



Trabajo Original

Obesidad y síndrome metabólico

Actividad antioxidante y antiinflamatoria *in vitro* de extractos de chaya (*Cnidoscopus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst)

In vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of chaya extracts (Cnidoscopus aconitifolius (Mill.) I.M. Johnst)

Ulil Us-Medina¹, María del Carmen Millán-Linares², Víctor Ermilo Arana-Argaes³ y Maira Rubi Segura-Campos¹

¹Facultad de Ingeniería Química, Campus de Ciencias Exactas e Ingenierías. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México. ²Unidad de Biología Celular. Instituto de la Grasa (CSIC). Campus de la Universidad Pablo de Olavide. Sevilla, España. ³Facultad de Química. Campus de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México

Resumen

Introducción: las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) son la principal causa de muerte en todo el mundo. Los metabolitos secundarios provenientes de fuentes vegetales como *Cnidoscopus aconitifolius* pueden usarse como coadyuvante en la prevención de las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo y la inflamación, tales como las ECNT.

Objetivo: se evaluó la actividad antioxidante y antiinflamatoria *in vitro* de los compuestos biológicamente activos de extractos de *C. aconitifolius*.

Métodos: se determinó el contenido de fenoles, flavonoides, flavanonas e hidrofalconoles. El potencial antioxidante se determinó con los ensayos de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) y la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE). Para la actividad antiinflamatoria se utilizaron la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real y el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) en macrófagos diferenciados de monocitos THP-1 y estimulados con lipopolisacárido (LPS).

Resultados: el extracto acuoso registró el mayor contenido de fenoles (70,61 ± 0,07 g/100 g de extracto) y el extracto etanólico registró el mayor contenido de flavonoides (47,76 ± 4,84 g/100 g de extracto), flavanonas y dihidrofalconoles (70,10 ± 7,29 g/100 g de extracto). El extracto acetónico registró la mayor inhibición del radical DPPH (49,85 ± 5,30 %) mientras que el etanólico presentó la mayor inhibición del radical ABTS (41,01 ± 3,81 %). Los extractos etanólico y acuoso inhibieron la ECA. El extracto etanólico tuvo la mayor actividad antiinflamatoria al reducir la expresión génica de TNF-α en un 39,78 % y la de IL-6 en un 97,81 %, y su producción en un 46 % y un 48,38 %, respectivamente.

Conclusiones: los extractos mostraron *in vitro* su potencial antioxidante y antiinflamatorio por su contenido en compuestos bioactivos.

Palabras clave:

C. aconitifolius.
Extractos.
Antioxidantes.
Antiinflamatorios.

Abstract

Introduction: noncommunicable diseases (NCDs) are the main cause of death worldwide. Secondary metabolites from plant sources such as *Cnidoscopus aconitifolius* may be used as adjuvants in the prevention of diseases related to oxidative stress and inflammation such as NCDs.

Objective: the *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities associated with biologically active compounds in *C. aconitifolius* extracts were evaluated.

Methods: the contents of phenols, flavonoids, flavanones and hydroflavonoles were determined. The potential antioxidant activity was determined with 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) assays, and angiotensin-converting enzyme (ACE) activity. For anti-inflammatory activity quantitative PCR and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests were used in macrophages derived from THP-1 monocytes and stimulated with LPS.

Results: the aqueous extract recorded the highest phenolic content (70.61 ± 0.07 g/100 g of extract), and the ethanolic extract registered the highest content in flavonoids (47.76 ± 4.84 g/100 g of extract), flavanones and dihydroflavonoles (70.10 ± 7.29 g/100 g of extract). The acetone extract obtained the highest DPPH inhibition (49.85 ± 5.30 %), while the ethanolic extract showed the highest ABTS inhibition (41.01 ± 3.81 %). The ethanolic and aqueous extracts had the highest ACE inhibition. The ethanolic extract had the highest anti-inflammatory activity, decreasing gene expression for TNF-α by 39.78 % and for IL-6 by 97.81 %, and their production by 46 % and 48.38 %, respectively, in macrophages stimulated with LPS.

Conclusions: these extracts demonstrated *in vitro* their antioxidant and anti-inflammatory potential due to their content of bioactive compounds.

Keywords:

C. aconitifolius.
Extracts. Antioxidant.
Anti-inflammatory.

Recibido: 20/06/2019 • Aceptado: 01/10/2019

Conflicto de intereses: no existen conflictos de interés.

Us-Medina U, Millán-Linares MC, Arana-Argaes VE, Segura-Campos MR. Actividad antioxidante y antiinflamatoria *in vitro* de extractos de chaya (*Cnidoscopus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst). Nutr Hosp 2020;37(1):46-55

DOI: <http://dx.doi.org/10.20960/nh.02752>

Correspondencia:

Maira Segura-Campos. Facultad de Ingeniería Química. Campus de Ciencias Exactas e Ingenierías. Universidad Autónoma de Yucatán. Periférico Nte. Km. 33.5; Tablaje Catastral 13615, Col. Chuburná de Hidalgo Inn. 97203 Mérida, Yucatán, México
e-mail: maira.segura@correo.uady.mx

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), como las enfermedades cardiovasculares, el cáncer y la diabetes, son la principal causa de muerte en todo el mundo. El binomio común que incrementa el desarrollo de algunas de las ECNT son la sobreproducción de radicales libres (RL) y la respuesta inflamatoria crónica (1). El aumento de los RL que no son neutralizados por los antioxidantes endógenos desencadena actividades biológicas importantes toda vez que dichos RL reaccionan con macromoléculas constituyentes de células y tejidos, como carbohidratos, lípidos, proteínas y ADN (2,3). Lo anterior provoca necrosis, diseminando residuos celulares en la sangre y produciendo más RL y, en consecuencia, la activación de la respuesta inflamatoria (4).

La inflamación es una respuesta inmunitaria natural durante las infecciones o las lesiones. Cuando la inflamación se mantiene durante un tiempo prolongado, se produce un aumento de las moléculas de adhesión, los RL y la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF- α) (5). Los monocitos forman parte del sistema inmune inespecífico, cuya función es la eliminación de desechos celulares, el reconocimiento de lo ajeno al organismo, la defensa inespecífica del mismo, la reparación e inflamación de los tejidos y el enlace con el sistema linfático más específico. En condiciones de normalidad, los monocitos pasarán de la médula ósea a la circulación sanguínea y de esta a los tejidos, donde se diferenciarán en macrófagos intersticiales. Los macrófagos pueden activarse clásicamente liberando citoquinas proinflamatorias y RL o, alternativamente, liberando moléculas antiinflamatorias como la IL-10 y participando funcionalmente en la reparación del tejido, el reconocimiento antigénico y la curación de heridas (6). Por lo tanto, la línea celular monocítica THP-1 representa un sistema modelo apropiado para el estudio de la respuesta inmune.

Compuestos tales como los flavonoides, fenoles, flavanonas y dihidroflavanonas provenientes de fuentes vegetales pueden disminuir los efectos del estrés oxidativo y de la inflamación crónica (7,8). En este sentido, *C. aconitifolius* (chaya) es una planta endémica de la península de Yucatán, México, cuyas hojas se consumen en platillos tradicionales y se usan también como tratamiento de enfermedades de origen inflamatorio (9,10). Estudios de los extractos de la hoja han demostrado una actividad similar a la indometacina en modelos de edema plantar y auricular (10,11). Sin embargo, no existen resultados sobre el efecto de dichos extractos sobre los biomarcadores de la inflamación como el TNF- α , la IL-6 y la IL-1 β . Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antioxidante y antiinflamatoria *in vitro* de los compuestos biológicamente activos de extractos de *C. aconitifolius*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las hojas de *C. aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst. se recolectaron en la Quinta los Achiotos, Timucuy, Yucatán, México. La identificación de la planta se llevó a cabo por el Dr. José Luis Tapia Muñoz en el herbario del Centro de Investigaciones del Estado

de Yucatán (CICY) con el número de folio 69489. Se utilizaron los reactivos de Folin-Ciocalteu, carbonato de sodio (NaCO₃), ácido gálico, nitrito de sodio (NaNO₂), hidróxido de sodio (NaOH), cloruro de aluminio hexahidratado (AlCl₃ · 6H₂O), catequina, 2,4-dinitrofenil hidracina, ácido sulfúrico (H₂SO₄), metanol, hidróxido de potasio (KOH), naringenina, ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS), acetato de sodio (CH₃COONa), ácido acético (CH₃COOH), peróxido de hidrogeno (H₂O₂), 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), etanol, enzima convertidora de la angiotensina (ACE), Tris-Base, cloruro de sodio (NaCl), amino-benzoilglicil-p-nitro-L-fenilalanil-L-prolina (Abz-Gly-Phe(NO₂)-Pro), bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), forbol-12 miristato 13-acetato (PMA) y dimetil sulfoxido (DMSO). Se utilizaron células de monocitos THP-1 (ATCC® Número TIB-202™). El kit de síntesis de ADNc "iScrip cDNA" se obtuvo de BIO-RAD (Hercules, CA, EE. UU.). El Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix se obtuvo de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EE. UU.). El Trisure se obtuvo de Bioline. Los cebadores se obtuvieron de Eurofins Biolab S.L.U (Barcelona, España). Los sets de TNF- α , IL-1 β e IL-6 humanos se obtuvieron de Diaclone (Diaclone, Besançon, Francia).

PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS DE *C. ACONITIFOLIUS*

Las hojas se secaron durante 24 h en un secador con flujo de aire caliente a una temperatura de 40 °C, y después se pulverizaron en un molino Cyclotec adaptando una malla de 0,5 mm. Seguidamente se efectuaron las extracciones sólido-líquido no secuencial en una proporción de 1:10 (p/v), a temperatura ambiente, con agua, etanol, acetona, acetato de etilo, éter dietílico y hexano por maceración durante 48 h. Los extractos se filtraron empleando papel de filtro N° 5 (11). Las soluciones filtradas se concentraron a presión reducida. Finalmente, se congelaron, liofilizaron y almacenaron a 4 °C protegidas de la luz hasta su posterior análisis.

ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DE EXTRACTOS DE *C. ACONITIFOLIUS* CON POTENCIAL ANTIOXIDANTE Y ANTIINFLAMATORIO

Fenoles totales

Los fenoles totales se determinaron siguiendo la metodología modificada de George et al. (12), utilizando Folin-Ciocalteu y ácido gálico como estándar. Brevemente, 100 μ L de muestra o estándar se mezclaron con 500 μ L de Folin (1:10) durante 2 min a temperatura ambiente. Seguidamente se añadieron 400 μ L de Na₂CO₃ (75 g/L) a una temperatura de 50 °C durante 15 min. Por último, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 760 nm. Los resultados se expresaron como promedios de tres datos independientes en

unidades de gramos de fenoles equivalentes a ácido gálico por cada 100 g de extracto liofilizado.

Flavonoides totales

Los flavonoides totales se determinaron con una modificación de la metodología reportada por Lee et al. (13), usando catequina como estándar. Para ello, 100 μL de muestra o estándar se mezclaron con 30 μL de NaNO_2 (5 % p/v) en 400 μL de agua destilada durante 5 min. Seguidamente se agregaron 30 μL de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, se dejó reaccionar durante 6 min y se añadieron 200 μL de NaOH (1M). Finalmente se añadieron 240 μL de agua destilada y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm. Los resultados se expresaron como gramos de flavonoides equivalentes a catequina por 100 g de extracto liofilizado.

Flavanonas y dihidroflavonoles

Las flavanonas y dihidroflavonoles se cuantificaron con método modificado de Popova et al. (14). Brevemente, 250 μL de extracto o estándar se mezclaron con 500 μL de 2,4-dinitrofenil-hidracina (1 g de 2,4-dinitrofenil-hidracina, 2 ml de H_2SO_4 al 96 % en 100 ml de metanol) a una temperatura de 50 $^\circ\text{C}$ durante 50 min. Seguidamente se enfriaron durante 10 min y se agregaron 2.5 mL de KOH en metanol al 10 % (p/v). Por último, se tomaron 200 μL de la mezcla, se añadió 1 mL de metanol y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 486 nm. Los resultados se expresaron como gramos de flavanonas y dihidroflavonoles equivalentes a naringenina por 100 g de extracto liofilizado.

EFECTO BIOLÓGICO *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS DE *C. ACONIFOLIUS*

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

ABTS

El método ABTS se basa en la capacidad de los antioxidantes de donar electrones y neutralizar los radicales $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (15). Previamente se liberó el radical con una mezcla de tampón de acetato 30 mM a pH de 3,6 durante 24 h; para ello se disolvieron 0,246 g de CH_3COONa en 100 ml de agua destilada (reactivo A); luego se tomaron 0,17 mL de CH_3COOH y se disolvieron en 100 mL de agua destilada (reactivo B). Seguidamente se mezclaron 7,5 mL de reactivo A en 92,5 mL de reactivo B y se ajustó el pH a 3,6. Posteriormente se preparó una solución de peróxido de hidrógeno tomando una alícuota de 27,8 μL y disolviéndola en tampón de acetato a pH de 3,6. El radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ se liberó al disolver 274.5 mg de ABTS en 50 ml de tampón con peróxido en condiciones de oscuridad y refrigeración durante 24 h. Posteriormente se preparó una solución tampón de acetato de sodio 0,4 M a pH de 5,8 y ácido acético; para ello se disolvieron 3,1 g de

CH_3COONa en 100 mL de agua destilada (reactivo C) y 2,28 mL de CH_3COOH en 100 mL de agua destilada (reactivo D), y posteriormente se mezclaron 94 mL de reactivo C con 6 mL de reactivo B, ajustando el pH a 5,8. Por último, se tomaron 200 μL de tampón de CH_3COONa a pH de 5,8 y se agregaron a cada pocillo de una placa de 96 pocillos 20 μL del extracto y 20 μL de $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Los resultados se expresaron como porcentajes de inhibición de los radicales $\text{ABTS}^{\bullet+}$ en tres repeticiones independientes.

$$\text{Inhibición del ABTS (\%)} = 100 * \frac{A_t - A_m}{A_t}$$

Donde:

A_t = absorbancia del ABTS en el tiempo cero

A_m = absorbancia de la muestra con ABTS después de 10 min de reacción.

DPPH

El método del DPPH se basa en la medición de la capacidad de los antioxidantes para reducir el radical DPPH $^{\bullet}$. Se agregaron 25 μL de muestra a cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se añadieron 175 μL de una solución de DPPH $^{\bullet}$ 63,4 μM (16). El decremento de la absorbancia del DPPH $^{\bullet}$ se detectó a una longitud de onda de 490 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de radicales libres de tres repeticiones independientes.

ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE LA ANGIOTENSINA

La actividad inhibitoria de la ECA se determinó en los extractos obtenidos de las hojas de *C. aconitifolius*. El análogo de la angiotensina I ($\text{Abz-Gly-Phe}(\text{NO}_2)\text{-Pro}$) es hidrolizado por la enzima ECA hasta un residuo fluorescente (o-aminobenzoilglicina (Abz-Gly)) que se detecta por medio de la fluorimetría (17). Previamente, se prepararon las muestras de los 6 extractos a las concentraciones de 150, 300, 450, 600, 750 y 900 $\mu\text{g/ml}$. La solución de enzima ECA se preparó con una solución de glicerol al 50 % en tampón Tris-base 300 mM y a pH de 8,3. Luego se disolvió en solución tampón Tris-base 150 mM y a pH de 8,3. El sustrato se preparó a una concentración 0,45 mM en solución tampón Tris-base 150 mM y a pH de 8,3 con 1,125 M de cloruro de sodio. Se mezclaron 40 μL de muestra con 40 μL de enzima y, posteriormente, se añadieron 160 μL de sustrato. Como blanco se utilizó agua. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la ECA en tres muestras independientes.

$$\text{inhibición (\%)} = 100 * \frac{(B_a - B_b) - (M_a - M_b)}{(B_a - B_b)}$$

Donde:

B_a = blanco con la enzima

B_b = blanco sin la enzima

M_a = muestra con la enzima

M_b = muestra sin la enzima.

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LOS EXTRACTOS DE *C. ACONITIFOLIUS* EN MONOCITOS THP-1

Cultivo celular y tratamientos

La línea celular monocítica humana THP-1 se cultivó en suspensión utilizando como medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 suplementado con un 1 % de penicilina/estrep-tomicina (P/S, v/v) y un 10 % de suero fetal bovino (SFB, v/v) inactivado por calor. Los monocitos se diferenciaron y polarizaron clásicamente en macrófagos M1 por incubación con PMA (100 nmol/L) durante 4 días. Las células THP-1 estimuladas con PMA (denominadas macrófagos derivados de THP-1) se expusieron al medio RPMI (suplementado con un 1 % de SFB, v/v) durante 24 h y después se trataron con los extractos acuosos y etanólicos elegidos a una concentración de 25, 50 y 100 µg/mL en medio RPMI (1 % de SFB, v/v) durante 24 h.

Ensayo de viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó en macrófagos derivados de monocitos THP-1 tratados con los extractos etanólicos y acuosos de *C. aconitifolius* mediante el ensayo de MTT. Para ello se diferenciaron 5×10^4 monocitos THP-1 en macrófagos con PMA (100 nM) durante 4 días. Luego, los macrófagos se incubaron a 37 °C con los extractos etanólicos y acuosos a una concentración final de 10, 25, 50, 100, 250 y 500 µg/mL durante 24 h. Seguidamente se añadieron 100 µL de MTT (5 mg/mL) en cada pocillo y se incubaron las células a 37 °C durante 3 h. Las células viables redujeron el MTT a cristales de formazán por efecto de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. Para detectar y cuantificar el formazán a una longitud de onda de 540 nm se eliminó el medio de los pocillos y se disolvió en DMSO (100 µL).

Extracción de mRNA y análisis mediante qPCR-RT

Los niveles de mRNA de los genes específicos se determinaron usando un sistema de PCR en tiempo real. El mRNA total se

extrajo de los macrófagos derivados de THP-1 usando el reactivo Trisure (Bioline, a Meridiam Life Science Company) según las instrucciones del fabricante. La calidad del mRNA se midió con la relación A_{260}/A_{280} determinada en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Madrid, España).

Se sometió 1 µg de mRNA a transcripción inversa para obtener el cDNA de acuerdo con el protocolo del fabricante del kit de síntesis de cDNA (BIO-RAD). Por cada reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (QPCR) se mezclaron 10 ng de cDNA de molde con Master Mix Brilliant SYBR Green QPCR, los oligonucleótidos de los genes que codifican el TNF- α , la IL-6 y la IL-1 β , y el gen de la hipoxantina-fosforribosil-transferasa (HPRT) usado como gen constitutivo (Tabla I). Las reacciones de amplificación se realizaron por triplicado. La cuantificación de los cambios de expresión del mRNA de los genes en estudio se calculó usando el método estándar. Los resultados de la expresión génica se normalizaron con el gen de referencia (HPRT).

Cuantificación de biomarcadores de la inflamación

Las concentraciones de citoquinas (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) en los sobrenadantes del cultivo celular se cuantificaron con el kit comercial (Diacclone®) del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de citoquinas se expresó en pg/mL y se calculó a partir de las curvas de calibración de la dilución en serie de estándares recombinantes humanos en cada ensayo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados del contenido total de fenoles se analizaron con un ANOVA de una sola vía y una prueba de Tukey *a posteriori*, con un nivel de significación de $p < 0,05$. Los resultados de la actividad antioxidante y antiinflamatoria se obtuvieron mediante un análisis de la varianza multifactorial. Para diferenciar las medias de los tratamientos entre la media del control se utilizó un análisis de Dunnett *a posteriori*, mientras que para la diferencia entre tratamientos se utilizó una prueba de Tukey *a posteriori* con un nivel de significación de $p < 0,05$. El análisis estadístico se llevó a cabo con el software Statgraphics Centurión XV.

Tabla I. Secuencias de cebadores de RT-PCR para el análisis de la expresión génica

Interleuquina	Sentido	Antisentido
TNF- α (NM_000594.3)	5'-TCCTTCAGACACCCTCAACC-3'	5'-AGGCCCCAGTTTGAATTCCT-3'
IL-6 (NM_001001928)	5'-GTTTGAGGGGGTAACAGCAA-3'	5'-GCTAACTGCAGAGGGTGAGG-3'
IL-1 β (NM_138712)	5'-GCTGTGCAGGAGATCACAGA-3'	5'-GGGCTCCATAAAGTCACCAA-3'
HPRT (NM_000194.2)	5'-ACCCACGAAGTGTGGATA-3'	5'-AAGCAGATGCCACAGAACT-3'

RESULTADOS

COMPOSICIÓN BIOACTIVA DE LOS EXTRACTOS DE *C. ACONITIFOLIUS* CON POTENCIAL ANTIOXIDANTE Y ANTIINFLAMATORIO

El contenido de fenoles de los extractos obtenidos por maceración con diferentes solventes se registró en un rango de $10,44 \pm 4,54$ a $70,61 \pm 0,07$ g/100 g de extracto en base seca para los extractos con éter dietílico y agua, respectivamente. Los resultados presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el extracto acuoso, el etanólico y el grupo homogéneo (acetónico, acetato de etilo, éter dietílico y hexano). El contenido de flavonoides fue de $4,45 \pm 0,47$ a $47,76 \pm 4,84$ g/100 g de extracto obtenido con agua y etanol, respectivamente. Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el extracto acuoso, el etanólico y el acetónico. En los extractos obtenidos con acetato de etilo, éter dietílico y hexano no se detectaron flavonoides. El contenido de flavanonas y dihidroflavonoles en los extractos se registró entre $52,79 \pm 4,21$ y $70,10 \pm 7,29$ g/100 g de extracto obtenido con hexano y etanol, respectivamente (Tabla II). Los resultados presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el etanol, el grupo homogéneo conformado por acetona, acetato de etilo y éter dietílico y el grupo homogéneo conformado por agua y hexano.

Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos de *C. aconitifolius*

Los extractos de *C. aconitifolius* registraron actividad antioxidante a las concentraciones de 150 a 900 $\mu\text{g/mL}$, según lo determinado por el ensayo DPPH. La máxima actividad antioxidante se obtuvo con el extracto de acetona, con un $49,85 \pm 5,3$ % de inhibición. En el análisis de la varianza multifactorial se encontraron evidencias de una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en la interacción de los extractos con las concentraciones evaluadas (Fig. 1A).

La capacidad antioxidante de los extractos de *C. aconitifolius*, determinada por el ensayo ABTS, mostró una relación dosis-dependencia con respecto a las concentraciones evaluadas; la máxima actividad antioxidante se obtuvo con el extracto etanólico, con un $41,02 \pm 3,18$ % de inhibición. En el análisis de la varianza multifactorial se encontró evidencia de una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en la interacción de los extractos con las concentraciones evaluadas (Fig. 1B).

Los extractos de *C. aconitifolius* tuvieron efecto sobre la actividad de la ECA en un rango de concentración de 150 a 900 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 2). Los resultados mostraron inhibiciones del $16,22 \pm 0,29$ % y $72,79 \pm 4,36$ % para los extractos acetónicos y acuosos, respectivamente. Así, los valores de concentración mínima inhibitoria del 50 % (IC_{50}) de dichos extractos se encontraron en un

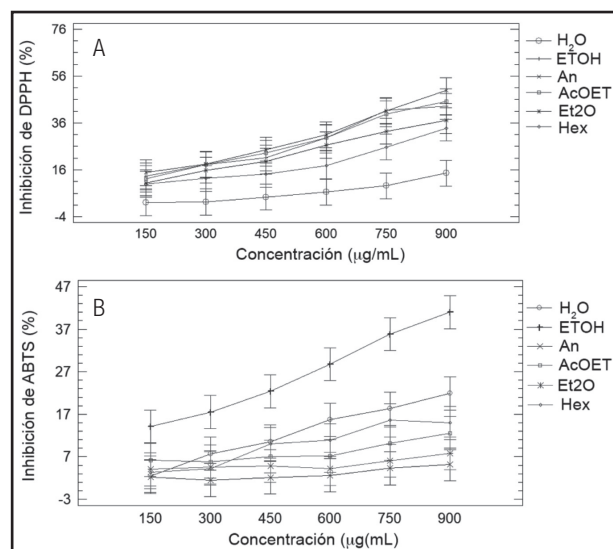


Figura 1.

Interacción de los extractos [(agua (H_2O), etanol (EtOH), acetona (An), acetato de etilo (AcOET), éter dietílico (Et2O) y hexano (Hex)] con las concentraciones (150 a 900 $\mu\text{g/mL}$) mediante intervalos Tukey, $p < 0,05$. a) Efecto de los extractos en la inhibición de los radicales DPPH; b) Efecto de los extractos en la inhibición de los radicales ABTS.

Tabla II. Contenido de fenoles, flavonoides, flavanonas y dihidroflavonoles en los extractos de hojas de *C. aconitifolius* (g/100 g de extracto liofilizado)

Extracto	Fenoles	Flavonoides	Flavanonas y dihidroflavonoles
Agua	$70,61 \pm 0,07^a$	$4,45 \pm 0,47^b$	$55,70 \pm 6,54^{ab}$
Etanol	$35,13 \pm 1,59^b$	$47,76 \pm 4,84^a$	$70,10 \pm 7,29^a$
Acetona	$19,75 \pm 1,11^c$	$37,25 \pm 6,49^a$	$65,17 \pm 3,89^{ab}$
Acetato de etilo	$14,93 \pm 3,23^c$	ND	$66,32 \pm 4,54^{ab}$
Éter dietílico	$10,44 \pm 4,54^c$	ND	$68,84 \pm 7,13^a$
Hexano	$13,98 \pm 8,82^c$	ND	$52,79 \pm 4,21^b$

Medias de tres datos independientes. Las letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) obtenidas con un post-hoc de Tukey. ND: no detectado.

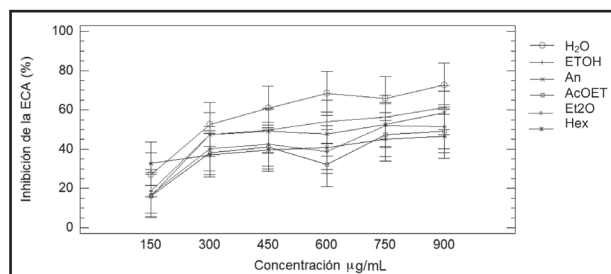


Figura 2.

Efectos de los extractos [(agua (H₂O), etanol (ETOH), acetona (An), acetato de etilo (AcOET), éter dietílico (Et₂O) y hexano (Hex)] en la actividad de la ECA. La interacción con las concentraciones (150 a 900 µg/ml) se determinó mediante intervalos Tukey, $p < 0,05$.

rango situado entre 375,18 y 850,67 µg/mL, correspondientes al extracto acuoso y hexánico, respectivamente. Los resultados mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en la interacción de los extractos con las concentraciones probadas, siendo el extracto acuoso el que registró la mayor actividad biológica.

Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos de *C. aconitifolius* sobre los macrófagos THP-1

La viabilidad celular de los macrófagos diferenciados de monocitos THP-1 tratados con los extractos acuosos y etanólicos mostró una diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) entre los extractos y las concentraciones evaluadas (Fig. 3). El extracto

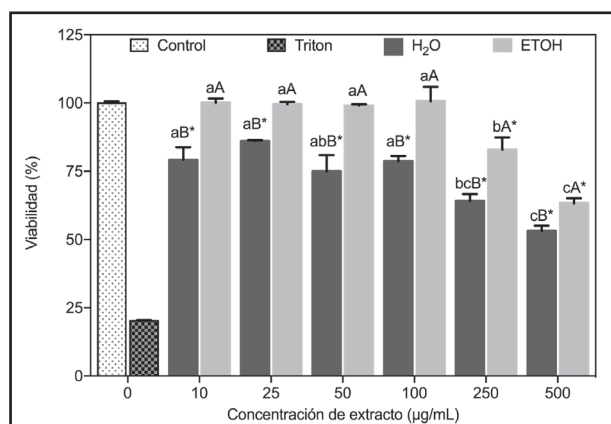


Figura 3.

Efecto del extracto acuoso (H₂O) y etanólico (ETOH) de *C. aconitifolius* en la viabilidad de los macrófagos derivados de monocitos THP-1. El *** indica diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos y el control, determinado con el estadístico de Dunnett. Las letras minúsculas indican diferencias estadísticas entre las concentraciones de un mismo extracto y las letras mayúsculas indican diferencias estadísticas entre los extractos ($p < 0,05$) con la prueba de múltiples rangos de Tukey.

acuoso mostró una viabilidad celular menor del 80 % a excepción de la obtenida a las concentraciones más bajas de 10 y 25 µg/mL, registrándose una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos con una $p < 0,05$. Por otro lado, los porcentajes de viabilidad celular obtenidos en el extracto etanólico fueron superiores a los registrados con el extracto acuoso, llegando a ser superiores en la mayoría de los casos al 90 % excepto a 500 µg/mL, donde la viabilidad parece que desciende ligeramente a valores inferiores al 75 %. A este respecto, los valores más bajos de viabilidad celular del extracto acuoso podrían atribuirse a la presencia de compuestos citotóxicos tales como el copaeno y el ácido cianhídrico (HCN), este último de mayor solubilidad en agua (7).

Las células tratadas con los extractos etanólicos y acuosos presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la expresión de los genes que codifican las interleucinas. Asimismo, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los extractos a las concentraciones evaluadas (25, 50 y 100 µg/mL) (Fig. 4). Las células tratadas con el extracto acuoso fueron las que registraron la mayor expresión del mRNA que codifica el TNF- α con respecto a las células estimuladas con LPS. El extracto etanólico presentó una disminución significativa de la expresión de mRNA, con relación dosis-respuesta, alcanzándose una disminución de más de un 40 % con respecto a la expresión de las células estimuladas (Fig. 4A). Las células tratadas con los extractos acuosos parecen inducir la represión génica de IL-1 β , aunque no lo hicieron de forma significativa. El extracto etanólico obtuvo una disminución significativa de la expresión génica, existiendo una relación concentración-respuesta, que llegó al 73,71 % con la concentración de 100 µg/ml (Fig. 4B). La expresión del mRNA que codifica la IL-6 se redujo significativamente tanto para el extracto acuoso como para el etanólico, encontrándose también una diferencia estadísticamente significativa entre las distintas concentraciones del estudio (Fig. 4C). Las células tratadas con el extracto acuoso redujeron hasta un 83,92 % la expresión génica de la IL-6 con respecto a las células tratadas con LPS. Por otro lado, las células tratadas con 100 µg/mL de extracto etanólico redujeron en más de un 97 % la expresión de IL-6 con respecto a las células tratadas con LPS.

Las células tratadas con extractos acuosos y etanólicos de *C. aconitifolius* registraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la concentración de citoquinas proinflamatorias liberadas en comparación con las células tratadas con LPS. Además se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre los tratamientos a las diferentes concentraciones evaluadas. Ambos extractos redujeron significativamente el TNF- α (Fig. 5A). El extracto acuoso mostró una disminución del 48 % a una concentración de 100 g/mL, mientras que el extracto etanólico registró una disminución del 46 % a la misma concentración. Respecto a la IL-1 β , las células tratadas con extractos acuosos de *C. aconitifolius* registraron una concentración de dicha interleucina mayor que la de las células tratadas con LPS (Fig. 5B). Sin embargo, las células tratadas con el extracto etanólico no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con respecto a las tratadas con LPS a todas las concentraciones

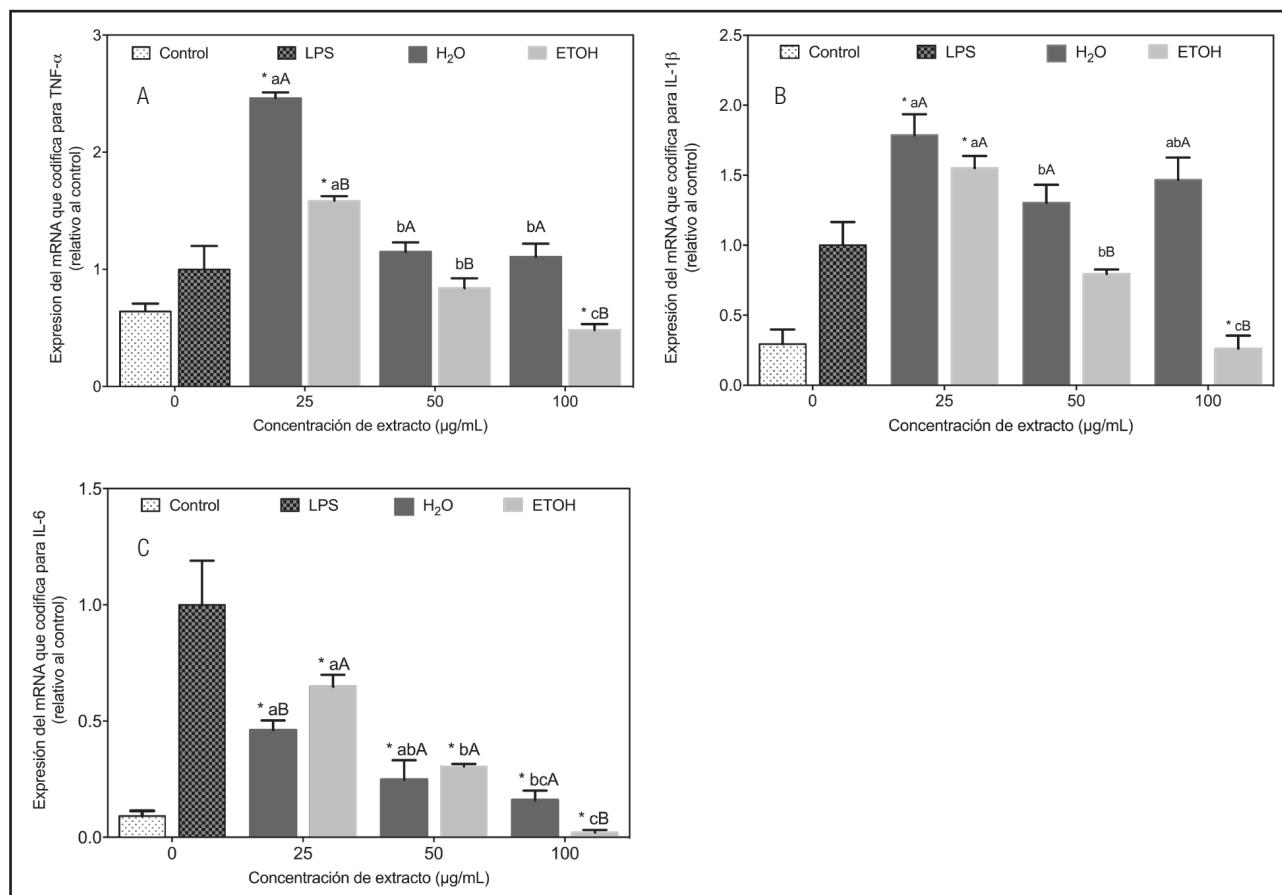


Figura 4.

Efecto del extracto acuoso (H₂O) y etanólico (ETOH) de *C. aconitifolius* en la expresión de mRNA. A. TNF- α ; B. IL-1 β ; C. IL-6. El "*" indica diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos y el control, determinado con el estadístico de Dunnett. Las letras minúsculas indican diferencias estadísticas entre las concentraciones de un mismo extracto y las letras mayúsculas indican diferencias estadísticas entre los extractos ($p < 0,05$) con la prueba de múltiples rangos de Tukey.

del estudio. En lo referente a la IL-6, el extracto etanólico registró porcentajes de disminución de hasta un 48,38 % con respecto al LPS, mientras que el extracto acuoso no mostró diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) con respecto a las células tratadas con LPS (Fig. 5C).

DISCUSIÓN

El contenido de fenoles, flavonoides, flavanonas y dihidroflavonoles en los vegetales contribuye a las propiedades medicinales de estos, debido a su capacidad antioxidante y reductora del estrés oxidativo implicado en diversas patologías de origen inflamatorio (18). Dichos compuestos polifenólicos están constituidos por uno o más anillos aromáticos con uno o más grupos OH; de estos grupos OH se pueden neutralizar los radicales libres por transferencia de electrones o por hidrógenos (19). Por otro lado, los terpenoides como el caroteno, la amirina y la moretenona pueden tener grupos OH y dobles enlaces capaces de neutralizar los radicales libres (20).

La inhibición del radical DPPH registrada en este estudio fue mayor que la reportada con extractos de tallos de *C. aconitifolius* (15,39 %) a una concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (21). En otro estudio realizado sobre extractos metanólicos de las hojas, a una concentración de 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se reportó una actividad antioxidante del 45,5 % y 94 % de inhibición del radical DPPH y ABTS, respectivamente (16). La evaluación de la actividad antioxidante del extracto acuoso de hojas frescas de *C. aconitifolius* registró un 50 % de inhibición del DPPH (22). Por otra parte, en el estudio de la actividad antioxidante de los extractos de *C. aconitifolius* obtenidos con etanol, acetato de etilo y hexano en las partes aéreas, estos inhibieron el 55 % de los radicales DPPH a una concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (23). Lo anterior pone de manifiesto que las diferencias de actividad pueden atribuirse a factores tales como el origen de la materia prima, la estación del año en que se recolecta, el contenido de metabolitos secundarios, etc.

La ECA es una metalopeptidasa que contiene zinc en su sitio activo y convierte el decapeptido antiotensina I en un octapeptido denominado angiotensina II en el sistema renina-angiotensina-aldosterona (24). Dicho octapeptido aumenta la presión arterial y

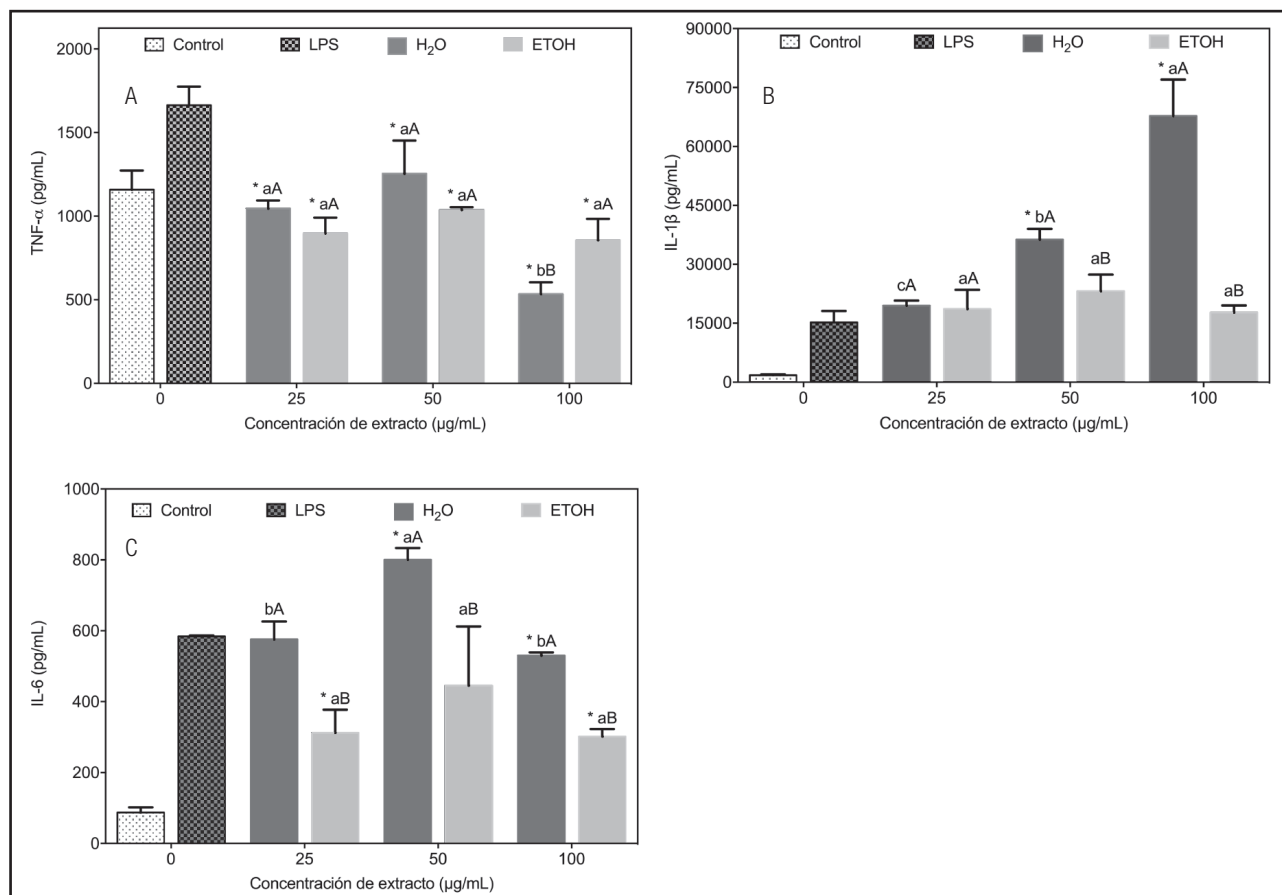


Figura 5.

Efecto del extracto acuoso (H₂O) y etanólico (ETOH) de *C. aconitifolius* en la producción de citoquinas. A. TNF- α ; B. IL-1 β ; C. IL-6. El “*” indica diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos y el control, determinado con el estadístico de Dunnett. Las letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticas entre las concentraciones de un mismo extracto y las letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticas entre los extractos ($p < 0,05$) con la prueba de múltiples rangos de Tukey.

promueve la retención de sodio y agua en el cuerpo (4,25,26). Los extractos de *C. aconitifolius* inhibieron la actividad de dicha enzima de una manera similar a la reportada con extractos obtenidos de la planta *Ipomoea reniformis* (IC₅₀ de 422 μ g/mL); esto puede atribuirse a la capacidad quelante de los grupos hidroxilos de los fenoles presentes en los extractos (25,27). Por otra parte, diversos estudios ponen de manifiesto que los compuestos terpenoides presentes en los extractos no polares de hojas de chaya pueden inhibir la actividad de la ECA (28). A este respecto, los compuestos fenólicos y terpenoides obtenidos de fuentes vegetales inhiben de forma competitiva la actividad de la ECA (27).

Estudios realizados por Velásquez y cols. (29) determinaron el efecto citotóxico de los extractos acuosos y etanólicos de hojas de *C. aconitifolius* en larvas de *Artemia salina*, y observaron que no hubo efecto citotóxico al no superarse la dosis letal media (DL₅₀) a una concentración de 1000 μ g/mL. Así, el efecto citotóxico del extracto acuoso de *C. aconitifolius* del presente estudio podría deberse a remanentes de ácido cianogénico durante el proceso de secado de las hojas, ya que las mismas pueden contener, incluso

después de dicho procesamiento, hasta 4,25 mg de HCN/100 g de hoja seca. En este sentido, la FDA establece que es a partir de la ingestión de cantidades iguales o mayores de 20 mg/100 g de hoja seca cuando se pueden registrar efectos tóxicos en los seres humanos (30).

La disminución de la expresión de los genes que codifican el TNF- α , la IL-1 β y la IL-6 es un factor clave en la reducción de la síntesis y liberación de citoquinas. Diversos autores han reportado que moléculas tales como eupafolina, hispidulina, β -amirina, acetato de β -amirina, moretenona, acetato de lupeol, cariofileno y campesterol tienen actividad antiinflamatoria al disminuir la expresión de los genes que codifican el TNF- α , la IL-1 β y la IL-6 (31-33). De la misma manera se ha reportado un efecto sobre la síntesis y liberación de dichas citoquinas. Los polifenoles y esteroides inhiben la actividad del heterodímero NF- κ B (34). El NF- κ B está constituido por las proteínas p53 y p65, y se ubica en el citosol formando un complejo con la proteína I κ B en su forma inactiva; en su forma activa, los homodímeros se traslocan al núcleo y se unen a los promotores de los genes proinflamatorios (35).

Los polifenoles y los esteroides evitan la fosforilación del I κ B, así como la traslocación del NF- κ B al núcleo, evitando la transcripción del mRNA que codifica el TNF- α , la IL-1 β , IL-6 y la IL-10 (18,32). Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente, dejando de manifiesto que las células reducen la síntesis de TNF- α e IL-6 a medida que disminuye la expresión génica. Sin embargo, diversos autores ponen de manifiesto que, durante la generación de citoquinas en el marco del proceso inflamatorio, la IL-1 β responde a la liberación de TNF- α (36). Lo anterior podría explicar la razón por la que la represión génica de la IL-1 β no ha podido visualizarse en el extracto acuoso. Sin embargo, el extracto etanólico muestra una disminución de la expresión génica de IL-1 β a partir de 50 μ g/mL. En extractos de *C. aconitifolius* se ha reportado la presencia de eupafolina, hispidulina, β -amirina, acetato de β -amirina, moretenona, acetato de lupeol, cariofileno y campesterol, compuestos a los que podría atribuirse la actividad antiinflamatoria registrada en el presente estudio (10,37).

CONCLUSIONES

Los extractos de *C. aconitifolius* presentaron actividad antioxidante al disminuir los radicales DPPH y ABTS. Los extractos etanólicos y acuosos registraron efectos antiinflamatorios al disminuir la expresión génica de las citoquinas, siendo el extracto etanólico el que presentó la mayor represión de los genes que codifican el TNF- α (40 %), la IL-6 (97 %) y la IL-1 β (73,71 %). Por lo tanto, la disminución de la transcripción de los genes que codifican estas citoquinas redujo la producción y liberación de citoquinas proinflamatorias gracias a la presencia de los compuestos bioactivos de los extractos. Así, los resultados sugieren que los extractos de *C. aconitifolius* pueden utilizarse como coadyuvantes en el tratamiento de las enfermedades de origen antiinflamatorio.

BIBLIOGRAFÍA

- Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes CJ, Valko M. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. Vol. 38, Trends in Pharmacological Sciences; 2017. p. 592-607. DOI: 10.1016/j.tips.2017.04.005
- Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. Saudi Pharm J 2016;24(5):547-53. DOI: 10.1016/j.jps.2015.03.013
- Huang YJ, Nan GX. Oxidative stress-induced angiogenesis. J Clin Neurosci 2019;63:13-6. DOI: 10.1016/j.jocn.2019.02.019
- Irondi E, Agboola S, Oboh G, Boligon A, Athayde M, Shode F. Guava leaves polyphenols-rich extract inhibits vital enzymes implicated in gout and hypertension in vitro. J Intercult Ethnopharmacol 2016;5(2):122. DOI: 10.5455/jice.20160321115402
- Du L, Li J, Zhang X, Wang L, Zhang W, Yang M, et al. Pomegranate peel polyphenols inhibits inflammation in LPS-induced RAW264.7 macrophages via the suppression of TLR4/NF- κ B pathway activation. Food Nutr Res 2019;63(3):3392.
- Chen X, Lu PH, Liu L, Fang ZM, Duan W, Liu ZL, et al. TIGIT negatively regulates inflammation by altering macrophage phenotype. Immunobiology 2016;221(1):48-55. DOI: 10.1016/j.imbio.2015.08.003
- Otitolaiye CA, Asokan C. GC-MS Analysis of *Cnidoscopus aconitifolius* Leaf Aqueous Extracts. Int J Sci Res 2016;6(7):8376-81.
- Sunday A, Sunday Dele O, Olayemi A. Investigation on the medicinal and nutritional potentials of some vegetables consumed in Ekiti state, Nigeria. Int Res J Nat Sci 2016;3(1):16-30.
- Pérez-González MZ, Gutiérrez-Rebolledo GA, Yépez-Mulia L, Rojas-Tomé IS, Luna-Herrera J, Jiménez-Arellanes MA. Antiprotozoal, antimycobacterial, and anti-inflammatory evaluation of *Cnidoscopus chayamansa* (Mc Vaugh) extract and the isolated compounds. Biomed Pharmacother 2017;89:89-97. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.02.021
- Pérez-González MZ, Siordia-Reyes AG, Damián-Nava P, Hernández-Ortega S, Macías-Rubalcava ML, Jiménez-Arellanes MA. Hepatoprotective and Anti-inflammatory Activities of the *Cnidoscopus chayamansa* (Mc Vaugh) Leaf Extract in Chronic Models. Evidence-Based Complement Altern Med 2018;2018:1-12. DOI: 10.1155/2018/3896517
- García-Rodríguez RV, Gutiérrez-Rebolledo GA, Méndez-Bolaina E, Sánchez-Medina A, Maldonado-Saavedra O, Domínguez-Ortiz MÁ, et al. *Cnidoscopus chayamansa* Mc Vaugh, an important antioxidant, anti-inflammatory and cardioprotective plant used in Mexico. J Ethnopharmacol 2014;151(2):937-43. DOI: 10.1016/j.jep.2013.12.004
- Georgé S, Brat P, Alter P, Amiot MJ. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. J Agric Food Chem 2005;53(5):1370-3. DOI: 10.1021/jf048396b
- Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. J Agric Food Chem 2003;51(25):7292-5. DOI: 10.1021/jf0344385
- Popova M, Silici S, Kaftanoglu O, Bankova V. Antibacterial activity of Turkish populus and its qualitative and quantitative chemical composition. Phytomedicine 2005;12(3):221-8. DOI: 10.1016/j.phymed.2003.09.007
- Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Kloting N, Birringer M, Kiehntopf M, et al. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. Proc Natl Acad Sci 2009;106(21):8665-70. DOI: 10.1073/pnas.0903485106
- Loarca-Piña G, Mendoza S, Ramos-Gómez M, Reynoso R. Antioxidant, Antimutagenic, and Antidiabetic Activities of Edible Leaves from *Cnidoscopus chayamansa* Mc. Vaugh. J Food Sci 2010;75(2):H68-72. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2009.01505.x
- Ángel Sentandreu M, Toldrá F. A fluorescence-based protocol for quantifying angiotensin-converting enzyme activity. Nat Protoc 2006;1(5):2423-7. DOI: 10.1038/nprot.2006.349
- Zhu F, Du B, Xu B. Anti-inflammatory effects of phytochemicals from fruits, vegetables, and food legumes: A review. Crit Rev Food Sci Nutr 2018;58(8):1260-70. DOI: 10.1080/10408398.2016.1251390
- Pelle F Della, Compagnone D. Nanomaterial-Based Sensing and Biosensing of Phenolic Compounds and Related Antioxidant Capacity in Food. Sensors 2018;18(2):462. DOI: 10.3390/s18020462
- Latief U, Husain H, Ahmad R. β -Carotene supplementation ameliorates experimental liver fibrogenesis via restoring antioxidant status and hepatic stellate cells activity. J Funct Foods 2018;49(5):168-80. DOI: 10.1016/j.jff.2018.08.027
- Adeniran OI, Olajide OO, Igwemmar NC, Orishadipe AT. Phytochemical constituents , antimicrobial and antioxidant potentials of tree spinach [*Cnidoscopus aconitifolius* (Miller) I . M . Johnston]. J Med plants Res 2013;7(19):1317-22.
- Adefegha SA, Oboh G. Enhancement of total phenolics and antioxidant properties of some tropical green leafy vegetables by steam cooking. J Food Process Preserv 2011;35(5):615-22. DOI: 10.1111/j.1745-4549.2010.00509.x
- Hamid AA, Oguntoye SO, Negi AS, Ajao A, Owolabi NO. Chemical constituents, antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the aerial parts of *Cnidoscopus aconitifolius*. IFE J Sci 2016;18(2):561-71.
- Paiva L, Lima E, Neto AI, Baptista J. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity, antioxidant properties, phenolic content and amino acid profiles of fucus spiralis L. Protein hydrolysate fractions. Mar Drugs 2017;15(10):1DUMMY. DOI: 10.3390/md15100311
- Jabeen Q, Aslam N. Hypotensive, angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory and diuretic activities of the aqueous-methanol extract of *Ipomoea reniformis*. Iran J Pharm Res 2013;12(4):769-76.
- Vargas-León EA, Díaz-Batalla L, González-Cruz L, Bernardino-Nicanor A, Castro-Rosas J, Reynoso-Camacho R, et al. Effects of acid hydrolysis on the free radical scavenging capacity and inhibitory activity of the angiotensin converting enzyme of phenolic compounds of two varieties of jamaica (*Hibiscus sabdariffa*). Ind Crops Prod 2018;116:201-8. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.02.044
- Komolafe K, Akinmoladun AC, Komolafe TR, Olalaye MT, Boligon AA, Akindahunsi AA, et al. Angiotensin-1-converting enzyme inhibition, antioxidant activity, and modulation of cerebral Na⁺/K⁺ ATPase by free phenolics of African locust bean (*Parkia biglobosa*). Heal Sci Reports 2018;1(1):e17. DOI: 10.1002/hsr2.17
- Roy D, Ferdiousi N, Khatun T, Moral M. Phytochemical screening, nutritional profile and anti-diabetic effect of ethanolic leaf extract of *Cnidoscopus aco-*

- nitifolius in streptozotocin induce diabetic mice. *Int J Basic Clin Pharmacol* 2016;5(5):2244-50. DOI: 10.18203/2319-2003.ijbcp20163269
29. Velásquez M, González N, Arzave R. Utilización de un método in vitro para evaluar la toxicidad de chaya, una planta nutritiva utilizada en medicina tradicional para la disminución del colesterol. 2016;1(1):546-50.
 30. González-Laredo RF, Flores De La Hoya ME, Quintero-Ramos MJ, Karchesy JJ. Flavonoid and cyanogenic contents of chaya (spinach tree). *Plant Foods Hum Nutr* 2003;58(3):1-8. DOI: 10.1023/B:QUAL.0000041142.48726.07
 31. Khajuria V, Gupta S, Sharma N, Tiwari H, Bhardwaj S, Dutt P, et al. Kaempferol-3-o- β -d-glucuronate exhibit potential anti-inflammatory effect in LPS stimulated RAW 264.7 cells and mice model. *Int Immunopharmacol* 2018;57(1):62-71. DOI: 10.1016/j.intimp.2018.01.041
 32. Askari VR, Fereydouni N, Baradaran Rahimi V, Askari N, Sahebkar AH, Rahmani-Devin P, et al. β -Amyrin, the cannabinoid receptors agonist, abrogates mice brain microglial cells inflammation induced by lipopolysaccharide/interferon- γ and regulates M ϕ 1/M ϕ 2 balances. *Biomed Pharmacother* 2018;101(2):438-46. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.02.098
 33. Park J, Yoo H, Kim C, Shim S-Y, Lee M. Hispidulin-7-O-neohesperidoside from *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* attenuates the production of inflammatory mediators in LPS-induced raw 264.7 cells and HT-29 cells. *Pharmacogn Mag* 2017;13(52):707.
 34. Chen CC, Lin MW, Liang CJ, Wang SH. The anti-inflammatory effects and mechanisms of eupafolin in lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW264.7 Macrophages. *PLoS One* 2016;11(7):1-15.
 35. Chen L, Teng H, Xie Z, Cao H, Cheang WS, Skalicka-Woniak K, et al. M improved bioactivity: An update on structure-activity relationship modifications of dietary flavonoids towards. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2018;58(4):513-27. DOI: 10.1080/10408398.2016.1196334
 36. Yokose K, Sato S, Asano T, Yashiro M, Kobayashi H, Watanabe H, et al. TNF- α potentiates uric acid-induced interleukin-1 β (IL-1 β) secretion in human neutrophils. *Mod Rheumatol* 2018;28(3):513-7. DOI: 10.1080/14397595.2017.1369924
 37. Iwuji S, Nwafor A. Phytochemical Identification in the Chloroform Fraction of Aqueous-Methanol Extract of *Cnidioscolus aconitifolius* Leaves. *Br J Pharm Res* 2015;5(6):437-41. DOI: 10.9734/BJPR/2015/13264