

Efecto antiinflamatorio *in vitro* de los extractos etanólicos de cuatro plantas medicinales peruanas

Flor de María Acostupa^{1a}, Alexander Chávez, Samy E Mejía^{1b}, Mario M Pauta^{1b}, José L Tucunango^{1a}.

Información del artículo

Historia del artículo
 Recibido: 17/05/2017
 Aprobado: 17/07/2017

Autor corresponsal
 Mario Pauta Gálvez.
 Av. Arnaldo Márquez 973 Jesús María.
 981845759 / 4314651.
 mmpauta11@gmail.com

Fuentes de financiamiento
 Autofinanciado

Contribución de autores
 FMA y MMP conceptualizaron y redactaron el manuscrito, FMA colectó los datos e hizo revisión crítica, MMP procesó, analizó e interpretó los datos, SEM, AC y JLT hicieron revisión crítica, aportaron en procedimientos metodológicos y diseño del manuscrito. Todos aprobaron la versión final.

Conflictos de interés
 los autores declaran no tener conflictos de interés.

Citar como
 Acostupa FdM; Chávez A; Mejía SE; Pauta MM; Tucunango JL. Efecto antiinflamatorio *in vitro* de los extractos etanólicos de cuatro plantas medicinales peruanas. Rev Peru Med Integrativa.2017;2(2):79-85.

Resumen

Objetivo. Determinar la actividad antiinflamatoria *in vitro* de los extractos etanólicos de *Croton lechleri*, *Chenopodium ambrosioides* L., *Peperomia congona* Sodiro y *Perezia coeruleascens*, mediante el método de estabilización de la membrana de glóbulos rojos. **Materiales y métodos.** Se emplearon muestras de sangre humana, donde se evaluaron cuatro diluciones seriadas, 200, 100, 50 y 10 µg/mL de los diferentes extractos, usando una solución isosalina (0,85%, pH 7,2) como medio de dilución, y como fármaco de referencia dexametasona (200 µg/mL). Se determinaron los porcentajes de hemólisis y protección de la membrana del glóbulo rojo. **Resultados.** Se encontraron diferencias significativas entre los promedios de porcentajes de protección y las concentraciones en el caso de *Ch. ambrosioides* L (p<0,001), *P. coeruleascens* (p<0,001) y *C. lechleri* (p<0,001). Se encontró correlación lineal entre los porcentajes de protección y la concentración en el caso de *Ch. ambrosioides* L (R²= 0,795; p<0,001), *C. lechleri* (R²= 0,631; p<0,001) y *P. coeruleascens* (R²= 0,899; p<0,001). Los extractos de *C. lechleri* a 100 y 200 µg/mL; y el extracto de *P. coeruleascens* a 200 µg/mL no presentaron diferencias significativas en sus porcentajes de protección en comparación al uso de dexametasona 200 µg/mL (p>0,05) **Conclusión.** Los extractos etanólicos de *P. coeruleascens*, *Ch. ambrosioides* L y *C. lechleri*, presentan actividad antiinflamatoria mediante la inhibición de la lisis de la membrana celular en glóbulos rojos. En el caso del extracto de *C. lechleri* a 100 y 200 µg/mL, así como el extracto de *Ch. ambrosioides* L a una concentración de 200 µg/mL, mostraron un desempeño similar al fármaco de referencia (dexametasona).

Palabras clave: Extractos Vegetales, Técnicas In vitro, Eritrocitos, Antiinflamatorios, Terapéutica. (fuente: DeCS BIREME)

In Vitro Anti-Inflammatory Effect Of Four Peruvian Medicinal Herbs Ethanolic Extracts

ABSTRACT

Objective. To determine *in vitro* anti-inflammatory activity of *Croton lechleri*, *Chenopodium ambrosioides* L., *Peperomia congona* Sodiro, and *Perezia coeruleascens* ethanolic extracts, by stabilization method of red blood cells membrane. **Materials and methods.** Human blood samples were used and was evaluated in four serial dilutions, 200 100, 50, and 10 µg/mL of the different extracts, using an isosaline solution (0.85%, pH 7.2) as dilution medium and dexamethasone as reference drug (200 µg/mL). **Results.** The extracts of *Croton lechleri* and *Chenopodium ambrosioides* L., showed the highest protection (43.2 ± 0.9%) and (41.8 ± 2.2%), and a lower hemolysis percentage (56.8 ± 0.9% and 58.2 ± 2.2%, respectively) at a concentration of 200 µg/mL. **Conclusion.** The ethanolic extracts of the evaluated plants have an anti-inflammatory effect *in vitro* by the method of stabilization of the red blood cell membrane and its effect is dependent on its concentration.

Keywords: Plant Extracts, In Vitro Techniques, Erythrocytes, Anti-inflammatory Agents, Therapeutics. (source: MeSH NLM).

¹ Centro de Investigación Farmacológica, Facultad de Medicina Humana. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú
^a Químico farmacéutico.
^b Médico veterinario.

Introducción

La inflamación es una respuesta biológica compleja de los tejidos vasculares a los estímulos nocivos y también una parte de la respuesta inmune no específica que se produce en la reacción a cualquier tipo de lesiones corporales. También es un intento de un organismo para eliminar los estímulos perjudiciales e iniciar el proceso de curación⁽¹⁾. El proceso de inflamación se inicia con la activación y liberación de diferentes tipos de mediadores, tales como: histamina, serotonina, sustancias de reacción lenta de la anafilaxis (SRS-A), prostaglandinas, algunos sistemas enzimáticos plasmáticos y el sistema de cinina⁽²⁾.

El dolor e inflamación representan síntomas y signos muy frecuentes en numerosas enfermedades, lo que conlleva al aumento del consumo de fármacos analgésicos, como antiinflamatorios no esteroideos (AINE) o esteroideos (AIE), con los consecuentes efectos adversos⁽³⁾. El tratamiento clínico del dolor crónico por antiinflamatorios no esteroideos (AINE), esteroides, antidepresivos, antiepilépticos, y/o medicamentos opioides, sigue siendo insatisfactorio en la mayoría de los casos, y es un reto para los médicos e investigadores que se han comprometido a buscar nuevos analgésicos con gran potencia analgésica, con nulos efectos secundarios o que sean relativamente menores⁽⁴⁾.

El tratamiento con plantas medicinales, utilizado desde tiempos ancestrales, es una alternativa para el alivio de estos síntomas⁽⁵⁾. Algunas plantas medicinales han demostrado ser útiles para el tratamiento de muchas enfermedades inflamatorias y, generalmente, están desprovistas de efectos adversos graves⁽⁶⁾. Dentro de los mecanismos de acción estudiados, se han demostrado efectos inhibitorios sobre enzimas como la COX-1, COX-2, y 5-LOX, las cuales tienen un papel fundamental en las principales vías implicadas en los procesos inflamatorios⁽⁷⁻⁹⁾. Asimismo, con el aumento en el conocimiento de la neurobiología y la fisiopatología del dolor, se han encontrado nuevos mecanismos antiinflamatorios y analgésicos, como receptores del potencial transitorio vanilloid tipo 1 (TRPV1), receptores de cannabinoides (CB2), inhibidores de la amida de ácido graso hidrolasa (FAAH), los receptores del subtipo GABA-A o receptores de imidazolina I2, que también se encuentran en plantas medicinales tradicionalmente usadas^(4,10,11).

En nuestro país se han encontrado muchas plantas oriundas utilizadas, tradicionalmente, para el tratamiento del dolor e inflamación; dentro de las más usadas se encuentran: *Croton lechleri* "sangre de drago"⁽¹²⁾, *Chenopodium ambrosioides* L. "paico"⁽¹³⁾, *Peperomia congona Sodiro* "congona"⁽¹⁴⁾ y

Perezia coeruleascens "mancharisqa"⁽⁷⁾, las cuales son objeto de estudio en esta investigación.

En el caso de *Croton lechleri*, sus efectos antiinflamatorios han sido reportados en modelos *in vivo* e *in vitro*, como inhibidores neurogénicos, pero los estudios aún son muy escasos^(15,16). Asimismo, se encontraron pocas investigaciones con resultados alentadores sobre el efecto antiinflamatorio de *Chenopodium ambrosioides* L, sugiriendo la inhibición de mediadores como bradiquininas, óxido nítrico, prostaglandina E, TNF-a, etc.⁽¹⁷⁾. Con respecto a *Peperomia congona Sodiro* y *Perezia coeruleascens*, solo hay estudios etnobotánicos y evidencia de uso ancestral que podría sustentar su posible efecto antiinflamatorio^(18,19).

La presente investigación informa sobre la actividad biológica de cuatro extractos etanólicos de plantas peruanas sobre los glóbulos rojos de sangre humana expuestos a la lisis hipotónica inducida. Este modelo permite estimar si el efecto antiinflamatorio de estos extractos podría ser debido a la estabilización de la membrana de los lisosomas, de forma similar a los antiinflamatorios no esteroideos⁽²⁰⁾. Por ello, el objetivo del presente estudio es evaluar comparativamente la actividad antiinflamatoria de estos extractos, mediante la estabilización de la membrana de glóbulos rojos de sangre humana para futuros estudios específicos.

Materiales y métodos

Material vegetal

Los especímenes empleados en el presente estudio se recolectaron, para taxonomía de la planta y para el estudio farmacológico, durante el periodo de abril a junio de 2016 en diversas zonas del territorio peruano. Cada planta fue identificada taxonómicamente en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). Este trabajo fue autorizado por la Facultad de Medicina de la UNMSM y fue exonerado de ser presentado al Comité de Ética en Investigación debido a que los investigadores fueron los voluntarios sanos para el presente estudio (Tabla 1).

Preparación del extracto

Las muestras fueron traídas al Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UNMSM y se secaron por 24 h en una estufa a 40 °C y luego se molieron. Los productos secos se homogenizaron con etanol al 96% en una relación 1:10 (p/v) a temperatura ambiente por 14 días a agitación constante, y luego se filtraron en papel Whatman # 2.

Tabla 1. Nombre científico, nombre común y partes usadas para la preparación de los extractos etanólicos

Nombre científico	Nombre común	Lugar de recolección	Partes usadas	Mes de recolección
<i>Croton lechleri</i>	Sangre de drago	Puerto M	Resina	Mayo
<i>Chenopodium ambrosioides L</i>	Paico	Cusco	Hojas	Abril
<i>Peperomia congona Sodiro</i>	Congona	Huaraz	Hojas	Junio
<i>Perezia coerulescens</i>	Mancharisqa	Huancayo	Raíz y hojas	Mayo

Después, se procedió a secarlos durante 24 h en una estufa a 40 °C y se almacenó a 4 °C hasta el momento de su uso ⁽²¹⁾.

Preparación de la solución de glóbulos rojos

Se empleó la técnica de Arroyo y Cisneros modificada ⁽²²⁾. Con la colaboración de los cinco voluntarios sanos, quienes no habían consumido medicamentos antiinflamatorios o drogas anticonceptivas, por lo menos, por una semana, y contaban con un certificado médico para corroborar su estado de salud; se procedió a tomar cinco muestras de sangre venosa. Estas muestras de sangre humana entera fresca se mezclaron con un volumen igual de solución de alsever esterilizada (2% de dextrosa, 0,8% de citrato de sodio, ácido cítrico 0,05% y 0,42% de cloruro de sodio en agua). La sangre se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min y las células empaquetadas se lavaron tres veces con una solución isosalina (0,85%, pH 7,2). El volumen de la sangre se midió y se reconstituyó al 10% v/v con solución isosalina. Como solución estándar se empleó una solución de dexametasona (200 ug/mL) debido a su actividad antiinflamatoria. Cada uno de los tratamientos se evaluó en cuatro diluciones seriadas, 200, 100, 50 y 10 ug/mL usando una solución isosalina (0,85%, pH 7,2) como medio de dilución.

Ensayo de estabilización de la membrana del glóbulo rojo

La mezcla de ensayo contiene tampón de fosfato 250 uL [pH 7,4, 0,15 M]; 500 uL de solución hiposalina [0,36%]; 125 uL de suspensión de glóbulos rojos [10% v/v] con 125 uL de los tratamientos y el control (agua destilada en lugar de solución hiposalina para producir 100% de hemólisis) todo se incubó a 37 °C durante 30 min y se centrifugó respectivamente.

$$\% \text{ de hemólisis} = \frac{\text{Densidad óptica de la muestra de prueba}}{\text{Densidad óptica de control}} \times 100$$

El porcentaje de estabilización de la membrana de los glóbulos rojos se calculó como sigue:

$$\% \text{ Protección} = 100 - \% \text{ hemólisis.}$$

El contenido de hemoglobina en la suspensión se estimó utilizando espectrofotómetro de microplacas (BioTek, U.S.A) a 420 nm. El porcentaje de hemólisis de la membrana de los glóbulos rojo se calculó de la siguiente manera ⁽²³⁾:

El análisis estadístico se realizó calculando la media y la desviación estándar de los porcentajes de protección y hemólisis de los cuatro extractos. La evaluación de la diferencia de los porcentajes de protección por concentración en cada uno de los grupos experimentales se realizó mediante el uso de ANOVA, previa comprobación del supuesto de igualdad de varianzas con el test de Barlett ($p > 0,05$), y el análisis de la relación dosis-protección mediante el uso de regresión lineal simple. La comparación con el grupo control se hizo mediante el uso de T de Student. Se realizaron las pruebas con ayuda del programa STATA v. 12 [®] y los resultados se presentan en tablas y gráficos elaborados con el programa Microsoft Excel 2016 [®]. Se consideró un $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

Resultados

El extracto de *P. congona Sodiro* tiene el mayor porcentaje de hemólisis, y el extracto de *C. lechleri* tiene el menor porcentaje de hemólisis en las concentraciones de 200 ug/mL; 100 ug/mL, y 50 ug/mL, respectivamente (Tabla 2).

Mientras que, con respecto al porcentaje de protección de los diferentes extractos, se observa que el extracto de *C. lechleri* tiene mayor porcentaje de protección en un $43,2 \pm 0,9\%$; seguido de *Chenopodium ambrosioides L.*, en un $41,8 \pm 2,2\%$ a la concentración de 200 ug/mL, mientras que el grupo control dexametasona, la actividad antiinflamatoria representa el $42,8 \pm 1,4\%$ a la concentración de 200 ug/mL (Tabla 3).

Se observa que existen diferencias significativas entre los promedios de porcentajes de protección y las concentraciones en el caso de *Ch. ambrosioides L* ($p < 0,001$), *P. coerulescens* ($p < 0,001$) y *C. lechleri* ($p < 0,001$). Se encontró correlación lineal entre los porcentajes de protección y la

Tabla 2. Porcentaje de hemólisis de diferentes extractos sobre la membrana de los glóbulos rojos

Muestra	Concentración (+)			
	200 ug/mL	100 ug/mL	50 ug/mL	10 ug/mL
<i>P. congona Sodiro</i>	65,2 ±0,7%	65,3±0,8%	66,1±1,0%	---
<i>P. coerulescens</i>	62±0,3%	65,2±0,9%	68,8±0,9%	---
<i>Ch. ambrosioides L.</i>	58,2±2,2%	62,4±1,8%	62,9±2,0%	---
<i>C. lechleri</i>	56,8±0,9 %	58,1±1,5%	59,9±1,4%	66,5±0,6%

(+) Resultados expresados en medias ± DE

concentración en el caso de *Ch. ambrosioides L* ($R^2= 0,795$; $p<0,001$), *C. lechleri* ($R^2= 0,631$; $p<0,001$) y *P. coerulescens* ($R^2=0,899$; $p<0,001$); por lo que los porcentajes de protección son directamente proporcionales a la concentración en estas tres especies vegetales (Gráfico 1).

Discusión

La inflamación es una respuesta biológica compleja de los tejidos vasculares a los estímulos nocivos. También se define como un intento de protección por el organismo para eliminar los estímulos perjudiciales e iniciar el proceso de curación⁽²⁴⁾; se desencadena por la liberación de mediadores químicos o moléculas de señalización de tejido lesionado y la migración de célula, produciéndose la inflamación⁽²⁵⁾.

La membrana de los eritrocitos se asemeja a la membrana lisosomal, como tal, el efecto de los fármacos sobre la estabilización de los eritrocitos podría extrapolarse a la estabilización de la membrana lisosomal. Por lo tanto, se estabiliza la membrana que interfiere en la liberación y o acción de mediadores como la histamina, serotonina, prostaglandinas, leucotrienos, etc.⁽²⁾.

La estabilidad de la membrana lisosomal es muy importante ya que puede limitar la respuesta inflamatoria, inhibiendo la liberación de los constituyentes lisosomales de neutrófilos activados tales como enzimas proteasas y bactericidas, que causan la inflamación adicional^(26,27). Es así que la

estabilización de la membrana de glóbulos rojos humanos (HRBC) puede ser tomado como una medida *in vitro* de la actividad antiinflamatoria de los fármacos o extractos de plantas⁽²⁸⁻³⁰⁾.

Se observa que tres de los cuatro extractos evaluados presentan actividad antiinflamatoria a dosis dependiente. El extracto etanólico de *Croton lechleri* a las concentraciones de 100 y 200 ug/mL presentó una actividad antiinflamatoria similar al fármaco de referencia (dexametasona), por lo que se puede considerar a *C. lechleri* como una sustancia que no daña la membrana. Esta actividad antiinflamatoria se atribuye a la presencia de metabolitos activos como flavonoides y terpenos, lo que se ha corroborado en estudios previos con concentraciones alrededor de 200 µg/mL⁽¹²⁾.

La actividad antiinflamatoria de *Chenopodium ambrosioides L.*, a una concentración de 200 ug es similar a la actividad antiinflamatoria del fármaco de referencia (42,8±1,4%); estos resultados son similares a lo obtenido por Ibironke y Ajiboye⁽¹³⁾ en el estudio de *Chenopodium ambrosioides L* donde se concluye que el efecto antiinflamatorio encontrado es dosis dependiente, pero que necesita altas concentraciones para tener un efecto significativo.

En el caso de *Perezia coerulescens*, también se encontró actividad antiinflamatoria relacionada a la concentración, pero con un desempeño por debajo de lo encontrado en el fármaco de referencia. Si bien un estudio previo⁽⁷⁾ encontró efectos antiinflamatorios relacionados a la inhibición de las enzimas

Tabla 3. Porcentaje de protección de los diferentes extractos y solución estándar sobre la membrana de los glóbulos rojos

Muestra	Concentración (+)			
	200 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	10 µg/mL
<i>P.congonas Sodiro</i>	34,8±0,7%	34,7±0,8%	33,9±1,0%	---
<i>P. coerulescens</i>	38,0±0,3% ^(*)	34,8±0,9%	31,2±0,9	---
<i>Ch.ambrosioides L.</i>	41,8±2,2% ^(*)	37,6±1,8%	37,1±2,0%	---
<i>C. lechleri</i>	43,2±0,9 % ^(*)	41,9±1,5% ^(*)	40,1±1,4%	33,5±0,6%
<i>Dexametasona</i>	42,8±1,4%	---	---	---

(+) Resultados expresados en medias ± DE. ^(*)Se usó U de Mann-Whitney para comparación con el control por no haber homogeneidad de varianzas. ^(*) No tuvieron diferencias significativas con el grupo control.

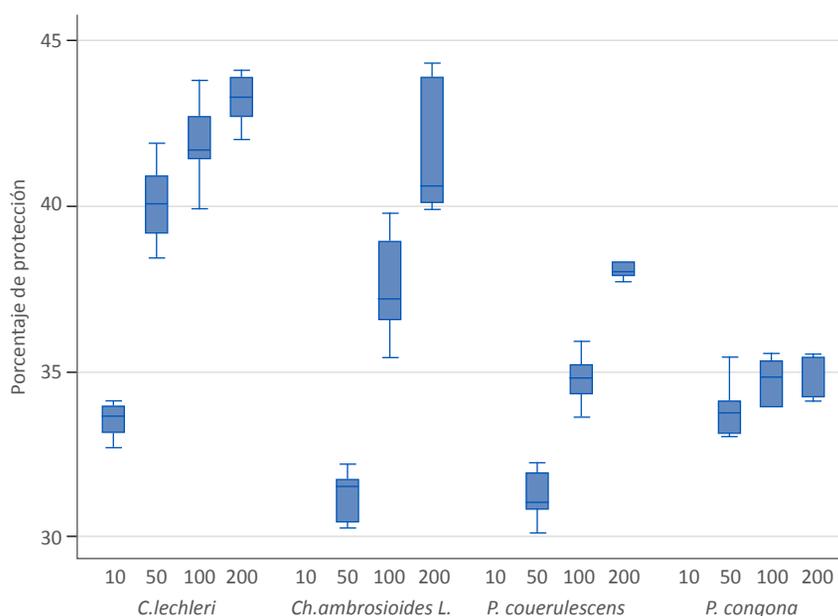


Gráfico 1. Porcentaje de protección de los diferentes extractos etanólicos de cuatro plantas medicinales peruanas a diferentes concentraciones

COX-1 y/o 5-LOX en un medio *in vitro*, quizás el efecto antiinflamatorio encontrado no se atribuya totalmente a esta vía y se podría sugerir que estudios próximos puedan evaluar otras explicaciones como la inhibición de la producción de radicales libres como los peróxidos de lípidos y superóxidos, que también contribuyen a la desestabilización de la membrana celular⁽³¹⁾. Futuros estudios clínicos (Fase I), podrían explorar la verdadera farmacodinamia de estos extractos en modelos *in vivo* con seres humanos.

Los resultados de la actividad antiinflamatoria de *P. congona* Sodiro pueden ser explicados por un aspecto mencionado por Mutee *et al.*⁽¹⁴⁾ en un estudio previo, donde se encontró que solo el extracto de éter de petróleo demostró una significativa acción antiinflamatoria respecto a los otros extractos clorofórmico y metanólico.

Estudios previos postulan que el posible modo de acción del extracto, sus fracciones y los fármacos antiinflamatorios estándar podrían estar relacionados con la unión a las membranas de los eritrocitos con la posterior alteración de las cargas de superficie de las células^(2, 27, 30). Esto podría haber impedido la interacción física con los agentes de agregación o promover la dispersión por repulsión mutua de las cargas eléctricas que están implicadas en la hemólisis de los glóbulos rojos.

Cabe mencionar que este estudio preliminar sobre el efecto antiinflamatorio de estos extractos tiene algunas limitaciones. En primer lugar, el método usado (*in vitro*) hace que las conclusiones de este estudio no sean categóricas, por lo que se sugiere ampliar el análisis del efecto antiinflamatorio usando otros métodos, considerando el uso de modelos de experimentación animal. En segundo lugar, el análisis preclínico de los extractos etanólicos de *Chenopodium ambrosioides* L. "paico", *Peperomia congona* Sodiro "congona" y *Perezia coerulea* "mancharisqa"; requieren de la complementación con estudios de toxicidad aguda y crónica que cuenten con una caracterización fitoquímica más amplia, con ayuda de cromatografía de gases con espectrometría de masas, con el objetivo de completar los estudios necesarios para la realización de futuros ensayos clínicos en situaciones específicas.

Se concluye que los extractos etanólicos de *P. coerulea*, *Ch. ambrosioides* L y *C. lechleri*, presentan actividad antiinflamatoria mediante la inhibición de la lisis de la membrana celular en glóbulos rojos. En el caso del extracto de *C. lechleri* a 100 y 200 ug/mL, así como el extracto de *Ch. ambrosioides* L a una concentración de 200 ug/mL, mostraron un desempeño similar al fármaco de referencia (dexametasona).

Referencias bibliográficas

1. Heidland A, Klassen A, Sebekova K, Bahner U. Beginning of modern concept of inflammation: the work of Friedrich Daniel von Recklinghausen and Julius Friedrich Cohnheim. *J Nephrol*. 2009;22 Suppl 14:71–9.
2. Debnath PC, Das A, Islam A, Islam MA, Hassan MM, Gias Uddin SM. Membrane stabilization – A possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of a Bangladeshi medicinal plant: *Erioglossum rubiginosum* (Bara Harina). *Pharmacogn J*. 2013;5(3):104–7.
3. Ussai S, Miceli L, Pisa FE, Bednarova R, Giordano A, Rocca GD, et al. Impact of potential inappropriate NSAIDs use in chronic pain. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9(1):2073–7.
4. Li Y-S, Wang J-X, Jia M-M, Liu M, Li X-J, Tang H-B. Dragon's blood inhibits chronic inflammatory and neuropathic pain responses by blocking the synthesis and release of substance P in rats. *J Pharmacol Sci*. 2012;118(1):43–54.
5. Lock O, Perez E, Villar M, Flores D, Rojas R. Bioactive Compounds from Plants Used in Peruvian Traditional Medicine. *Nat Prod Commun*. Marzo de 2016;11(3):315–37.
6. Kolawole OT, Akiibinu MO, Ayankunle AA, Awe EO. Evaluation of Anti-inflammatory and Antinociceptive Potentials of *Khaya senegalensis* A. Juss (Meliaceae) Stem Bark Aqueous Extract. *Br J Med Med Res*. 2013;3(2):216–29.
7. Chagas-Paula DA, Oliveira TB, Faleiro DPV, Oliveira RB, Costa FBD. Outstanding Anti-inflammatory Potential of Selected Asteraceae Species through the Potent Dual Inhibition of Cyclooxygenase-1 and 5-Lipoxygenase. *Planta Med*. 2015;81(14):1296–307.
8. Adebayo SA, Dzoyem JP, Shai LJ, Eloff JN. The anti-inflammatory and antioxidant activity of 25 plant species used traditionally to treat pain in southern African. *BMC Complement Altern Med*. 2015;15:159.
9. Jeppesen AS, Soelberg J, Jäger AK. Antibacterial and COX-1 Inhibitory Effect of Medicinal Plants from the Pamir Mountains, Afghanistan. *Plants Basel Switz*. 2012;1(2):74–81.
10. Meotti FC, Lemos de Andrade E, Calixto JB. TRP modulation by natural compounds. *Handb Exp Pharmacol*. 2014;223:1177–238.
11. Zhang Y, Sreekrishna K, Lin Y, Huang L, Eickhoff D, Degenhardt C, et al. Modulation of transient receptor potential (TRP) channels by Chinese herbal extracts. *Phytother Res PTR*. 2011;25(11):1666–70.
12. Risco E, Ghia F, Vila R, Iglesias J, Alvarez E, Cañigual S. Immunomodulatory activity and chemical characterization of sangre de drago (dragon's blood) from *Croton lechleri*. *Planta Med*. septiembre de 2003;69(9):785–94.
13. Ibrionke G.F., Ajiboye K.I. Studies on the Anti-Inflammatory and Analgesic Properties of *Chenopodium ambrosioides* Leaf Extract in Rats. *Int J Pharmacol*. 2007;3(1):111–5.
14. Mutee AF, Salhimi SM, Yam MF, Lim CP, Abdullah GZ, Ameer OZ, et al. In vivo Anti-inflammatory and in vitro Antioxidant Activities of *Peperomia pellucida*. *Int J Pharmacol*. 2010;6(5):686–90.
15. Miller MJ, Vergnolle N, McKnight W, Musah RA, Davison CA, Trentacosti AM, et al. Inhibition of neurogenic inflammation by the Amazonian herbal medicine sangre de grado. *J Invest Dermatol*. septiembre de 2001;117(3):725–30.
16. Gupta D, Bleakley B, Gupta RK. Dragon's blood: Botany, chemistry and therapeutic uses. *J Ethnopharmacol*. 12 de febrero de 2008;115(3):361–80.
17. TrivellatoGrassi L, Malheiros A, Meyre-Silva C, Buss Z da S, Monguilhott ED, Fröde TS, et al. From popular use to pharmacological validation: a study of the anti-inflammatory, anti-nociceptive and healing effects of *Chenopodium ambrosioides* extract. *J Ethnopharmacol*. 9 de enero de 2013;145(1):127–38.
18. Romero Viacava M. Análisis fitoquímico y actividad farmacológica de *Perezia pinnatifida* "valeriana" y *Perezia coeruleascens* "mancharisqa" en su estado silvestre y cultivado. Univ Nac San Cristóbal Huamanga [Internet]. 2005 [citado 18 de septiembre de 2017]; Disponible en: <http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/1240>
19. Pino Infante G. Estado actual de las Suculentas en el Perú. Zonas áridas. 31 de diciembre de 2006;10(1):155–73.
20. Jainul MA, Chowdhury A, Al Mamun A, Rahman S, Azam S, Shams K. Human red blood cell membrane stability testing for the estimation of anti-inflammatory activity of methanolic extract of *Milletia pachycarpa* benth leaves. *Int J Pharm Sci Res*. 2013;4(12):4587–90.
21. Enciso E, Arroyo J. Efecto antiinflamatorio y antioxidante de los flavonoides de las hojas de *Jungia rugosa* Less (matico de puna) en un modelo experimental en ratas. *An Fac Med*. 2013;72(4):231–7.
22. Arroyo J, Cisneros C. Modelos experimentales de investigación farmacológica. Facultad de Medicina Humana. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2012.
23. Sadique J, Al-Rqobah WA, Bughaith MF, El-Gindy AR. The bio activity of certain medicinal plants on the stabilization of RBC membrane system. *Fitoterapia*. 1989;60:525–32.

24. Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. *Clin Exp Immunol.* 2007;147(2):227–35.
25. Chatterjee P, Chandra S, Dey P, Bhattacharya S. Evaluation of anti-inflammatory effects of green tea and black tea: A comparative *in vitro* study. *J Adv Pharm Technol Res.* 2012;3(2):136–8.
26. Vadivu R, Lakshmi KS. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory activity of leaves of *Symplocos cochinchinensis* (Lour) Moore ssp *laurina*. *Bangladesh J Pharmacol.* 2008;3(2):121–4.
27. Gadamsetty G, Maru S, Tyagi A, Chakravarthula SN. Anti-Inflammatory, Cytotoxic and Antioxidant Effects of Methanolic Extracts of *Drypetes Sepiaria* (Euphorbiaceae). *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2013;10(5):274–82.
28. Chippada SC, Volluri SS., Bammidi SR, Vangalapati M. *In vitro* anti-inflammatory activity of methanolic extract of *Centella asiatica* by HRBC membrane stabilisation. *Rasayan J Chem.* 2011;4(2):457–60.
29. Fernández A, A JA, R PB, Tomás G, Medina F, Chenguayén J, *et al.* Efecto antiinflamatorio *in vitro* y seguridad en ratas del extracto acuoso atomizado de la raíz de *Krameria lappacea* (ratania) root. *Cienc E Investig.* 2007;10(2):65–70.
30. Chowdhury A, Azam S, Jainul MA, Faruq KO, Islam A. Antibacterial Activities and *In Vitro* Anti-Inflammatory (Membrane Stability) Properties of Methanolic Extracts of *Gardenia coronaria* Leaves. *Int J Microbiol.* 2014;2014(1):410935.
31. Elsharkawy E, Alshathly M, Helal M. Anti-inflammatory and Chemical Composition of Two Plants Family Asteraceae Growing in Saudi Arabia. *J Chem Chem Eng.* 2014;8(2):157–62.