



ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y ANTIOXIDANTE DE *MERREMIA UMBELLATA (L.) HALLIER f**

ANTIINFLAMATORY AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *MERREMIA UMBELLATA (L.) HALLIER f.*

Castro-Guerrero Jenny Paola¹
 Ocampo-Buendía Yanet Cecilia²
 Franco-Ospina Luis Alberto³

Correspondencia: lfrancoo@unicartagena.edu.co

Recibido para evaluación: Noviembre – 19 – 2012. Aceptado para publicación: Marzo –2 – 2013.

RESUMEN

Introducción: *Merremia umbellata* es ampliamente utilizada en la medicina popular para tratar múltiples enfermedades, incluyendo aquellas que cursan con inflamación.

Objetivos: evaluar el efecto antiinflamatorio y antioxidante del extracto etanólico total obtenido de las hojas de *Merremia umbellata*.

Métodos: el material vegetal fue extraído por maceración con etanol. La actividad antiinflamatoria se evaluó utilizando el modelo murino *in vivo* de edema auricular inducido por 13-acetato de 12-orto-tetradecanoilforbol (TPA), determinando la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO). Adicionalmente se determinó la inhibición de la producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos RAW 264.7 estimulados con lipopolisacárido (LPS). Mientras que la actividad antioxidante se determinó aplicando los métodos espectrofotométricos de captación de los radicales libres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), ABTS (sal diamónica del ácido 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6- sulfónico), NO y H₂O₂ (peróxido de hidrógeno).

Resultados: el extracto de *Merremia umbellata* disminuyó el edema y la actividad de la enzima MPO en orejas de ratones inflamadas con TPA, así como la producción de NO en macrófagos activados. Además presentó significativa actividad captadora de los radicales libres DPPH, ABTS y H₂O₂.

Conclusiones: se demostró actividad antiinflamatoria y antioxidante en el extracto etanólico total de *Merremia umbellata*. **Rev.Cienc.Biomed. 2013;4(1):13-19**

PALABRAS CLAVES

Convolvulaceae; Antiinflamatorios; Antioxidantes.

SUMMARY

Introduction: *Merremia umbellata* is widely used in popular medicine to treat several diseases, including those that implicate inflammation.

Objectives: To assess the anti-inflammatory and antioxidant effect of the total ethanolic extract obtained from the leaf of *Merremia umbellata*.

Methods: The vegetable material was extracted by maceration with ethanol. Anti-inflammatory activity was evaluated with the *in vivo* murine model of auricular edema induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), determining the activity of

* Un producto del Grupo de Investigación "Evaluación Biológica de Sustancias Promisorias". Facultad de Ciencias Farmacéuticas. Universidad de Cartagena. Colombia.

¹ Química farmacéutica. Facultad de Ciencias Farmacéuticas. Universidad de Cartagena. Cartagena. Colombia.

² Química Farmacéutica. Facultad de Ciencias Farmacéuticas. Universidad de Cartagena. Cartagena. Colombia.

³ Químico farmacéutico. Ph.D. Profesor Titular. Universidad de Cartagena. Colombia.

the myeloperoxidase enzyme (MPO). In addition, the inhibition of the production of nitric oxide (NO) in RAW 264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharides (LPS) was determined. Whereas the antioxidant activity was determined with the application of spectrophotometric methods, which involve the scavenge of free radicals DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), NO and H₂O₂ (Hydrogen Peroxide).

Results: *Merremia umbellata* extract decreased the edema and the activity of MPO enzyme in inflamed ears of mice with TPA, just like the production of NO in activated macrophages. And besides, it presented significant free radicals scavenging activities DPPH, ABTS and H₂O₂.

Conclusion: The anti-inflammatory and antioxidant activity in the total ethanolic extract of *Merremia umbellata* was demonstrated. **Rev.Cienc.Biomed. 2013;4(1):13-19**

KEY WORDS

Convolvulaceae; Anti-Inflammatory Agents; Antioxidants.

INTRODUCCIÓN

Estímulos nocivos para el organismo como: patógenos, células dañadas o irritantes, desencadenan una respuesta inflamatoria. Cuando esta respuesta persiste se presenta inflamación crónica y aumento exacerbado de especies reactivas de oxígeno [ROS] (1-3).

Las ROS son radicales libres que al producirse en cantidades excesivas generan daño en los ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos, perturbando la homeostasis celular, lo que conduce a patologías severas como osteoartritis, artritis reumatoide, gota, asma, enfermedad inflamatoria intestinal, diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares y desórdenes neurodegenerativos. La inflamación y la sobreproducción de ROS, son reconocidas como dos condiciones críticas asociadas con la etiología y la progresión de una serie de enfermedades humanas(4,5).

Merremia umbellata es una enredadera delgada y trepadora que crece en lugares pantanosos y sitios arenosos, cerca de la playa. Se encuentra distribuida en África, Asia y América tropical. En Malasia sus hojas tiernas se comen y se aplica en cataplasmas sobre quemaduras, escaras y llagas. Mientras que en la India se utiliza para el tratamiento de fístulas, pústulas y tumores. Las semillas producen un mucílago, que es laxante y útil en enfermedades cutáneas. Una decocción de la planta también se utiliza como diurético y para tratar reumatismo y dolor de cabeza. Además se instila en el oído para úlceras auriculares y abscesos (6,7).

El objetivo es evaluar la actividad antiinflamatoria y antioxidante del extracto etanólico obtenido de hojas de *Merremia umbellata*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos: 12-O-tetradecanoilforbol-13 acetato [TPA], indometacina, 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), ácido ascórbico, sal diamónica del ácido 2, 2'azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-sulfónico) [ABTS], ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico [Trolox], persulfato potásico, nitroprusiato de sodio dihidratado, nitrito de sodio, sulfanilamida, N-1-(naftil) etilendiaminodihidrocloruro, peroxidasa, guaiacol, lipopolisacarido [LPS], medio de cultivo DMEM, azul de tripan, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio [MTT], N-([3-(aminometil) fenil] metil) etanimidamidihidrocloruro [1400W], O-dianisidina y ácido etilendiaminotetraacético [EDTA], se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Metanol, etanol, acetona y ácido fosfórico de J.T. Baker. Peróxido de hidrogeno y bromuro de hexadeciltrimetilamonio [HTAB] de Merk. Dimetilsulfóxido de Carlo Erba. Ácido cafeico de Calbiochem y suero bovino fetal [SBF] de GIBCO. Las células RAW 264.7 se adquirieron de la American Type Culture Collection [ATCC].

Animales de experimentación: como reactivo biológico se utilizaron ratones ICR hembras [6-7 semanas de edad], con pesos alrededor de 25 gramos, suministrados por el Instituto Nacional de Salud de Colombia. Los animales se mantuvieron con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad, temperatura de 22±3°C y humedad relativa 45±5%, con

agua y alimento *ad libitum*. Los experimentos fueron realizados dando cumplimiento a lo dispuesto en la Ley 84 de 1989 y a la Resolución No. 008430 de 1993 y en concordancia con los lineamientos éticos aprobados internacionalmente para el uso de animales de experimentación.

Preparación del extracto vegetal: las hojas de *Merremia umbellata* se recolectaron en el municipio de Pueblo Nuevo, Departamento de Bolívar, al norte de Colombia. Un espécimen fue enviado al herbario de la Universidad de Antioquía para su identificación y quedó depositado en sus archivos, bajo el número 175331. Las hojas secas y trituradas de *Merremia umbellata*, se maceraron con etanol al 96% hasta agotamiento y el extracto obtenido fue concentrado en rotaevaporadora temperatura controlada (35-45 °C) y presión reducida.

Actividad anti-inflamatoria: la actividad antiinflamatoria del extracto de *Merremia umbellata*, se determinó utilizando el modelo murino *in vivo* de edema auricular inducido por TPA(8,9). Se utilizaron grupos de 6 animales. La oreja derecha de cada ratón recibió una aplicación tópica de 2.5 µgramos de TPA. El extracto etanólico de *Merremia umbellata*, disuelto en acetona, se aplicó en forma tópica (1 mg/oreja) inmediatamente después de la aplicación de TPA. La oreja izquierda, utilizada como control, recibió el vehículo. La indometacina (0.5 mg/oreja) se utilizó como fármaco de referencia. Después de 4 horas los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical y se extrajeron de cada oreja discos con un diámetro de 7 mm para determinar su peso. La diferencia de peso entre las orejas derecha e izquierda se tomó como expresión del edema. Se calculó el porcentaje de inhibición del edema en los animales tratados con respecto al grupo control.

Medida de la actividad de Mieloperoxidasa: el tejido auricular se homogenizó y el sobrenadante obtenido se empleó para evaluar la actividad de MPO utilizando el protocolo descrito por Bradley et al. (10), modificado para lectura en microplaca. 50 µL de los sobrenadantes fueron mezclados con o-dianisidina dihidroclorhidrato (0.067%), hexadecil trimetilamonio (HTAB 0.5%) y pe-

róxido de hidrógeno (H₂O₂ 0.003%). La OD₄₅₀ fue determinada en lector de placas Multiscan EX Thermo. Los resultados se presentan como unidades de actividad de la enzima. Una unidad de actividad fue definida como aquella que degrada 1µmol de peróxido de hidrogeno por minuto a 25°C.

Citotoxicidad en macrófagos RAW 264.7: los macrófagos RAW 264.7 fueron mantenidos en DMEM suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB), penicilina y estreptomina, a 37°C en atmósfera de aire humidificado con 5% de CO₂(11). Células en crecimiento exponencial fueron raspadas y sembradas en placas de 96 pozos e incubadas, luego se adicionó soluciones a diferentes concentraciones de la muestra en estudio y se incubaron nuevamente. Posteriormente la viabilidad celular fue evaluada empleando el ensayo del MTT(12), determinando la DO₅₅₀ en lector de placas Multiscan EX Thermo. En cada ensayo se incluyó un grupo control de células no tratadas y un grupo tratado con Tritón X-100 al 20% como control de máxima toxicidad. Para cada tratamiento se calculó el porcentaje de supervivencia relativo al grupo control y se determinó la CL₅₀.

Inhibición de la producción de óxido nítrico: la producción de óxido nítrico (NO) se estimó a partir de la acumulación de nitritos (NO₂), en el medio de cultivo de los macrófagos RAW 264.7, utilizando un ensayo basado en la reacción de Griess (13). 10 µL del estimulante LPS (1000 µg/mL) se adicionó a células incubadas a 37°C en atmósfera al 5% CO₂, las cuales contenían la muestras en estudio. En cada ensayo se incluyó un grupo control de células no estimuladas y un grupo tratado solo con LPS como control de máxima actividad. Transcurridas 24 horas 100 µL de los sobrenadantes de las muestras en estudio y se dejaron reaccionar con igual volumen de reactivo de Griess. La OD₅₅₀ fue determinada en lector de placas Multiscan EX Thermo. La concentración de nitritos en los sobrenadantes se determinó utilizando una curva estándar de NaNO₂.

Actividad captadora del radical DPPH: se determinó empleando el método descrito por Silva, et al.(14), con modificaciones. Diferentes concentraciones de las muestras en

estudio, fueron mezclados en proporción 1:2 (v/v) con una solución de DPPH• (100ppm) en metanol y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min., luego de los cuales se determinó la desaparición del radical DPPH a OD₅₅₀. En cada ensayo se incluyó un control, un blanco para cada muestra y un patrón de referencia (ácido ascórbico). Los valores de IC₅₀ fueron determinados mediante análisis de regresión lineal.

Actividad captadora del radical ABTS: se determinó empleando el método descrito por Re, et al.(15), con modificaciones 10 µL de las muestras en estudio fueron mezclados con 190 µL de una solución etanólica de ABTS 3.5 mM y persulfato de potasio 1.25 mM. Posteriormente se incubó durante 5 min. y se determinó la desaparición del radical ABTS• a OD₄₅₀. En cada ensayo se incluyó un control, un blanco para cada muestra y un patrón de referencia (Trolox). Los valores de IC₅₀ fueron determinados mediante análisis de regresión lineal.

Captación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂): se empleó método colorimétrico en el cual el H₂O₂ oxida el guayacol produciendo una coloración rojiza que puede ser fácilmente cuantificada(16). Soluciones a diferentes concentraciones de la muestra en estudio, fueron incubadas con una solución de H₂O₂ (10 mM). En todos los casos se incluyó un control, un blanco para cada muestra y un patrón de referencia (ácido ascórbico). Una vez terminado el tiempo de incubación, se adicionó una solución de guayacol (10 µL/5mL) y peroxidasa de rábano (1 mg/200µL), exceptuando los tubos del control negativo y se incubó de nuevo. Posteriormente se colocaron 200 µL de estos sobrenadantes en una microplaca. La OD₄₅₀ fue determinada en lector de placas Multiscan EX Thermo. Los valores de IC₅₀ fueron determinados mediante análisis de regresión lineal.

Análisis estadístico: los resultados correspondientes a tres ensayos independientes fueron expresados como promedio ± ESM y analizados mediante varianza de una vía (ANOVA), seguido de Dunnet o Tukey post hoc para comparaciones múltiples. Valores de $P < 0.05$ fueron considerados significativos. Los valores de IC₅₀ fueron determinados

mediante análisis de regresión lineal y expresados como la media con sus respectivos intervalos de confianza al 95%.

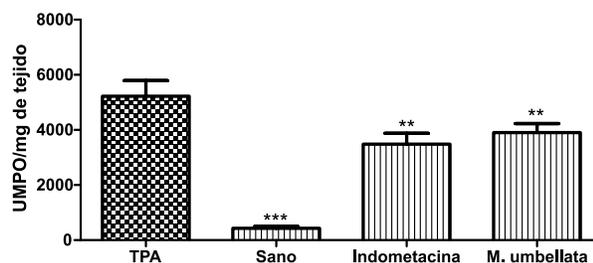
RESULTADOS

Actividad anti-inflamatoria: el extracto total de *Merremia umbellata*, planta que pertenece a la familia con volvulaceae presentó una importante actividad antiinflamatoria, reduciendo el edema inducido por el TPA (Tabla N° 1).

GRUPOS	DOSIS (MG/ OREJA)	EDEMA (MG)	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN
Control (TPA+acetona)	-----	13 ± 0.5	
Indometacina	0.5	5.8 ± 0.8	52.6*
<i>Merremiaumbellata</i>	1.0	9.2 ± 0.3	25.4*

Los resultados representan la media ± E.S.M.
* $P < 0.001$ ANOVA, estadísticamente significativo frente al control.

Medida de la actividad mieloperoxidasa: el tratamiento con TPA induce elevada migración de neutrófilos al tejido auricular, lo cual se evidencia por el elevado incremento de la actividad de MPO. La indometacina, utilizada como control positivo y el extracto de *Merremia umbellata* muestran importante efecto inhibitorio sobre la actividad de esta enzima (Gráfica N° 1).

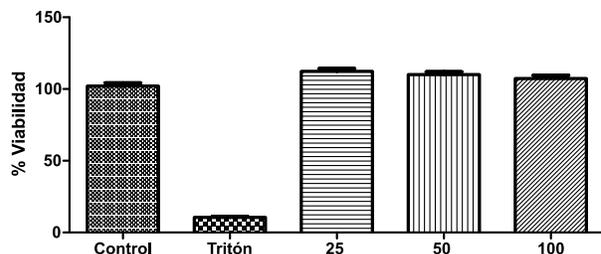


GRÁFICA N° 1.

Efecto del extracto de *Merremia umbellata*, sobre la actividad de MPO.

Los resultados representan la media ± E.S.M. (n = 6)
** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ ANOVA, estadísticamente significativo frente al control.

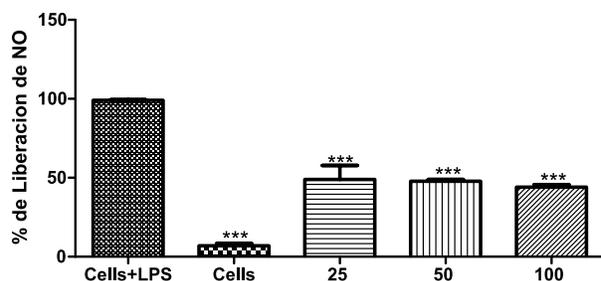
Citotoxicidad en macrófagos RAW 264.7: el extracto de *Merremia umbellata*, no causó toxicidad en la línea RAW 264.7, a concentraciones inferiores a 100 µg/mL (Gráfica N° 2).



GRÁFICA N° 2.

Efecto del extracto de *Merremia umbellata* (µg/mL), sobre la viabilidad de macrófagos RAW 264.7. Los resultados representan la media ± E.S.M.

Inhibición de la producción de óxido nítrico: la estimulación de los macrófagos RAW 264.7 con LPS incrementa la producción de nitritos en el medio de cultivo, esta producción fue inhibida significativamente por el extracto de *Merremia umbellata*; esta actividad no mostró un comportamiento concentración dependiente (Gráfica N° 3).



GRÁFICA N°3.

Efecto del extracto de *Merremiaumbellata* (µg/mL), sobre la producción de NO en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS.

Los resultados representan la media ± E.S.M.

*** $P < 0.001$ ANOVA, estadísticamente significativo frente al control.

Actividad antioxidante: el extracto de *Merremia umbellata* presentó potente actividad captadora de los radicales libres DPPH, ABTS y H_2O_2 , de manera de concentración dependiente, presentándose como un extracto promisorio para el aislamiento de sustancias activas con propiedades antioxidantes. Por otro lado, no presento actividad captadora del radical NO (datos no mostrados).

TABLA N°2.
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO TOTAL OBTENIDO DE LAS HOJAS DE MERREMIA UMBELLATA. (n = 6)

MUESTRA	CI ₅₀ (µG/ML)		
	DPPH	ABTS	H ₂ O ₂
Ácido Ascórbico	13.07 ± 0.045	2.452 ± 0.125	136.15 ± 3.450
<i>Merremia umbellata</i>	140.70 ± 2.3	199.5 ± 1.0	136.6 ± 3.5

Los resultados representan la media ± E.S.M

DISCUSIÓN

A pesar de los esfuerzos médicos que se han hecho para tratar las enfermedades inflamatorias, la eficacia clínica de las terapias antiinflamatorias no es satisfactoria y los medicamentos clínicamente importantes para controlar estas patologías se asocian con múltiples reacciones adversas sistémicas que a veces son limitantes para el tratamiento (17,18). La búsqueda de nuevos agentes antiinflamatorios continúa, en este sentido, las plantas han demostrado desempeñar un importante papel y han sido probadas exitosamente como una fuente alternativa para el tratamiento de numerosas enfermedades que cursan con inflamación (19-21).

En el presente trabajo, se estudió el efecto anti-inflamatorio del extracto etanólico total de *Merremia umbellata*, empleando el modelo murino *in vivo* de edema auricular inducido por TPA, agente ampliamente utilizado para producir inflamación a nivel cutáneo. La aplicación tópica de TPA provocó una fuerte respuesta inflamatoria en la oreja del ratón, con formación de edema masivo, el cual se hizo evidente por el aumento de peso en la oreja, en comparación con el grupo control tratado solo con acetona. Además, generó un aumento significativo de la infiltración de neutrófilos, en función de la elevada actividad de la mieloperoxidasa, la cual es una medida indirecta de la presencia de este tipo de células en el lugar de inflamación (22,23). El extracto de *Merremia umbellata* logró disminuir la inflamación inducida por el TPA, disminuyendo la infiltración de polimorfonucleares en el tejido auricular, de forma similar a la indometacina, compuesto utilizado como patrón de referencia, por lo que *Merremia umbellata* se considera una especie

promisoriateniendo en cuenta que se trata de un extracto total constituido por numerosos compuestos.

Los macrófagos RAW 264.7 mostraron una viabilidad del 100%, cuando fueron expuestos al efecto del extracto de *Merremia umbellata*, por lo tanto este extracto puede ser utilizado en el ensayo de liberación de NO en la línea celular RAW 264.7 a concentraciones inferiores a 100 µg/mL, ya que permite excluir la posibilidad de efectos citotóxicos. El extracto de *Merremia umbellata* disminuyó la liberación de óxido nítrico, lo cual podría ser un mecanismo que contribuye al efecto antiinflamatorio observado, ya que los macrófagos en condiciones patológicas pueden aumentar considerablemente la producción de este mediador proinflamatorio. Además, el exceso de óxido nítrico causa daño a los lípidos de la membrana, ADN y proteínas, perjudicando la correcta funcionalidad celular. Así, el desarrollo de sustancias que eviten la sobreproducción de este mediador inflamatorio se ha convertido en el objetivo de investigaciones que buscan tratar la inflamación crónica (24,25).

La potente actividad captadora de los radicales libres DPPH, ABTS y H₂O₂; mostrada por el extracto *Merremia umbellata* muestra a esta especie como una prometedora fuente para la búsqueda de moléculas captadoras de radicales libres que podrían contribuir a contrarrestar el estrés oxidativo asociado a los procesos inflamatorios y

por ende a prevenir la promoción de problemas degenerativos como artritis, trastornos cardiovasculares y cáncer; causados por la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (3).

Las especies del género *Merremia* son utilizadas en la medicina popular por sus propiedades antiinflamatorias, encontrándose estudios que respaldan este uso en las especies *M. tridentata* y *M. emerginata* (26-28). Son promisorios los resultados obtenidos en este trabajo, y constituyen la base de posteriores estudios encaminados a aislar, purificar y caracterizar los compuestos responsables de estas actividades.

CONCLUSIÓN

Se demostró actividad antiinflamatoria y antioxidante con las hojas de *Merremia umbellata*, constituyéndose en el primer reporte que demuestra dichas actividades biológicas para esta especie.

FINANCIACIÓN Y AGRADECIMIENTOS:

a la Universidad de Cartagena, Colombia por el apoyo financiero e institucional (Código de financiación: 003-2011). Castro-Guerrero Jenny Paola agradece al programa Jóvenes Investigadores e Innovadores "Virginia Gutiérrez de Pineda" de Colciencias. Colombia.

CONFLICTO DE INTERÉS: ninguno que declarar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bayarsaihan D. Epigenetic mechanisms in inflammation. *Journal of dental research*. 2011;90(1):9-17.
2. Han J, Shuvaev VV, Muzykantov VR. Targeted interception of signaling reactive oxygen species in the vascular endothelium. *Therapeutic Delivery*. 2012;3(2):263-276.
3. Khan AQ, Khan R, Qamar W, Lateef A, Ali F, Tahir M, et al. Caffeic acid attenuates 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA)-induced NF-kappaB and COX-2 expression in mouse skin: abrogation of oxidative stress, inflammatory responses and proinflammatory cytokine production. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2012;50(2):175-183.
4. Cui XY, Kim JH, Zhao X, Chen BQ, Lee BC, Pyo HB, et al. Antioxidative and acute anti-inflammatory effects of *Campsis grandiflora* flower. *Journal of ethnopharmacology*. 2006;103(2):223-228.
5. Poljsak B, Milisav I. The neglected significance of "Antioxidative Stress". *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2012.
6. Lalfakzuala R, Lalramnghinglova H, Kayang H. Ethnobotanical usage of plants in western Mi-

- zoram. Indian J Tradit Knowl. 2007;6:486-493.
7. Entry for *Merremia umbellata* ssp. *umbellata* (Linn.) Hall. f. [Family convolvulaceae] [database on the Internet]. Jstor Plant Science. 2005 [cited 27/12/2012].
 8. De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. Agents and actions. 1989;26(3-4):335-341.
 9. Payá M, Ferrándiz ML, Sanz MJ, Bustos G, Blasco R, Rios JL, et al. Study of the antioedema activity of some seaweed and sponge extracts from the mediterranean coast in mice. Phytotherapy Research. 1993;7(2):159-162.
 10. Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. J of Investigative Dermatology. 1982;78(3):206-209.
 11. Shi T, Mazumdar T, DeVecchio J, Duan ZH, Agyeman A, Aziz M, et al. cDNA microarray gene expression profiling of hedgehog signaling pathway inhibition in human colon cancer cells. PLoS One. 2010;5(10):e13054.
 12. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. Cancer Research. 1988;48(17):4827-833.
 13. Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. The Journal of Immunology. 1988;141(7):2407-2412.
 14. Silva BM, Andrade PB, Valentão P, Ferreres F, Seabra RM, Ferreira MA. Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and jam: antioxidant activity. J of Agricultural and Food Chemistry. 2004;52(15):4705-4712.
 15. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine. 1999;26(9):1231-1237.
 16. Doerge DR, Divi RL, Churchwell MI. Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. Analytical biochemistry. 1997;250(1):10-17.
 17. Arnstein PM. Evolution of topical NSAIDs in the guidelines for treatment of osteoarthritis in elderly patients. Drugs & aging. 2012;29(7):523-531.
 18. Aagaard L, Hansen EH. Information about ADRs explored by pharmacovigilance approaches: a qualitative review of studies on antibiotics, SSRIs and NSAIDs. BMC clinical pharmacology. 2009;9(1):4.
 19. Mulaudzi RB, Ndhlala AR, Kulkarni MG, Finnie JF, Staden JV. Anti-inflammatory and mutagenic evaluation of medicinal plants used by Venda people against venereal and related diseases. J Ethnopharmacol. 2012.
 20. Suhitha S, Gunasekaran K, Velmurugan D. Structure based design of compounds from natural sources for diabetes and inflammation. Bioinformation. 2012;8(23):1125-1131.
 21. Wang Q, Kuang H, Su Y, Sun Y, Feng J, Guo R, et al. Naturally Derived Anti-Inflammatory Compounds from Chinese Medicinal Plants. J Ethnopharmacol. 2012.
 22. Lau D, Baldus S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. Pharmacology & therapeutics. 2006;111(1):16-26.
 23. Garrido G, González D, Lemus Y, Delporte C, Delgado R. Protective effects of a standard extract of *Mangifera indica* L. (VIMANG) against mouse ear edemas and its inhibition of eicosanoid production in J774 murine macrophages. Phytomedicine. 2006;13(6):412-418.
 24. Taira J, Nanbu H, Ueda K. Nitric oxide-scavenging compounds in *Agrimonia pilosa* Ledeb on LPS-induced RAW264.7 macrophages. Food Chemistry. 2009;115(4):1221-1227.
 25. Park YM, Won JH, Kim YH, Choi JW, Park HJ, Lee KT. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the methanol extract of *Inonotus obliquus*. J of ethnopharmacology. 2005;101(1-3):120.
 26. Babu A, Sujatha K, Valli A, Narayana K, Babu B, Satyanarayana P. Anticancer and anti-inflammatory activities of extracts of *Merremia emerginata*. Biosciences, Biotechnology Research Asia. 2009;6(2):835-838.
 27. Arunachalam K, Parimelazhagan T, Manian S. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Merremia tridentata* (L.) Hallier f. International J of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2011;3(1).
 28. Kamalutheen M, Gopalakrishnan S, Ismail TS. Anti-inflammatory and Anti-arthritic Activities of *Merremia tridentata* (L.) Hall. f. J of Chemistry. 2009;6(4):943-948.