo.

Tratado = grupo tratado con indometacina o con extracto.

6.6. Toxicidad aguda oral

El extracto disuelto en diclorometano se preparó en cuatro dosis distintas (5000, 2500, 1250, 625 mg/Kg), cada una mezclada con polivinilpirrolidona (PVP) en proporción 1:3. La mezcla se sónico y posteriormente se evaporó el disolvente en un rotavapor. El material resultante se secó en una estufa de vacío durante 24 h. Después las muestras fueron disueltas en solución salina para su administración. Se formaron grupos de cinco ratones a los que se les administró el tratamiento a las diferentes dosis por vía oral, utilizando una cánula intragástrica para suministrar un volumen de 100 µL por individuo.

Los ratones se mantuvieron en observación cada 24 horas durante un período de 72 h, transcurrido este tiempo, los animales fueron sacrificados para realizar una observación macroscópica detallada de órganos: intestino grueso y delgado, estómago, bazo, riñones, hígado, vejiga y páncreas con la finalidad de observar posibles signos de toxicidad (FDA, 2007).

6.7. Ensayo de viabilidad celular

Se emplearon las líneas celulares de macrófagos J774A.1, así como las líneas celulares de cáncer HCT-15 (ATCC, CCL-225) y MCF-7 (ATCC, HTB-22), cultivadas en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (SFB), 100 u/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. Posteriormente, en placas de 96 pozos fueron sembradas aproximadamente 5,000 células/pozo. Las células se incubaron durante 24 h, posteriormente se adicionó el compuesto obtenido a las concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.125 µg/mL. El periodo de incubación fue de 24 horas para los macrófagos J774A.1 y 48 horas para las células HCT-15 (cáncer de colon) y MCF-7 (cáncer de mama), terminado el tiempo de incubación a cada pozo se le adicionó 10 µL de una solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a una concentración de 5 mg/mL.

Las placas se incubaron durante 2 horas a 37 °C, para permitir la formación de los cristales de formazán. Terminado el tiempo el medio se deshecho y los cristales de formazán producidos se disolvieron con 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Finalmente, en un lector de placas tipo ELISA se midió la absorbancia a 540 nm de cada pozo, para calcular el porcentaje de viabilidad celular a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{DO \text{ células tratadas}}{DO \text{ células control}} \times 100 \dots\dots\dots \text{Fórmula 3:}$$

Se utilizó la regresión lineal para calcular la CI₅₀, (concentración del compuesto de prueba que inhibe el 50 % del crecimiento celular), a partir de las absorbancias experimentales (Lyles et al., 2008).

6.8. Determinación de la producción de óxido nítrico mediante la reacción de Griess

Los macrófagos J774A.1 fueron sembrados en placas de 6 pozos a una concentración aproximada de 5×10^5 células/pozo y se incubaron durante 24h. Se formaron los grupos de tres pozos:

- 1) Grupo Negativo: células tratadas con vehículo
- 2) Grupo Positivo: células tratadas con fármaco de referencia, dexametasona (15 $\mu\text{g/mL}$)
- 3) Grupo de Prueba: células tratadas con el compuesto de prueba a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$
- 4) Grupo Basal: Células sin tratamiento

Para elaborar la curva estándar,

El compuesto de prueba se preparó con PVP en relación 1:3 y se disolvió con metanol, se evaporó el disolvente a presión reducida en un evaporador rotatorio y se dejó secar en una estufa de vacío durante 24 h. Después, el preparado se resuspendió en PBS para aplicar una alícuota de 50 μL de la muestra en los pozos correspondientes al tratamiento para una concentración final de 50 $\mu\text{g/mL}$ por pozo, y para del grupo de dexametasona se aplicó una concentración de 15 $\mu\text{g/mL}$. Las placas se incubaron a 37 °C durante 2h. Posteriormente se adicionaron alícuotas de 50 μL de lipopolisacárido (LPS) a una concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$, para estimular a los macrófagos y se incubaron por 24h.

Al término de ese periodo, se tomaron 100 μL del sobrenadante en placas de 96 pozos y se añadió 100 μL del reactivo de Griess; tras 30 min de incubación a 37 °C, se midió la absorbancia a 540 nm para determinar la concentración de NO y posteriormente el porcentaje de producción de NO mediante la siguiente fórmula (Zhang et al., 2019):

$$\% \text{ de NO} = \frac{[NO_2^-]_{\text{muestra}}}{[NO_2^-]_{\text{control}}} \times 100 \dots\dots\dots \text{Fórmula 4:}$$

Se realizó una curva estándar de nitrito de sodio (NaNO_2) a una concentración inicial de 5000 $\mu\text{g/mL}$. A partir de esta solución se realizaron diluciones seriadas utilizando medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). Se prepararon concentraciones finales de 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.1562, 0.0781 y 0.039 $\mu\text{g/mL}$, de las cuales se colocaron 100 μL por pozo en una placa de 96 pozos junto con el sobrenadante de la muestra experimental, por triplicado. Posteriormente, se añadieron 100 μL del reactivo de Griess a cada pozo, se incubó la placa durante 30 minutos; transcurrido el tiempo de incubación, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm.

Con los valores obtenidos de absorbancia se realizó una regresión lineal y se obtuvo la ecuación de la recta ($y = mx + b$), la cual permitió interpolar las concentraciones de nitrito presentes en las muestras de cada grupo.

6.9. Estabilización de membrana de glóbulos rojos humanos (HRBC)

La actividad de estabilización de la membrana eritrocitaria se evaluó utilizando una solución hipotónica y la exposición al calor como agentes hemolíticos. Para ello, se emplearon aproximadamente 5 mL de sangre humana, a los cuales se añadió un volumen equivalente de buffer de citratos. La mezcla se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el procedimiento se repitió. Posteriormente, se obtuvo el paquete globular (HRBC), con el cual se preparó una suspensión al 5% que fue refrigerada durante 24 horas.

Se prepararon 3 grupos: (1) control positivo (12.5% diclofenaco, 25% solución salina y 12.5% solución de HRBC), (2) control negativo (87.5% solución salina y 12.5% HRBC) y (3) grupo prueba (12.5% compuesto prueba, 25% solución salina y 12.5% solución de HRBC). Una vez que los tubos tenían sus respectivas soluciones, se llevaron a incubar durante 20 min a 37 °C.

Transcurrido el tiempo de incubación, se agregó 50% solución hipotónica al 0.036%, se agitó por un minuto y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos. Al finalizar se colocaron los tubos inmediatamente en un recipiente con hielo, finalmente, se

transfirieron 100 µL del sobrenadante de cada muestra a una placa de 96 pozos para medir la absorbancia a 540 nm. Se determinó el porcentaje de hemólisis y el porcentaje de estabilización de membrana mediante las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ de hemólisis} = (Ht - Hn) \times 100 \dots\dots\dots \text{Fórmula 5:}$$

Dónde:

Ht = control positivo o grupo prueba

Hn = control negativo

$$\% \text{ de estabilización} = (100 - \% \text{ de hemólisis}) \dots\dots\dots \text{Fórmula 6:}$$

7. Resultados y discusión

7.1. Rendimiento de los extractos

Los porcentajes de rendimiento de los extractos de diclorometano y metanólico de *C. thevetioides* fueron: 8.2 %, y 3.9 % respectivamente.

7.2. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos

El extracto de diclorometano de *C. thevetioides* mostró una inhibición del edema auricular en ratones del 68.31 %, mientras que el extracto metanólico alcanzó una inhibición del 56.65 %. Por su parte, la indometacina inhibió el edema auricular al 88.13 %.

El tratamiento con indometacina y de ambos extractos (metanólico y de diclorometano) mostraron una disminución del edema auricular comparado con el grupo negativo. Sin embargo, se registró una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.028$) entre los extractos evaluados y la indometacina, siendo esta la de mayor eficacia.

Entre ambos extractos se observaron diferencias significativas, sin embargo, se continuó el estudio con el extracto de diclorometano debido a su mayor actividad biológica y su mejor rendimiento (tabla 1).

Tabla 1. Actividad antiinflamatoria de los extractos metanólico y de diclorometano de *C. thevetioides* en edema auricular en ratón inducido por TPA.

Grupo	Diferencia de pesos (mg)	Porcentaje de inhibición (%)
Negativo	$6.13 \pm 0.45^*$	----
Indometacina	$0.73 \pm 0.15^{\wedge}$	88.13 ± 2.84
Extracto metanol	$2.65 \pm 0.57^{*\wedge}$	$56.65 \pm 2.34^*$
Extracto diclorometano	$1.94 \pm 0.66^{*\wedge}$	$68.31 \pm 1.52^*$

Datos expresados como media $\pm$ EE considerando una $n=8$. $^*p \leq 0.05$ con respecto a indometacina, $^{\wedge}p \leq 0.05$ respecto al control negativo.

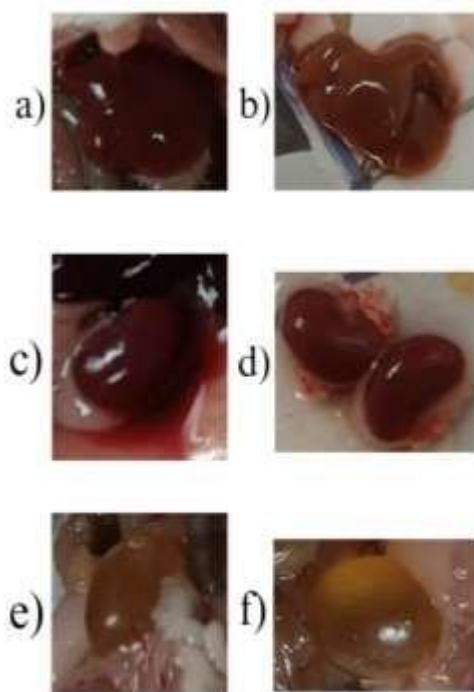


Ilustración 2. Comparación de órganos sanos y con daño después de la administración del extracto

a, c y e; órganos completamente sanos. b, d; Hígado y riñón con cambios de coloración. f; vejiga con distensión vesical.

7.3. Toxicidad aguda oral del extracto de diclorometano

Con las distintas dosis administradas del extracto diclorometano de *C. thevetioides* ningún animal murió, además no se observaron cambios físicos ni conductuales. Este comportamiento coincide con lo reportado en estudios sobre *C. thevetia*, en los cuales dosis subletales no producen efectos agudos evidentes en comportamiento o supervivencia (Thomas et al., 2022).

A las dosis de 5000 y 2500 mg/Kg del extracto no presentaron ningún tipo de daño, los intestinos grueso y delgado, páncreas, bazo y estómago, sin embargo, la vejiga presentó distensión vesical, provocando retención de líquidos del ratón. Otros órganos dañados fueron el hígado y riñones, como se muestra en el inciso b y d la coloración del tejido presentó cambios. (Ilustración 2).

El daño observado en el hígado y los riñones se debe a que son los órganos principales que se encargan de la eliminación de las toxinas de *C. thevetioides*. La planta contiene glucósidos cardiotónicos que obligan al hígado a trabajar excesivamente para metabolizarlos, esto provoca daño celular; a su vez, los riñones deben filtrar y eliminar las toxinas que existan en la sangre esto se manifiesta con el cambio de coloración (Orson, 2018).

La retención de líquidos en vejiga sugiere una posible alteración en los mecanismos de excreción o en la regulación osmótica a nivel renal, manifestación que se ha reportado también en intoxicaciones experimentales con extractos de *Thevetia peruviana* (Karthik et al., 2020).

Estos efectos indican que los compuestos presentes en *C. thevetioides* afectan principalmente la función hepática y renal; la similitud de estos hallazgos con los reportados en intoxicaciones por *Thevetia peruviana* sugiere un mecanismo toxico común, dicha evaluación se realizó con la finalidad de identificar los efectos inmediatos tras la exposición, establecer el daño orgánico inicial y aportar información importante para la caracterización del riesgo toxicológico de la planta.

7.4. Separación biodirigida del extracto de diclorometano

Catorce fracciones fueron obtenidas de la separación cromatográfica del extracto de diclorometano y mediante cromatografía de capa fina, las 14 fracciones se redujeron a 4 fracciones totales como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Fracciones obtenidas del extracto de diclorometano agrupadas según su patrón cromatográfico.

Fracción	Proporción Hexano: Acetato de etilo	Fracciones finales
I	85:15	1
II	85:15	
III	85:15	
IV	85:15	
V	80:20	
VI	80:20	2
VII	75:25	
VIII	75:25	
IX	70:30	
X	60:40	3

XI	50:50	4
XII	50:50	
XIII	50:50	
XIV	100% AcEt	

7.5. Actividad antiinflamatoria de las fracciones

Se evaluó la actividad antiinflamatoria de las fracciones 2 y 4 resultantes de la separación biodirigida del extracto de diclorometano de *C. thevetioides*. Las fracciones 1 y 3 se descartaron debido a que su rendimiento no fue suficiente para evaluar la actividad antiinflamatoria. Los porcentajes de inhibición de la inflamación de las fracciones 2 y 4 se muestran en la tabla 3. Los resultados se analizaron mediante un Análisis de Varianza (ANOVA).

Tabla 3. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de fracciones 2 y 4 de *C. thevetioides* en edema auricular en ratón inducido por TPA.

Grupo	Diferencia de peso (mg)	Porcentaje de inhibición (%)
Negativo	6.61 ± 0.52*	----
Indometacina	1.18 ± 0.20 [^]	82.16 ± 3.09
Fracción F 2	3.53 ± 0.67* [^]	46.69 ± 4.85*
Fracción F 4	3.25 ± 0.73* [^]	50.85 ± 3.24*

Datos expresados como media ± EE considerando una n=8. *p≤0.05 con respecto a indometacina, [^]p≤0.05 respecto al control negativo.

La Fracción 4 (50:50 Hexano: Acetato de etilo) mostró la mayor inhibición del edema auricular. A partir de esta fracción se aisló un compuesto sólido con actividad antiinflamatoria, el cual fue sometido a análisis por espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para determinar su estructura.

7.6. Análisis estructural del sólido obtenido de *C. thevetioides*

El sólido de tonalidad amarillo precipitado de la fracción 4 fue lavado con diclorometano hasta eliminar el color, posteriormente, se eliminó el residuo de diclorometano y se determinó su punto de fusión el cual fue de 258-260 °C.

Para el análisis estructural del sólido se obtuvieron los espectros de RMN ^1H , ^{13}C y bidimensionales.

El espectro de RMN de ^{13}C (Ilustración 3) muestra la presencia de al menos 34 carbonos diferentes según su desplazamiento químico.

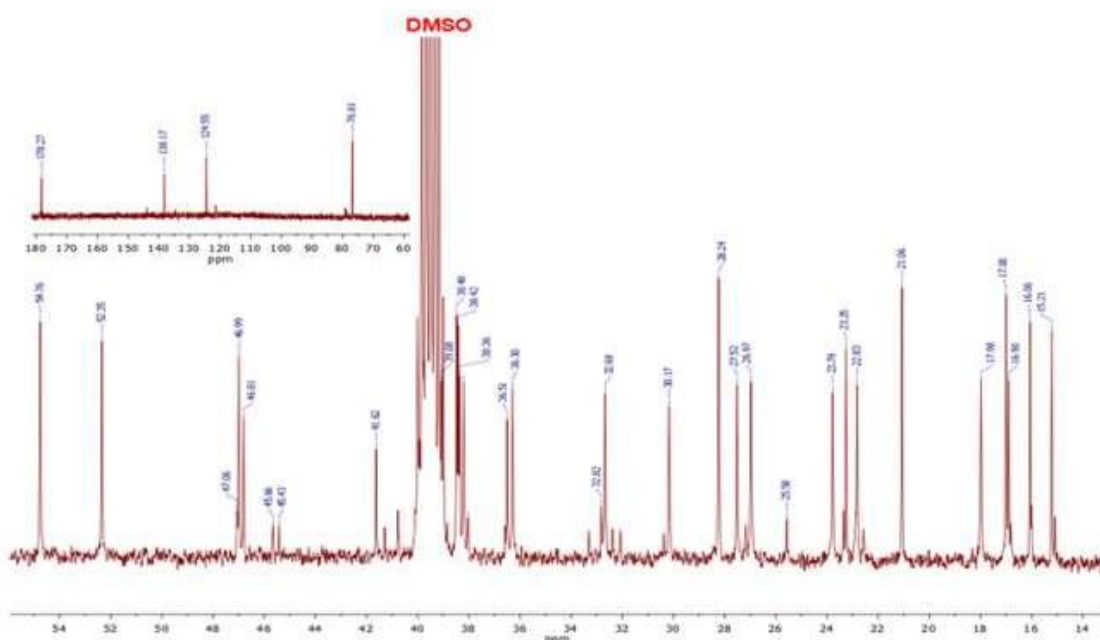


Ilustración 3. Espectro de RMN de ^{13}C

Carbono de ácido (178.28ppm); Carbonos pertenecientes a alquenos (115-160 ppm); Carbono base de oxígeno (76.79 ppm); Carbonos alifáticos (35-15 ppm).

El espectro de RMN de ^1H (Ilustración 4) confirma la presencia de los grupos observados en el espectro de ^{13}C . Se puede observar señales características de grupos carboxílicos (11.96 ppm), dobles enlaces (5.13 y 5.16 ppm), grupo hidroxilo (4.30 ppm) y una vasta región de protones alifáticos (0.7-2.1 ppm). Este conjunto de señales coincide con el patrón esperado para triterpenos.

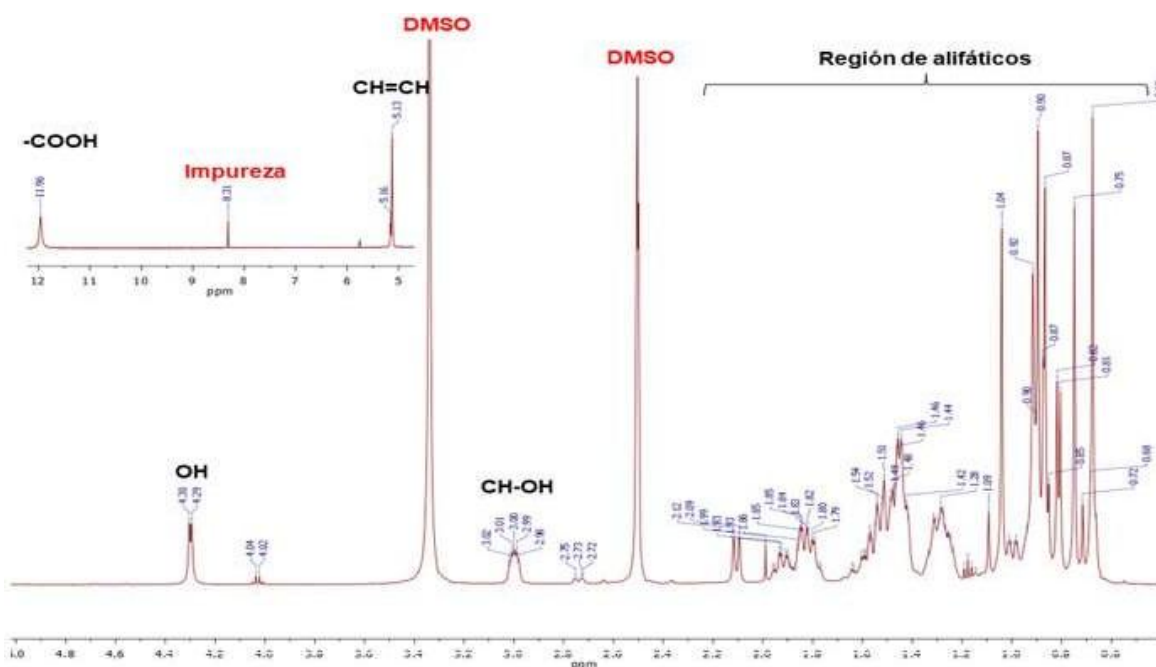


Ilustración 4. Espectro de RMN de ^1H

H perteneciente a $-\text{COOH}$ (11.96 ppm); H de $\text{CH}=\text{CH}$ (5.13 y 5.16 ppm); OH (4.30 ppm); H perteneciente a $\text{CH}-\text{OH}$ (3.00 ppm); H alifáticos unidos a alifáticos (CH , CH_2 y CH_3) (0.7-2.1 ppm).

Con base en los datos obtenidos, la estructura del sólido corresponde a un triterpeno o a una mezcla de estos. Para confirmar la identidad de la mezcla, se compararon las señales de los espectros de ^1H y ^{13}C de la muestra con las señales de una mezcla de dos triterpenos ampliamente reportados en la planta: ácido ursólico y ácido oleanólico. Además, las señales también se contrastaron con las de un estándar puro de ácido ursólico (Ilustraciones 5 y 6).

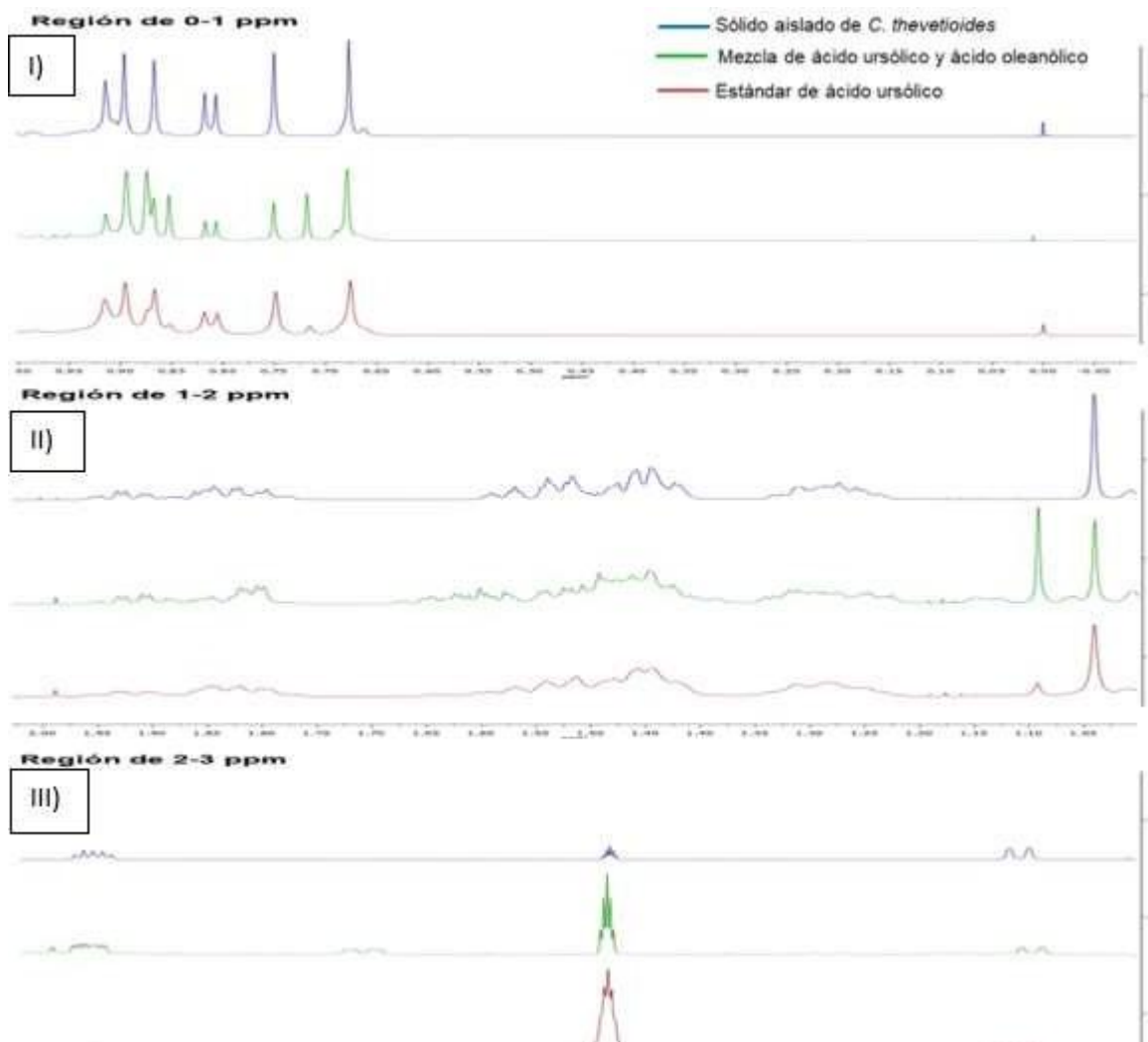


Ilustración 5. Comparación de los espectros de ^1H del sólido obtenido, mezcla (AcUr-AcOl) y estándar puro de AcUr

Sólido aislado (azul), mezcla AcUr-AcOl (verde) y estándar de AcUr (rojo). Señales presentadas por regiones y apiladas donde: I) región de 0-1 ppm, II) 1-2 ppm y III) 2-3 ppm.

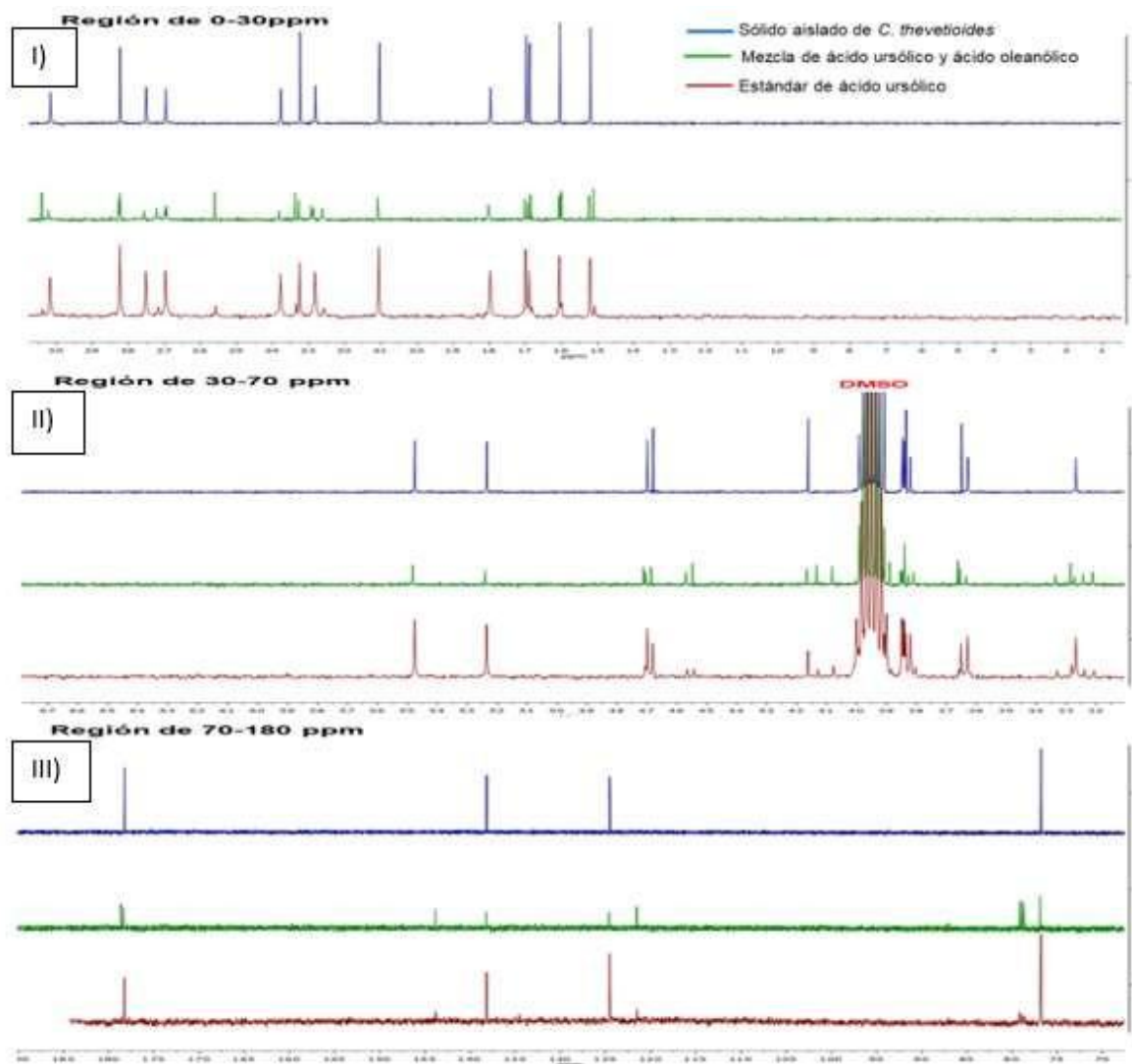


Ilustración 6. Comparación de los espectros de ¹³C del sólido obtenido, mezcla (AcUr-AcOl) y estándar puro de AcUr

Sólido aislado (azul), mezcla AcUr-AcOl (verde) y estándar de AcUr (rojo). Señales presentadas por regiones y apilados donde: I) región de 0-30 ppm, II) 30-70 ppm y III) 70-180 ppm.

El análisis de los espectros indica que el sólido aislado de *C. thevetioides* mostró señales idénticas a las registradas tanto en la mezcla de ácido ursólico (AcUr) y ácido oleanólico (AcOl) como en el estándar puro de AcUr, lo que confirmó que dicho sólido corresponde a una mezcla de ambos triterpenos.

La proporción entre AcUr y AcOI se determinó mediante la comparación de las señales vinílicas ubicadas en 5.13 y 5.16 ppm, asociadas a los protones de los alquenos presentes en sus estructuras. La intensidad relativa de dichas señales indicó una relación aproximada de 80:20%.

De este modo, el sólido obtenido de la fracción 4 del extracto de diclorometano de *C. thevetioides*, es una mezcla de ácido ursólico y ácido oleanólico, fue denominada mezcla UrsOle.

AcOI y AcUr son isómeros estructurales pertenecientes al grupo de los triterpenos pentacíclicos, que difieren en la posición de un grupo metilo en su estructura química. Ambos compuestos están distribuidos en el reino vegetal, donde pueden presentarse de forma libre o como agliconas de saponinas triterpénicas, participando en funciones relacionadas con la defensa de las plantas frente a factores ambientales y patógenos (MDPI Enciclopedia, 2024; Wang et al., 2022).

Se ha comprobado su presencia en diferentes géneros, como *Ziziphora* y *Oleaceae*, donde se han cuantificado con técnicas cromatográficas (Tian et al., 2010; Wang et al., 2019).

Las propiedades farmacológicas del AcUr y del AcOI han sido ampliamente reportadas por diversos autores (Wang et al., 2022). El AcUr ejerce su efecto principalmente mediante la inhibición de la vía NF- κ B, lo que reduce la expresión de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6, así como de enzimas inducibles involucradas en la inflamación, adicionalmente, modula rutas de señalización como MAPK y STAT3 y presenta actividad antioxidante, contribuyendo a la atenuación del daño tisular asociado a procesos inflamatorios (Checker et al., 2012; Zhao et al., 2023). De forma similar, el AcOI inhibe la activación de NF- κ B y MAPK, disminuye



Ilustración 7. Señales pertenecientes a alqueno en RMN de ^1H

la producción de mediadores inflamatorios y la expresión de moléculas de adhesión endotelial, lo que se traduce en una reducción del edema y de la infiltración celular en modelos de inflamación aguda y crónica; además, se ha demostrado que suprime la señalización mediada por HMGB1, un mediador clave en la inflamación sostenida (Yang et al., 2012; Zhang et al., 2021). No obstante, aunque ambos triterpenos se han identificado en varias especies del género *Cascabela*, no existen reportes previos sobre su presencia en la especie *Cascabela thevetioides*, lo que resalta la importancia de los hallazgos recientes que describen su aislamiento a partir del extracto de diclorometano de esta planta.

Una vez realizada la identificación estructural, se evaluó la viabilidad celular, la producción de óxido nítrico y la estabilidad de la membrana HRBC, a fin de vincular la estructura química de los compuestos con su actividad biológica.

7.7. Viabilidad celular

En la tabla 4 se muestra la concentración inhibitoria media (CI_{50}) de **UrsOle**, obtenida del ensayo de MTT, para determinar la actividad citotóxica de UrsOle en tres líneas celulares tumorales.

Tabla 4. CI_{50} de UrsOle en líneas celulares tumorales.

Línea Celular	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
J744A.1	>200
MCF-7	19.84 ± 0.28
HCT-15	39.69 ± 0.37

Los datos se expresaron como media $\pm$ EE.

La actividad citotóxica de compuestos o extractos naturales se evaluó con la (CI_{50}), que es la cantidad necesaria para reducir en un 50 % la viabilidad celular. No existe un único criterio universal para definir la citotoxicidad, ya que los valores de

referencia pueden variar dependiendo del tipo de muestra (extracto crudo, fracción o compuesto puro) y de las condiciones experimentales (tipo de línea celular, tiempo de exposición y método de ensayo). Sin embargo, el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) de los Estados Unidos ha establecido guías ampliamente aceptadas para clasificar la citotoxicidad en ensayos de cribado (Wilson et al. 2020).

Según los criterios del NCI, un extracto crudo se considera altamente citotóxico cuando presenta un valor de IC_{50} menor de 20 $\mu\text{g/mL}$; moderadamente citotóxico entre 21 y 200 $\mu\text{g/mL}$; débilmente citotóxico entre 201 y 500 $\mu\text{g/mL}$; y no citotóxico cuando el valor es $> 500 \mu\text{g/mL}$ (Zulkipli et al., 2024; Mbaveng et al., 2019). Para compuestos puros o moléculas aisladas, se han propuesto criterios considerándose de alta citotoxicidad aquellos con $IC_{50} < 4 \mu\text{g/mL}$, de citotoxicidad moderada entre 4 y 20 $\mu\text{g/mL}$, de baja citotoxicidad entre 20 y 100 $\mu\text{g/mL}$ y sin actividad por encima de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Ramos-Silva et al., 2017). Estos valores de referencia han sido utilizados por diversos autores para evaluar la actividad biológica de extractos y compuestos puros. Stefanowicz-Hajduk et al. (2021) y Tchinda et al. (2023) confirman que los compuestos puros con IC_{50} menores de 30 $\mu\text{g/mL}$ son considerados activos frente a líneas tumorales, mientras que aquellos con valores superiores tienden a presentar una actividad limitada. Yakubu et al. (2022) señalan que la interpretación de la citotoxicidad debe contextualizarse con las condiciones experimentales, incluyendo la línea celular empleada y la pureza del compuesto.

La mezcla UrsOle no fue citotóxica en la línea J744A.1, pero moderadamente citotóxica en MCF-7y de baja citotoxicidad en HCT-15. Los valores de CI_{50} observados para MCF-7 y HCT-15 se encuentran en rangos similares a los reportados para otros triterpenos con actividad moderada a baja (Zulkipli et al., 2024).

Además, UrsOle presentó el mayor efecto citotóxico en la línea celular MCF-7 (adenocarcinoma mamario) comparado con las HCT-15 (adenocarcinoma de colon) o J744A.1 (macrófagos murinos). Dicha variabilidad puede explicarse por las diferencias en el metabolismo, la permeabilidad de membrana y la expresión de proteínas involucradas en la resistencia celular (Mbaveng et al., 2019).

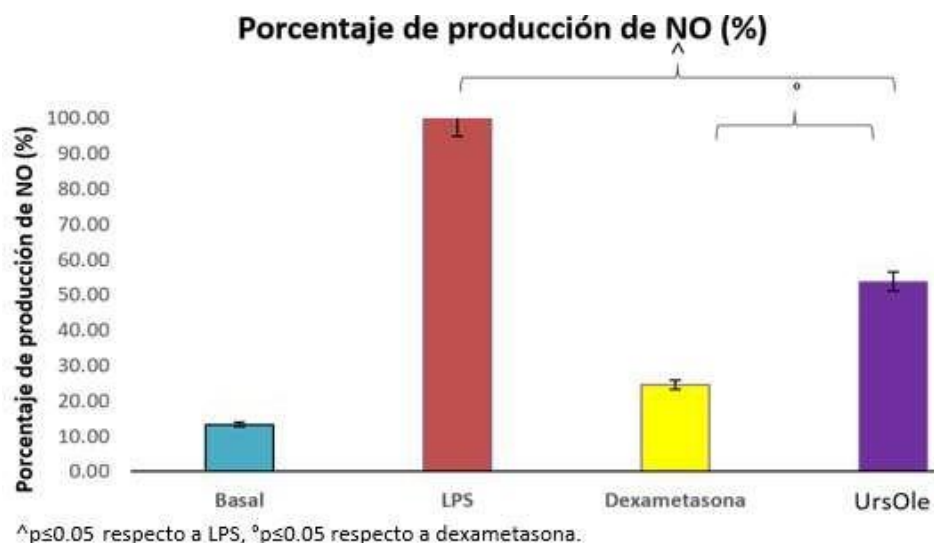
En particular, los triterpenos como el AU y AO, componentes de UrsOle, han mostrado mayor actividad en células epiteliales de mama, donde inducen apoptosis a través de la modulación de las caspasas y la vía mitocondrial (Stefanowicz-Hajduk et al., 2021; Yakubu et al., 2022). En conjunto, UrsOle mostró un perfil de citotoxicidad moderado, consistente con lo previamente reportado para compuestos triterpénicos, cuya actividad biológica depende tanto de su estructura química como del tipo de línea celular evaluada. Por lo tanto, la mezcla de UrsOle puede ser un candidato para desarrollar derivados semisintéticos o formulaciones que aumenten su eficacia y biodisponibilidad. (Mbaveng et al., 2019).

7.8. Determinación de óxido nítrico

El óxido nítrico es un mediador inflamatorio el cual fue cuantificado de manera indirecta mediante el ensayo con reactivo de Gries. En la gráfica 1 se muestra el % de NO producido por macrófagos estimulados con LPS y tratados con UrsOle

a una concentración de 50 µg/mL. UrsOle redujo la producción de NO en un 46,26% en macrófagos estimulados con LPS, mientras que la dexametasona inhibió la producción de NO en un 75,37%. Estos resultados muestran que ambos tratamientos disminuyeron la producción de NO comparados con el grupo negativo. No obstante, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre UrsOle y la dexametasona, siendo esta última la que produjo el mayor porcentaje de inhibición.

Gráfica 1. Producción de óxido nítrico en macrófagos J744A.1 estimulados por LPS.



La mezcla UrsOle redujo significativamente la producción de óxido nítrico en macrófagos J774A.1 estimulados con LPS; sin embargo, su efecto fue inferior al de dexametasona, lo que sugiere una actividad antiinflamatoria moderada. Este comportamiento concuerda con lo reportado para triterpenos pentacíclicos, cuya acción antiinflamatoria se asocia principalmente a la inhibición de iNOS y a la modulación de vías proinflamatorias, dependiendo del contexto celular y la concentración evaluada (Ikeda et al., 2008).

7.9. Determinación de estabilización de membrana HRBC

Los resultados obtenidos en la prueba de estabilización de la membrana de eritrocitos (HRBC) evidencian que tanto el diclofenaco (control positivo) como UrsOle ejercen un efecto protector frente a la hemólisis inducida por estrés osmótico, con una respuesta dependiente de la concentración (tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de hemólisis y porcentaje de estabilización de membrana del diclofenaco) y de UrsOle.

Concentración	Diclofenaco		Sólido aislado (UrsOle)	
	%Hemólisis	%Estabilización	%Hemólisis	%Estabilización
200	2.36	97.64	10.08	89.92
100	5.07	94.93	11.71	88.29
50	5.97	94.03	11.90	88.10
25	12.43	87.57	13.38	86.63
12.5	18.75	81.25	14.78	85.23
Control negativo	0	100	0	100

Estos resultados concuerdan con Alam et al. (2014), quienes demostraron que el ácido ursólico y el ácido oleanólico poseen propiedades antiinflamatorias y antioxidantes asociadas con la estabilización de membranas lisosomales y de eritrocitos, al disminuir la permeabilidad y prevenir la liberación de enzimas citotóxicas. Ghosh et al. (2011) observaron que compuestos triterpénicos reducen la lisis de los eritrocitos al reforzar la

integridad de la bicapa lipídica y disminuir el flujo iónico frente a condiciones hipotónicas.

La diferencia en el porcentaje de estabilización de membranas de UrsOle y el de diclofenaco podría deberse a la afinidad de los compuestos hacia los componentes lipídicos de la membrana, lo cual limita su biodisponibilidad local (Gutiérrez-Rebolledo et al., 2018). No obstante, los porcentajes de estabilización superiores al 85 %, incluso en las concentraciones bajas (12.5 µg/mL), sugieren que UrsOle ejerce una acción significativa comparable a la de antiinflamatorios no esteroideos convencionales.

En conjunto, los resultados respaldan el potencial de estos triterpenos como agentes antiinflamatorios naturales con capacidad de protección de membranas celulares, posiblemente a través de mecanismos relacionados con la inhibición de la desnaturalización de proteínas y la estabilización de estructuras fosfolipídicas (Gupta et al., 2018).

Además, es importante señalar que durante los procesos inflamatorios la integridad de la membrana plasmática y la membrana lisosomal están estrechamente relacionadas desde el punto de vista funcional y lipídico. Los daños en la membrana plasmática inducen un rápido influx de Ca^{2+} extracelular que desencadena mecanismos de reparación dependientes de exocitosis lisosomal; en este proceso los lisosomas suministran lípidos y enzimas necesarios para “parchar” y restaurar la bicapa plasmática (Corrotte & Castro-Gomes, 2019; Andrews, 2015). Por otro lado, la inflamación y el estrés oxidativo actúan como agentes de inestabilidad que comprometen la integridad de los lisosomas. Cuando estas estructuras se vuelven permeables, liberan enzimas (hidrolasas) que no solo intensifican la inflamación, sino que pueden provocar un daño celular irreversible. Esta vulnerabilidad depende directamente de la salud de la membrana lisosomal

(composición de grasas y su equilibrio antioxidante), factores que reflejan fielmente lo que sucede en la superficie exterior de la célula cuando se enfrenta a un entorno hostil. De este modo, la protección de estas membranas internas se convierte en una prioridad para frenar el ciclo de daño y restaurar el equilibrio celular (Aits et al., 2015; Thelen & Zoncu, 2017).

Más allá de su efecto sobre las rutas genéticas de la inflamación, compuestos como el ácido ursólico y otros triterpenos modulan procesos celulares relacionados con la señalización y la integridad de las membranas. Su función principal es integrarse en las membranas para regular su flexibilidad y resistencia, lo que permite que la célula mantenga su integridad incluso bajo estrés. Al estabilizar los fosfolípidos y frenar la oxidación de las grasas, estos compuestos protegen tanto la superficie celular como los lisosomas, evitando que estos últimos se rompan y liberen sustancias que agravarían la inflamación. Este enfoque "lipocéntrico", respaldado por estudios biofísicos en modelos de membranas, nos revela que la protección de la célula no solo depende de señales químicas complejas, sino también de un fortalecimiento físico directo y fundamental de su estructura (Fogde et al., 2022; Nguyen et al., 2021.)

8. Conclusión

Estos hallazgos confirman el potencial farmacológico de *C. thevetioides* como fuente de compuestos con acción antiinflamatoria, proporcionando respaldo científico a su uso tradicional y abriendo la posibilidad de desarrollar en el futuro derivados sintéticos de sus principios activos con mayor selectividad y eficacia terapéutica sobre procesos inflamatorios

9. Referencias

- Abid, S. N., Manaye, K., Cheran, K., Murthy, C., & Penumetcha, S. (2025). *The effect of chronic inflammation and oxidative stress on Alzheimer's disease progression: A systematic review*. Cureus. <https://doi.org/10.7759/cureus.84057>
- Aits, S., Jaattelä, M., & Nylandsted, J. (2015). *Methods for the quantification of lysosomal membrane permeabilization: a hallmark of lysosomal cell death*. In *Methods in Cell Biology* (Vol. 126, pp. 261-285). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2014.10.032>
- Alam, F., Khan, G. N., & Asad, M. H. H. B. (2014). Antioxidant and membrane stabilizing activities of oleanolic acid and ursolic acid isolated from *Lantana camara* L. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(9), 1515-1521. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v13i9.3>
- Ali, S. A., Khalid, A., & Ahmad, M. (2021). Medicinal plants: A potential source of therapeutic agents. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 649150. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.649150>
- Ali, S., Mahmood, S., & Akhtar, M. (2020). Phytochemical constituents and medicinal applications of Apocynaceae species: A comprehensive review. *Phytochemistry Reviews*, 19(1), 133-155. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09662-1>
- Bahramsoltani, R., Rahimi, R., & Farzaei, M. H. (2020). Pharmacokinetics and safety of herbal medicines in patients with inflammatory bowel disease: A systematic review. *World Journal of Gastroenterology*, 26(39), 6161-6176.
- Balderas-López, J., Barbonetti, S., Pineda-Rosas, E., Tavares-Carvalho, C., & Navarrete, A. (2019). *Cardiac glycosides from Cascabela thevetioides by HPLC-MS analysis*.
- Brune, K., & Maier, C. (2019). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Pharmacology and therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics*, 206, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.05.003>
- Buttgerit, F., & Sander, O. (2020). Glucocorticoid therapy in chronic inflammatory diseases: A modern approach. *Autoimmunity Reviews*, 19(5), 102487. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102487>
- Cai, Y., et al. (2023). The burden of rheumatoid arthritis: findings from the 2019 Global Burden of Disease Study and forecasts for 2030. [Artículo / PMC]. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9959633/>.
- Cao, Y., Wang, W., Xie, S., et al. (2025). *Joint association of the inflammatory marker and cardiovascular-kidney-metabolic syndrome stages with all-cause and cardiovascular disease mortality: A national prospective study*. BMC Public Health, 25, 10. <https://doi.org/10.1186/s12889-024-21131-2>
- Chahín-Parra, J., López-Aguilar, J. E., Londoño-Mesa, M. I., & Gutiérrez-Ávila, R. (2024). La inflamación como modulador de la conducta y el comportamiento alimentario durante la enfermedad. *Journal of Behavior and Feeding*, 4(8), 104. <https://jbf.cusur.udg.mx/index.php/JBF/article/view/76/104>
- Checker, R., Sandur, S. K., Sharma, D., Patwardhan, R. S., Jayakumar, S., Kohli, V., Sethi, G., Aggarwal, B. B., & Sainis, K. B. (2012). Potent anti-inflammatory activity of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, is mediated through suppression of NF-κB, AP-1 and NF-AT. *PLoS ONE*, 7(2), e31318. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031318>
- Ciapponi, A., Virgilio, S. A., Berrueta, M., Soto, N. C., Ciganda, Á., Rojas Illanes, M. F., Rubio Martínez, B., Gamba, J., González-Salazar, C. A., & Rocha Rodríguez, J. N. (2020). Epidemiology of inflammatory bowel disease in Mexico and Colombia: Analysis of health

databases, mathematical modelling and a case-series study. *PLoS ONE*, 15(1), e0228256. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228256>

- Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). (2021, 6 de octubre). *El 75% de los fármacos conocidos pueden tener nuevos usos terapéuticos*. <https://www.csic.es/es/actualidad-del-csic/el-75-de-los-farmacos-conocidos-pueden-tener-nuevos-usos-terapeuticos>
- Curtis, E., Fuggle, N., Shaw, S., Spooner, L., Ntani, G., Parsons, C., Corp, N., Honvo, G., Baird, J., Maggi, S., Dennison, E., Bruyère, O., Reginster, J.-Y., & Cooper, C. (2019). *Safety of cyclooxygenase-2 inhibitors in osteoarthritis: outcomes of a systematic review and meta-analysis*. *Drugs & Aging*, 36(Suppl 1), 25-44. <https://doi.org/10.1007/s40266-019-00664-x>
- Da Costa, B. R., Pereira, T. V., Saadat, P., Rudnicki, M., Iskander, S. M., Bodmer, N. S., Bobos, P., Gao, L., Kiyomoto, H. D., Montezuma, T., Almeida, M. O., Cheng, P.-S., Hincapié, C. A., Hari, R., Sutton, A. J., Tugwell, P., Hawker, G. A., & Jüni, P. (2021). *Effectiveness and safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs and opioid treatment for knee and hip osteoarthritis: network meta-analysis*. *BMJ*, 375, n2321. <https://doi.org/10.1136/bmj.n2321>
- De Young, L. M., Carlson, R. P., Freire, M., Schrier, D. J., & Rucinski, G. (1989). Evaluation of TPA-induced ear edema and its inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory agents in the mouse. *Agents and Actions*, 26(3-4), 335-341.
- Etchegaray-Morales, I., Mendoza-Pinto, C., Munguía-Realpozo, P., Osorio-Peña, Á. D., Ibañez-Ovando, S., Pineda, C., & Colaboradores. (2022). Systemic lupus erythematosus, a leading cause of death in young Mexican females: A nationwide population-based study, 2000-2020. *Rheumatology International*, 42, 1715-1720. <https://doi.org/10.1007/s00296-022-05154-9>
- Fang, P., Pang, W., Xuan, S., Chan, W., & Leung, K. C. (2024). *Recent advances in peptide macrocyclization strategies*. *Chemical Society Reviews*, 53, 11725-11771. <https://doi.org/10.1039/D3CS01066J>
- Fogde, D. L., Xavier, C. P. R., Balnytė, K., Holland, L. K. K., Stahl-Meyer, K., Dinant, C., Corcelle-Termieu, E., Pereira-Wilson, C., Maeda, K., & Jäätelä, M. (2022). *Ursolic acid impairs cellular lipid homeostasis and lysosomal membrane integrity in breast carcinoma cells*. *Cells*, 11(24), 4079. <https://doi.org/10.3390/cells11244079>
- Food and Drug Administration (FDA). (2007). *Guidance for Industry: Single Dose Acute Toxicity Testing for Pharmaceuticals*. U.S. Department of Health and Human Services. <https://www.fda.gov/media/71954/download>
- Furman, D., Campisi, J., Verdin, E., Carrera-Bastos, P., Targ, S., Franceschi, C., Ferrucci, L., Gilroy, D. W., Fasano, A., Miller, G. W., Miller, A. H., Mantovani, A., Weyand, C. M., Barzilai, N., Goronzy, J. J., Rando, T. A., Effros, R. B., Lucia, A., Kleinstreuer, N., & Slavich, G. M. (2019). *Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span*. *Nature Medicine*, 25(12), 1822-1832. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0675-0>
- García Rodríguez, L. A., Martín-Pérez, M., Hennekens, C. H., Rothwell, P. M., & Lanas, A. (2023). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of gastrointestinal and cardiovascular adverse events. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 8(5), 401-412. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(23\)00036-5](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(23)00036-5)
- Geylan, G., Janet, J. P., Tibo, A., He, J., Patronov, A., Kabeshov, M., ... & De Maria, L. (2024). *PepINVENT: Generative peptide design beyond the natural amino acids*. arXiv. <https://arxiv.org/abs/2409.14040>
- Ghosh, A., Banerjee, S., Chattopadhyay, S., & Das, A. (2011). Evaluation of anti-inflammatory activity of oleanolic acid in experimental animal models. *Pharmacognosy Research*, 3(3), 161-165. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.85006>

- Gómez-Sánchez, M., Echevarría-Guanche, M., & Fernández-Reyes, T. (2019). La inflamación desde una perspectiva inmunológica: desafío a la Medicina en el siglo XXI. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 48(1), 1-14. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7000650>
- González, R., Martínez, J., & Torres, F. (2019). Caracterización y distribución de *Cascabela thevetioides* en el sur de México. *Revista Mexicana de Botánica*, 77(3), 421-432. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2019.02.003>
- González-Chávez, S. A., Esquivel-Valerio, J. A., Morales-Torres, J. F., & García-De La Torre, I. (2020). Epidemiología de las enfermedades reumáticas en México. *Reumatología Clínica*, 16(6), 445-452.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., & Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 126(1), 131-138. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-X)
- Gutiérrez-Rebolledo, G. A., et al. (2018). Triterpenoids as anti-inflammatory agents: Structure-activity relationship in erythrocyte membrane stabilization. *Journal of Natural Products*, 81(2), 294-302. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00845>
- Gupta, R. A., Kumar, D., & Sharma, A. (2018). Anti-inflammatory and membrane-stabilizing activities of plant-derived triterpenoids: A mechanistic review. *Journal of Ethnopharmacology*, 210, 233-247. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.08.039>
- Henriksson, H., et al. (2018). *Inflammation: The link between comorbidities, genetics, and Alzheimer's disease*. *Journal of Neuroinflammation*. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1313-3>
- Ikeda, Y., Murakami, A., & Ohigashi, H. (2008). Ursolic acid: An anti- and pro-inflammatory triterpenoid. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(1), 26-42. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700389>
- Jiménez, M., Rodríguez, L., & Sánchez, D. (2021). Diversidad y usos tradicionales de *Cascabela thevetioides* en la región centro-sur de México. *Journal of Ethnopharmacology*, 260, 113105. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113105>
- Kang, D. O., An, H., Park, G. U., Yum, Y., Park, E. J., Park, Y., Jang, W. Y., Kim, W., Choi, J. Y., Roh, S.-Y., Na, J. O., Kim, J. W., Kim, E. J., Rha, S.-W., Park, C. G., Seo, H. S., & Choi, C. U. (2020). Cardiovascular and bleeding risks associated with nonsteroidal anti-inflammatory drugs after myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 76(5), 518-529. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.06.017>
- Karthik, V., Somashekar, R., & Harish, D. (2020). Toxicological evaluation of yellow oleander (*Thevetia peruviana*) seed extract: Acute and sub-acute studies in rodents. *Biomedical Research Journal*, 14(3), 178-186. <https://doi.org/10.1016/j.biore.2020.07.005>
- Khalil, N. A., Ahmed, E. M., Tharwat, T., & Mahmoud, Z. (2024). NSAIDs between past and present; a long journey towards an ideal COX-2 inhibitor lead. *RSC Advances*, 14, 30647-30661. <https://doi.org/10.1039/D4RA04686B>
- Liu, S., Wang, J., Yang, Y., Wang, C., Ling, L., Guo, H., & Xiao, C. (2023). ChatGPT-powered Conversational Drug Editing Using Retrieval and Domain Feedback. *arXiv*. <https://arxiv.org/abs/2305.18090>
- López, C., Ramírez, A., & Hernández, S. (2022). Ecología y biología de *Cascabela thevetioides* en áreas áridas de México. *Plant Ecology & Diversity*, 15(2), 237-249. <https://doi.org/10.1080/17550874.2021.1937875>

- López-Villarreal, J., Ramírez-Vazquez, E., & González-Cortés, F. (2022). Anti-inflammatory properties of medicinal plants: Potential for the treatment of chronic diseases. *Phytotherapy Research*, 36(9), 2785-2803. <https://doi.org/10.1002/ptr.7418>
- Lyles, R. H., Poindexter, C., Evans, A., Brown, M., & Cooper, C. R. (2008). Nonlinear model based estimates of IC₅₀ for studies involving continuous therapeutic dose response data. *Contemporary Clinical Trials*, 29(6), 878-886. <https://doi.org/10.1016/j.cct.2008.05.009>
- Martínez, A., Hernández, M., & López, J. (2021). *Apocynaceae family in the Mexican flora: Diversity, medicinal uses, and phytochemical studies*. *Journal of Ethnopharmacology*, 270, 113750.
- Martínez, A., Muñoz-Acevedo, A., Sayago, A., Rodríguez-González, J. F., García-Correa, J. S., & Villamil-Salcedo, V. (2021). *Mexican medicinal plants with anti-inflammatory potential: A review*. *Journal of Ethnopharmacology*, 271, 113766.
- Mbaveng, A. T., Ngameni, B., Kuete, V., Simo, I., & Ngadjui, B. (2019). Cytotoxicity of crude extract and isolated constituents of African medicinal plants. *Pharmacognosy Reviews*, 13(26), 85-99.
- MDPI Encyclopedia. (2024). *Ursolic and oleanolic acids*. *Encyclopedia*. <https://encyclopedia.pub/entry/9337>
- Mendoza, R., & Romero, C. (2021). Estudio fitoquímico y toxicidad de *Cascabela thevetioides*: Implicaciones en su uso medicinal. *Toxicology Reports*, 8, 890-896. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.05.014>
- Miguel-Lavariega, D., et al. (2023). Perfil epidemiológico de la artritis reumatoide. *Revista Médica del IMSS*. https://revistamedica.imss.gob.mx/index.php/revista_medica/article/view/4931
- Miranda, K. M., Espey, M. G., & Wink, D. A. (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, 5(1), 62-71. <https://doi.org/10.1006/niox.2000.0319>
- Mishra, S., Thakur, M., & Sharma, S. (2021). Bioactive compounds in medicinal plants and their therapeutic potential. *Research Journal of Medicinal Plants*, 15(1), 23-37. <https://doi.org/10.3923/rjmp.2021.23.37>
- Moncada, S., Palmer, R. M. J., & Higgs, E. A. (1991). Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 43(2), 109-142.
- National Cancer Institute (NCI). (2024). *Definición de Inflamación*. Diccionario de cáncer del NCI. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/inflamacion>
- Nguyen, H. N., Ullevig, S. L., Short, J. D., Wang, L., Ahn, Y. J., & Asmis, R. (2021). *Ursolic acid and related analogues: Triterpenoids with broad health benefits*. *Antioxidants*, 10(8), 1161. <https://doi.org/10.3390/antiox10081161>
- Qin, P., Ho, F. K., Celis-Morales, C. A., et al. (2025). *Association between systemic inflammation biomarkers and incident cardiovascular disease in 423,701 individuals: Evidence from the UK Biobank cohort*. *Cardiovascular Diabetology*, 24, 162. <https://doi.org/10.1186/s12933-025-02721-9>
- Ramos-Silva, A. (2017). *Anticancer potential of Thevetia peruviana fruit methanolic extract*. Doctoral dissertation, University of Hamburg. <https://d-nb.info/1131948033/34>

- Rojas, J. M., & García, A. L. (2021). Pharmacodynamics and adverse effects of glucocorticoids. *European Journal of Pharmacology*, 892, 173703. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173703>
- Shao, H., Yu, Z., Zhang, J., & Wang, X. (2022). Traditional medicine: A review of its use in the treatment of inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, 282, 114582. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.114582>
- Silva, M. M., Barbosa, L. C., & Lima, T. C. (2022). Medicinal plants from Apocynaceae family: Phytochemical and pharmacological perspectives. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 793456.
- Stefanowicz-Hajduk, J., et al. (2021). In vitro cytotoxic activity of standardized extracts, a fraction, and isolated compounds. *Molecules*, 26(8), 2342. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8057092/>
- Tchinda, A. T., Kuete, V., & Ngadjui, B. T. (2023). In vitro cytotoxic activity of African plants: A review. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 23(1), 198. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9370645/>
- Thelen, A. M., & Zoncu, R. (2017). *Emerging roles for the lysosome in lipid metabolism*. Trends in Cell Biology, 27(11), 833-850. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.07.006>
- Thomas, V. V., et al. (2022). Review of current evidence in management of oleander toxicity. *Current Medical Issues*, 20(2), 82-88. https://doi.org/10.4103/cmi.cmi_112_21
- Tian, S., Shi, Y., Yu, Q., & Upur, H. (2010). Determination of oleanolic acid and ursolic acid contents in *Ziziphora clinopodioides* Lam. by HPLC method. *Pharmacognosy Magazine*, 6(22), 116-119. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.62898>
- Wang, C., Wang, X., Zhao, S., Sun, W., & Tong, S. (2019). Preparative separation of structural isomeric pentacyclic triterpene oleanolic acid and ursolic acid from natural products by pH-zone-refining countercurrent chromatography. *RSC Advances*, 9, 38860-38866. <https://doi.org/10.1039/C9RA06082K>
- Wang, C., Zhao, S., ... Tong, S. (2022). Ursolic and oleanolic acids: Plant metabolites with neuroprotective potential. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4599. <https://doi.org/10.3390/ijms22094599>
- Wilson, B. A. P., Thornburg, C. C., Henrich, C. J., Grkovic, T., & O'Keefe, B. R. (2020). Creating and screening natural product libraries. *Natural Product Reports*, 37(6), 893-918. <https://doi.org/10.1039/C9NP00068B>
- Yang, E. J., Lee, W., Ku, S. K., Song, K. S., & Bae, J. S. (2012). Anti-inflammatory activities of oleanolic acid on HMGB1-activated HUVECs. *Food and Chemical Toxicology*, 50(5), 1288-1294. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.02.026>
- Yakubu, M., et al. (2022). Bio-Prospecting of Crude Leaf Extracts from Thirteen Plants for Anticancer Potential. *Molecules*, 28(3), 1394. <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/3/1394>
- Zhang, H., He, Z., Shi, J., Huang, X., & Peng, Z. (2025). Trends in the research and development of peptide drug conjugates: artificial intelligence aided design. *Frontiers in Pharmacology*, 16, 1553853. <https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1553853>
- Zhang, X., Wang, H., Xu, Y., Luan, M., Zhao, F., & Meng, Q. (2021). Advances on the anti-inflammatory activity of oleanolic acid and derivatives. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 21(15), 2020-2038. <https://doi.org/10.2174/1389557521666210126142051>

- Zhao, M., Wu, F., Tang, Z., Yang, X., Liu, Y., Wang, F., & Chen, B. (2023). Anti-inflammatory and antioxidant activity of ursolic acid: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1256946. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1256946>
- Zulkipli, N. N., et al. (2024). The cytotoxicity effect and identification of bio-active compounds from *Prismatomeris glabra* leaf extracts. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 13(1), 73. <https://bjbas.springeropen.com/articles/10.1186/s43088-024-00490-0>