



**Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo**  
**División de Estudios de Posgrado**

---

---



**Facultad de Químico Farmacobiología**  
**Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas**  
**Área Temática: Biotecnología Alimentaria**

**“Elaboración de una biopelícula comestible incorporando nanocápsulas de aceite esencial y extractos polifenólicos de *Aloysia citriodora* con actividad antiinflamatoria evaluado en un modelo biológico”**

**T E S I S**

**Que como requisito para obtener el grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Presenta:**

**IBQ. Osvaldo Alvarez Cortes**

**Asesora**

**Dra. Ma. Guadalupe Garnica Romo**

**Co-asesor**

**Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores**

**Morelia, Michoacán, México**  
**Marzo de 2020**

## ***DEDICATORIA***

El presente trabajo de investigación lo dedico principalmente a Dios, por darme la fuerza para seguir logrando metas. A mi familia quienes con sus consejos me incentivaron a continuar y hacer realidad este proyecto de investigación.

## **A G R A D E C I M I E N T O S**

Agradezco a Dios, por ser mi fortaleza en los momentos difíciles y por permitirme concluir la obtención de un posgrado. A mi familia por los consejos brindados para obtener nuestras metas y sueños, siendo perseverantes siempre para obtener los que nos proponemos.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONAcyT) por servir como intermediario, entre los ciudadanos mexicanos y yo, para poder brindarme el apoyo económico durante la Maestría.

Agradezco a la doctora Ma. Guadalupe Garnica Romo asesora del proyecto de Investigación; “Elaboración de una biopelícula comestible incorporando nanocápsulas de aceite esencial y extractos polifenólicos de *Aloysia citriodora* con actividad antiinflamatoria evaluado en un modelo biológico”, por su apoyo y las facilidades dadas en el uso de su infraestructura y equipamiento, el cual permitió la realización de esta tesis.

Agradezco al doctor Héctor Eduardo Martínez Flores (Co -asesor) por su gran apoyo para concretar este proyecto de investigación y la confianza que me fue brindada para trabajar en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de alimentos (L.I.D.A.).

Agradezco a la Dra. Rosa Elva Norma del Rio Torres, al Dr. Rafael Salgado Garciglia y al Dr. Luis Fernando Ortega Varela por formar parte de mi comité de sinodal y por el tiempo brindado en la revisión de la tesis, así como también sus consejos, apoyo y sabiduría.

Agradezco a la D.C. Eréndira Valencia Avilés, M.C. Eunice Tranquilino, al QFB. Arian Orozco Alfaro por su apoyo y asesorías brindadas para lograr el presente trabajo de tesis y por su amistad incondicional que me fue brindada.

Agradezco a mis amigos y compañeros de maestría, Ricardo, Jessica, Luis Alfonso, Marina, Gerardo, Diana y Baruk por ser cómplices en esta aventura que vivimos juntos durante dos años.

Agradezco a Itzia Ileri Cerano por los consejos que me fueron brindados y su apoyo incondicional para la realización de este proyecto.

Agradezco a cada uno de los integrantes del laboratorio de investigación y desarrollo de alimentos, por sus consejos, por su amistad y los momentos divertidos que pasamos durante estos dos años.

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Hojas de Cedrón.	3
<b>Figura 2.</b> Hojas de Cedrón para té.	4
<b>Figura 3.</b> Molécula de citral.	5
<b>Figura 4.</b> Esquematzación de la ruta de biosíntesis del ácido siquímico y ruta de formación de los poliacetatos.	6
<b>Figura 5.</b> Estructura química de los principales grupos de flavonoides.	8
<b>Figura 6.</b> Ruta metabólica de los terpenos.	9
<b>Figura 7.</b> Hojas de cedrón.	21
<b>Figura 8.</b> Evaporación del etanol para concentrar el extracto.	22
<b>Figura 9.</b> Secado del extracto acuoso en Nano spray dryer B 90.	22
<b>Figura 10.</b> Equipo de Hidrodestilación para obtener el aceite esencial.	23
<b>Figura 11.</b> Reacción colorimétrica del ácido gálico a diferentes concentraciones.	25
<b>Figura 12.</b> Reacción colorimétrica de quercetina a diferentes concentraciones.	26
<b>Figura 13.</b> Reacción colorimétrica del extracto acuosos frente al radical DPPH.	28
<b>Figura 14.</b> Microscopio electrónico de barrido JSM- 7600F.	29
<b>Figura 15.</b> Ultrasonicador VCX 500.	31
<b>Figura 16.</b> Formación de la emulsión por la fuerza sónica. a) Inicio, b) después de 10 min.	32
<b>Figura 17.</b> Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A GC System.	33
<b>Figura 18.</b> Curva de calibración para cuantificación de Terpenos.	34

	<b>Página</b>
<b>Figura 19.</b> a) Extracción de los terpenos de las diferentes muestras. b) Terpenos disueltos en metanol después de la extracción.	35
	36
<b>Figura 20.</b> Calentamiento preparación de muestra para película.	
<b>Figura 21.</b> Filtrado del homogenizado de película.	36
<b>Figura 22.</b> Secado en horno por un periodo de 24 h y películas formadas.	
	37
<b>Figura 23.</b> a) Reacción colorimétrica de polifenoles presentes en la película, b) Reacción colorimétrica de terpenos presentes en la película.	38
<b>Figura 24.</b> Edema auricular en ratas Wistar	39
<b>Figura 25.</b> Curva de calibración para cuantificación de polifenoles totales.	40
	42
<b>Figura 26.</b> Curva de calibración para cuantificación de Flavonoides.	
<b>Figura 27.</b> Curva de inhibición del radical DPPH con el aceite esencial.	43
	44
<b>Figura 28.</b> Curva de inhibición del radical ABTS con ácido gálico.	
<b>Figura 29.</b> Curva de inhibición del radical ABTS con aceite esencial.	44
<b>Figura 30.</b> Microfotografía del extracto acuoso.	45
<b>Figura 31.</b> Diferentes tipos de partícula obtenidas por Nano spray dryer (tomadas por BÜCHI Labortechnik).	46
	46
<b>Figura 32.</b> Microfotografías de las muestras (resolución 2.00kV): a) caseinato de sodio 1:1, b) caseinato de sodio 1:2, c) caseinato de sodio 1:3, d) maltodextrina 1:1, e) maltodextrina 1:2, f) maltodextrina 1:3.	
<b>Figura 33.</b> Diferentes tipos de tamaño de partícula obtenidas por Nano spray dryer.	47
	48
<b>Figura 34.</b> Espectros de FTIR del extracto acuoso.	
<b>Figura 35.</b> Espectros de FTIR del extracto acuosos con maltodextrina 1:2.	49

<b>Figura 36.</b>	Espectros de FTIR de maltodextrina.	<b>Página</b> 50
<b>Figura 37.</b>	Tamaño de partícula de estándar 30 nm /Ludox.	51
<b>Figura 38.</b>	Tamaño de partícula del extracto.	52
<b>Figura 39.</b>	Microfotografías de las muestras: a) cápsulas de aceite, b) Zoom de un cuadrante de la micrografía anterior.	54
		54
<b>Figura 40.</b>	Diferentes tipos de tamaño de partícula obtenidas por Nano spray dryer.	
<b>Figura 41.</b>	Cromatograma de gases del aceite esencial de Cedrón ( <i>Aloysia citriodora</i> ).	55
<b>Figura 42.</b>	Curva de calibración de linalool.	57
<b>Figura 43.</b>	Espectros de FTIR del aceite de cedrón.	58
<b>Figura 44.</b>	Espectros de FTIR de maltodextrina.	59
<b>Figura 45.</b>	Espectros de FTIR de cápsulas de aceite.	59
<b>Figura 46.</b>	Edema auricular en ratas Wistar.	62
<b>Figura 47.</b>	Edema auricular en ratas Wistar	63

## ÍNDICE DE CUADROS

		Página
<b>Tabla 1.</b>	Taxonomía del Cedrón.	3
<b>Tabla 2.</b>	Contenido de antioxidantes en hojas de <i>Aloysia citriodora</i> .	5
<b>Tabla 3</b>	Proceso de inflamación.	12
<b>Tabla 4</b>	Principales moléculas formadoras de biopelícula.	17
<b>Tabla 5</b>	Preparación de la curva de calibración para medir polifenoles totales.	24
<b>Tabla 6</b>	Preparación del extracto.	25
<b>Tabla 7</b>	Preparación de la curva de calibración para Flavonoides.	26
<b>Tabla 8</b>	Preparación del extracto.	27
<b>Tabla 9</b>	Preparación de la muestra.	29
<b>Tabla 10</b>	Condiciones de medición.	30
<b>Tabla 11.</b>	Condiciones de medición para el extracto acuoso.	31
<b>Tabla 12.</b>	Resultado obtenido en equivalentes de ácido gálico.	41
<b>Tabla 13.</b>	Resultados obtenidos en equivalentes de quercetina.	42
<b>Tabla 14.</b>	Rendimientos de material secado.	45
<b>Tabla 15.</b>	Resultado obtenido en equivalentes de ácido gálico.	47
<b>Tabla 16.</b>	Señales de FTIR obtenidas y su asignación.	48
<b>Tabla 17.</b>	Señales de FTIR.	50
<b>Tabla 18.</b>	Señales de FTIR.	51
<b>Tabla 19.</b>	Tamaño de micela con y sin emulsión.	52

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
<b>Tabla 20.</b>	Tamaño de micela en el ciclo de centrifugación.	53
<b>Tabla 21.</b>	Tamaño de micela en el ciclo de congelación y descongelación.	53
<b>Tabla 22.</b>	Composición química de compuestos volátiles del aceite esencial del cedrón.	56
<b>Tabla 23.</b>	Resultados de terpenos.	57
<b>Tabla 24.</b>	Actividad antiinflamatoria de los diferentes tratamientos a las 6 h.	60
<b>Tabla 25.</b>	Actividad antiinflamatoria de los diferentes tratamientos a las 24 h.	60
<b>Tabla 26.</b>	Actividad antiinflamatoria de los diferentes tratamientos a las 48 h.	61
<b>Tabla 27.</b>	Actividad antiinflamatoria de los diferentes tratamientos a las 72 h.	61
<b>Tabla 28.</b>	Pesos del tejido auricular de los diferentes tratamientos.	64

<b>Contenido</b>	
<b>1. Introducción</b>	1
<b>2. Marco Teórico</b>	2
<b>2.1. Cedrón</b>	2
2.1.1. Principales usos	3
2.1.2. Producción de cedrón en México	4
2.1.3. Composición de las hojas	4
<b>2.2. Antioxidantes</b>	6
2.2.1. Antioxidante endógenos	6
2.2.2. Biosíntesis de los polifenoles	6
2.2.3. La ruta de biosíntesis del ácido siquímico	7
2.2.4. La ruta de formación de los poliacetatos	7
2.2.5. Flavonoides	7
2.2.6. Taninos	7
<b>2.3 Terpenos</b>	8
2.3.1. Aceites esenciales	10
2.3.2. Usos y propiedades de los aceites esenciales	11
<b>2.4 Inflamación</b>	11
2.4.1. Aminas vasoactivas: histamina y serotonina	13
2.4.2. Citocinas	13
2.4.3. Quimiocinas	14
2.4.4. Metabolitos del ácido araquidónico (AA): prostaglandinas	14
2.4.5. Radicales libres	14
<b>2.5. Nanoencapsulación</b>	15
2.5.1. Métodos para obtener nanopartículas	16
<b>2.6. Biopelícula</b>	16
2.6.1. Proceso de elaboración de biopelículas	16
<b>2.7. Componentes químicos usados en la elaboración de biopelículas y nanocápsulas</b>	17
2.7.1. Polisacáridos	18
2.7.2. Alginatos	18
2.7.3. Mucílagos	18
<b>3. Justificación</b>	19
<b>4. Hipótesis</b>	19
<b>5. Objetivo general</b>	19
<b>5.1. Objetivos específicos</b>	19
<b>6. Estrategia experimental</b>	20

<b>7. Materiales y métodos</b> .....	21
<b>7.1. Plantas</b> .....	21
<b>7.2. Métodos de extracción</b> .....	21
7.2.1. Extracción etanólica .....	21
7.2.2. Extracción acuosa .....	22
7.2.3. Hidrodestilación .....	22
<b>7.3. Pruebas Antioxidantes</b> .....	24
7.3.1. Polifenoles totales .....	24
7.3.2. Flavonoides totales .....	26
7.3.3. Radical DPPH. (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) .....	27
7.3.4. Radical ABTS 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6- sulfónico) .....	28
<b>7.4. Elaboración de las nano partículas del extracto acuoso y observación morfológica por Microscopía Electrónica de Barrido</b> .....	29
7.4.1. Contenido de polifenoles en las cápsulas del extracto acuoso .....	29
7.4.2. Espectrometría infrarroja del extracto acuoso .....	30
7.4.3. Tamaño de partícula .....	30
<b>7.5. Emulsión y estabilidad del aceite</b> .....	31
7.5.1. Centrifugación .....	32
7.5.2. Ciclo de congelación y descongelación .....	32
<b>7.6. Elaboración de las nano partículas de aceite y microscopía electrónica de barrido</b> ....	33
7.6.1. CG-MS del aceite .....	33
7.6.2. Contenido de terpenos en las cápsulas .....	34
7.6.3. Espectrometría infrarroja del extracto aceite y cápsulas .....	35
<b>7.7. Elaboración de la película</b> .....	35
7.7.1. Pruebas en películas .....	36
7.7.2 Determinación de solubilidad en agua de las películas elaboradas .....	37
7.7.3. Determinación de polifenoles y terpenos en las películas .....	37
<b>7.8. Inflamación</b> .....	38
<b>8. Resultados y discusión</b> .....	40
<b>9. Conclusión</b> .....	66
<b>10. Literatura citada</b> .....	67

## RESUMEN

Los extractos de hoja de cedrón (*Aloysia citriodora*.) se usan en medicina tradicional como en la industria farmacéutica. Los compuestos antioxidantes en las hojas de *Aloysia citriodora*, pueden tener efectos positivos tales como antiespasmódico, antiinflamatorio, tranquilizante, calmante nervioso y expectorante. En la presente investigación, se determinó la cantidad de compuestos polifenólicos y la capacidad antioxidante in vitro en extractos obtenidos con agua y etanol. La cantidad de polifenoles totales y flavonoides se expresaron como equivalentes de ácido gálico y quercetina respectivamente. También se determinó la cantidad de aceite esencial de *Aloysia citriodora*, obtenido de las hojas por el método de hidrodestilación y que fue analizado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). Se determinó la capacidad antioxidante de los compuestos polifenólicos y terpenos mediante la inhibición de los radicales 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) y 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Los compuestos polifenólicos fueron mayores en la fracción acuosa. Con el análisis de CG-EM se identificaron los compuestos terpénicos crisantenona, D-limoneno,  $\alpha$ -curcumeno,  $\alpha$ -pineno, espatulenol,  $\alpha$ -gurjunene, cariofileno, oxido de cariofileno y citral.

Para la encapsulación de los compuestos polifenoles del extracto acuoso y los terpénicos, del aceite esencial del cedrón, se utilizó el equipo Nano spray dryer B 90, utilizando como material de pared a la maltodextrina; una vez encapsulados, se volvió a medir el contenido de polifenoles y terpenos, obteniendo como resultado 0.596 mg equivalentes de ácido gálico / g de cápsulas de extracto acuoso y 1 mg de cápsulas de aceite que contiene 5.489  $\mu$ L de linalool respectivamente. Para la elaboración de la película, se utilizó como material filmogénico a la goma arábica, alginato de sodio, agar-agar y alcohol polivinílico; se determinó el efecto antiinflamatorio del extracto acuoso, cápsulas de extracto acuoso, aceite esencial, cápsulas de aceite esencial, maltodextrina y dexametasona. Los extractos administrados tuvieron un efecto en la actividad antiinflamatoria, debido a que mostraron un valor mayor que el vehículo (maltodextrina), tendiendo a parecerse al control positivo dexametasona.

**Palabras clave:** *Aloysia citriodora*, CG-EM, DPPH, ABTS, polifenoles totales, flavonoides, nano spray-dryer.

## ABSTRACT

The cedron's leaf extracts (*Aloysia citriodora*.) are used in traditional medicine and pharmaceutical industry alike. The *Aloysia citriodora* leaves' antioxidant compounds can have positive effects, such as antispasmodic, anti-inflammatory, tranquilizer and expectorant. In this investigation, the amount of polyphenolic compounds and the antioxidant capacity in vitro at extracts obtained with water and ethanol were determined. The total polyphenols and flavonoids were expressed as gallic acid and quercetin equivalents respectively. The amount of *Aloysia citriodora* essential oil was determined too, being obtained from leaves through the hydrodistillation method and analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The polyphenolic compounds antioxidant capacity and terpenes was determined through inhibition of 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals. The polyphenolic compounds were higher in the aqueous fraction. With the GC-MS analysis, the terpenic compounds chrysanthenone, D-limonene,  $\alpha$ -curcumene,  $\alpha$ -pinene, spatulenol,  $\alpha$ -gurjunene, karyophyllene, caryophyllene oxide and citral were identified.

For the encapsulation of the polyphenol compounds of the aqueous extract and the terpenic compounds of the cedron's essential oil, the Nano spray dryer B 90 equipment was used, using maltodextrin as wall material; once encapsulated, the polyphenols and terpenes content was measured again, getting 0.596 mg gallic acid equivalent / g of aqueous extract capsules and 1 mg of oil capsules containing 5,489  $\mu$ L of linalool respectively as a result. For the film elaboration, Arabic gum, sodium alginate, agar-agar and polyvinyl alcohol were used as filmogenic material; the anti-inflammatory effect of the aqueous extract, aqueous extract capsules, essential oil, essential oil capsules, maltodextrin and dexamethasone was determined. The administered extracts had an effect on the anti-inflammatory activity, because they showed a higher value than the vehicle (maltodextrin), tending to resemble the positive control (dexamethasone).

**Keywords:** *Aloysia citriodora*, GC-MS , DPPH, ABTS, total polyphenols, flavonoids, nano spray-dryer.

## 1. Introducción

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, una planta medicinal, se define como cualquier especie vegetal silvestre o cultivada que contiene sustancias capaces de ser empleadas para propósitos curativos y cuyos principios activos, pueden servir como precursores para la síntesis de nuevos fármacos. Es por ello que los componentes bioactivos han cobrado relevancia en los últimos años, debido a los beneficios que generan a la salud humana, algunos previniendo enfermedades crónico-degenerativas, así como aliviando los síntomas que estas producen. Existe una gran variedad de fitoquímicos bioactivos, entre los que destacan diversos compuestos de tipo: fenólicos, azufrados, fitoesteroles, terpenos, carotenoides e isoflavonas, que se encuentran en frutas, verduras, cereales, leguminosas y planta medicinales (Drago-Serrano *et al.*, 2006).

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad de las articulaciones, crónica, degenerativa e inflamatoria, que aqueja a más de un millón de mexicanos (CNETS, 2010). Por su parte, Abud-Mendoza (2005) reportó que la tasa de incidencia de AR en México por cada 100 000 habitantes es de 35.9 en mujeres y de 14.3 en hombres. Es por lo anterior, que en nuestro país es necesario realizar investigación para encontrar alternativas que prevengan estas enfermedades y/o ayuden a aliviar los síntomas producidos por éstas.

Se estima que en el mundo existen entre 310,000 y 422,000 especies de plantas, de las cuales 20,000 poseen propiedades de gran interés para la investigación y descubrimiento de compuestos que lleven a la elaboración de nuevos fármacos; pese a esto, se calcula que menos del 10% de las plantas han sido evaluadas en la búsqueda de actividad biológica (Juarez-Rosete *et al.*, 2013).

Entre estas plantas medicinales, *Aloysia citriodora* ha sido estudiada en diversos países con el propósito de conocer el tipo y cantidad de compuestos que contiene, y a las diferentes propiedades que éstos puedan ejercer en los sistemas biológicos. La planta es originaria de América del Sur, se distribuye por Mesoamérica y Centroamérica, es ampliamente cultivada como especie ornamental, por el agradable olor de sus flores y como especie medicinal (Estrada *et al.*, 2012). *A. citriodora* es conocida en México con diversos nombres entre los que destacan "Cedrón" o "Yerba Luisa", es un arbusto perennifolio aromático que crece entre 3-4 m. Se levanta desde la base corta, gruesa y leñosa. Sus hojas aparecen agrupadas en verticilos trímeros, tienen hasta 7 cm de longitud de color verde claro. Presenta flores blancas dispuestas en pequeñas cabezuelas agrupadas en racimos, ubicadas en las partes terminales de la planta. La infusión de las hojas es usada ampliamente en México y en países Sudamericanos para calmar los dolores, afecciones nerviosas y gastrointestinales, como son: cólicos, diarrea, indigestión, flatulencias,

náuseas y vómito. El reumatismo, úlceras y dolores menstruales, son otros de los malestares para los que se usa esta infusión (Cáceres *et al.*, 1990).

Las hojas del cedrón son ricos en un aceite esencial, cuyo componente principal es el citral, responsable de su aroma y que contiene además limoneno, linalol, cineol, terpineol, cariofileno, espatulenol, y variaciones intrínsecas en la cantidad y calidad del resto de terpenos como  $\alpha$ -tujeno,  $\alpha$ -pineno, camfeno, mirceno, p-cimeno,  $\gamma$ -terpineno, linalol, camferol, dihidrolinalool, citronelol, mentona, isoborneol,  $\alpha$ -terpineol y carvona (Di Leo *et al.*, 2008).

Los extractos acuosos de *A. citriodora* contienen antioxidantes en infusión, como; por ejemplo, posee  $51.85 \pm 3.17$  mg de ácido tánico/g material seco (Wernert *et al.*, 2009); por otro lado, Kumar *et al.* (2008) mencionan que el extracto acetónico de las partes aéreas evidenció significativa actividad contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus vulgaris*.

Para que los compuestos activos puedan ejercer los efectos antes descritos, las moléculas bioactivas deben llegar al sitio de acción, por lo que, salvo que se ejerzan sus efectos directamente sobre el tracto digestivo, deben ser absorbidos, pasar a la sangre y distribuirse en el organismo humano (Drago-Serrano *et al.*, 2006). Por lo cual, han surgido técnicas como la encapsulación, para proteger los bioactivos al interior del organismo, evitando que estos se degraden antes de cumplir su función.

## **2. Marco Teórico**

### **2.1. Cedrón**

*Aloysia citriodora*, llamada comúnmente como cedrón, es una planta de la familia Verbenaceae originaria de Sudamérica. Es un arbusto de tallo leñoso de 3-3.5 m de altura, sus hojas son angostas y alargadas, esta planta se caracteriza debido a que sus hojas son muy aromáticas. En la Tabla 1 se presenta la taxonomía del cedrón y en la Figura 1 las hojas de la planta.

Florece en verano, las flores son pequeñas, rosadas, blanquecinas. Nativa de Sudamérica comprendiendo países como Argentina, Paraguay, Brasil, Uruguay, Chile, Bolivia y Perú, su propagación como cultivo se extendió a México.

Las condiciones para su cultivo son de un clima cálido constante y exposición soleada, no resiste bien las heladas, a temperaturas por debajo de 0 °C pierde las hojas, aunque la madera es lo suficientemente dura como para soportar hasta -10 °C (Botta, 1979).

**Tabla 1.** Taxonomía del cedrón (*Aloysia citriodora*).

<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>División</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Clase</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Orden</b>	<i>Lamiales</i>
<b>Familia</b>	<i>Verbenaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Aloysia</i>
<b>Especie</b>	<i>A. citriodora</i>



**Figura 1.** Hojas de cedrón (*Aloysia citriodora*).

### 2.1.1. Principales usos

La hoja de cedrón tiene un gran uso en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. El aceite esencial se utiliza como corrector de sabor y olor, en productos cítricos. Se utiliza como planta ornamental debido al gran aroma que expide. (Dellacassa y Bandoni, 2003)

La infusión de sus hojas, a veces también tallos y flores, es de uso corriente en la medicina popular. Según Rojas *et al.* (2015), tiene propiedades como antiespasmódico, calmante nervioso, expectorante y estomacal.

### 2.1.2. Producción de cedrón en México

La propagación del arbusto de cedrón se da por semillas, como por medio de mugrones y estacas. Sin embargo, existe una baja germinación de las semillas, por lo cual se opta por la propagación de estacas (Fretes, 2010; Dellacassa y Bandoni, 2003).

La mayor producción de cedrón en México, se da en la sierra de Hidalgo, en los municipios de Cardonal y Tlahuiltepa, donde las comunidades producen los arbustos de cedrón mediante estacas, para la posterior venta de sus hojas a fin del uso como infusiones. Se comercializa mediante la marca “Caxtle”.



**Figura 2.** Hojas de cedrón para té.

### 2.1.3. Composición de las hojas

Las plantas medicinales deben su acción a ciertos componentes denominados principios activos, éstos son metabolitos secundarios de las plantas. Los metabolitos secundarios se agrupan en los siguientes grupos de compuestos (García y Carril, 2011):

Terpenos: entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales.

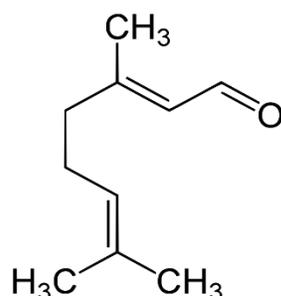
Compuestos fenólicos: cumarinas, flavonoides, lignina y taninos, entre otros.

Glicósidos: saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos.

Alcaloides.

Los principales componentes de las hojas de cedrón son: aceite esencial (0.1-0.3 %), monoterpenos (6%), sesquiterpenos (18%), alcoholes alifáticos (1–1.5 %), ésteres terpénicos (6 %), aldehídos (39–40%) (Vargas, 2012). El principal componente del aceite esencial es el citral (Figura 3), el cual se obtiene por diferentes técnicas, de las que resalta el arrastre por vapor.

Estudios realizados por Hawary *et al.* (2011), reportaron los siguientes componentes terpenicos de las hojas: dl-limonene, p-cineol, neral, geranial, alfa curcumene.



**Figura 3.** Molécula de citral.

En la Tabla 2 se muestra el contenido de compuestos antioxidantes en hojas de cedrón.

Estudios realizados por Pereira *et al.* (2017), reportaron los siguientes componentes polifenólicos de las hojas: verbascoside, luteolina-7-O-diglucurónido, apigenina-7-O-diglucurónido, isoverbascosido, forsintósido, y martinósido.

**Tabla 2.** Contenido de antioxidantes en hojas de cedrón (*Aloysia citriodora*).

Muestra	Fenoles totales (mg ácido tánico/g material seco)	Flavonoides totales (mg rutina/g material seco)	Tanino totales (mg ácido tánico/g material seco)	Ácido hidroxicinámicos totales (mg ácido clorogénico/g material seco)
Hoja joven	50.02 ± 3.84	24.91 ± 1.90	15.90 ± 1.85	35.01 ± 2.84
Hoja adulta	26.43 ± 2.49	20.51 ± 1.15	16.12 ± 1.60	19.72 ± 1.72

(Ricco *et al.*, 2011).

## 2.2. Antioxidantes

Un antioxidante se define como aquel compuesto capaz de disminuir el daño celular, proteger a las biomoléculas (lípidos, proteínas, ADN) de la oxidación y/o inhibir los procesos de apoptosis celular, generados por especies reactivas del oxígeno, responsables del estrés oxidante. El antioxidante cede un electrón, se oxida y se transforma en un radical libre débil no tóxico. Existen dos tipos de antioxidantes: los endógenos y los exógenos, estos últimos son tomados de la dieta (Corrales y Muñoz, 2012).

### 2.2.1. Antioxidante endógenos

Los antioxidantes endógenos son producidos por el organismo como defensa ante los radicales libres. Se clasifican de dos maneras, los antioxidantes enzimáticos: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión S-transferasas, tioredoxina-reductasas. Los no enzimáticos son: glutatión, ácido úrico, ubiquinol (Co-enzima Q). Algunos de estos se encuentran en los alimentos, pero estos sufren una degradación/biotransformación significativa a lo largo del tracto gastrointestinal.

### 2.2.2. Biosíntesis de los polifenoles

Los polifenoles se sintetizan en el metabolismo secundario de las plantas, tienen lugar a través de dos importantes rutas primarias: la ruta del ácido siquímico y la ruta de los poliacetatos, tal como se muestra en la Figura 4 (Quiñones *et al.*, 2012).

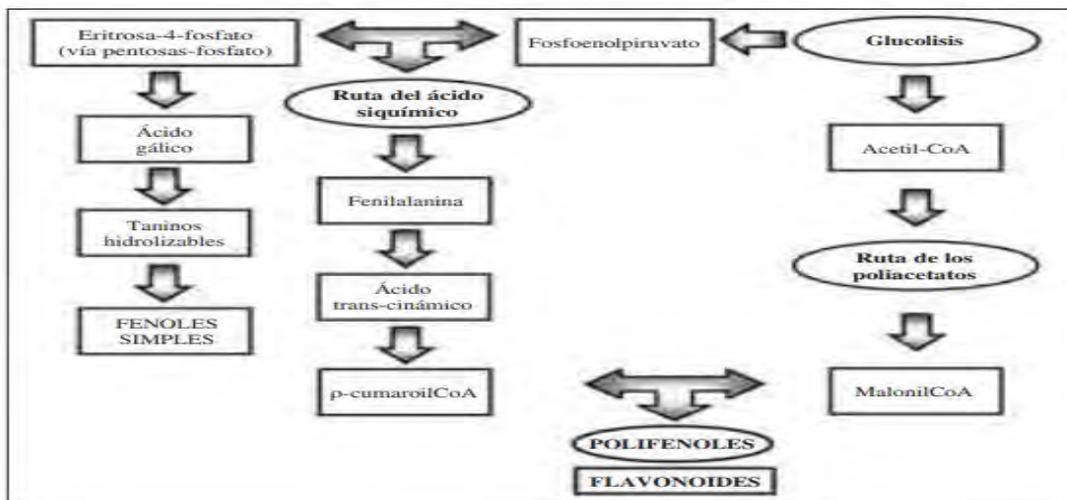


Figura 4. Esquematación de la ruta de biosíntesis del ácido siquímico y ruta de formación de los poliacetatos.

### **2.2.3. La ruta de biosíntesis del ácido siquímico**

Proporciona la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina o tirosina), y la síntesis de los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos). Es dependiente de la luz. Se inicia en los plastos por condensación de dos productos típicamente fotosintéticos, la eritrosa-4-fostato, procedente de la vía de las pentosas fosfato, y el fosfoenolpiruvato, originario de la glucólisis (García y Carril, 2011; Quiñones *et al.*, 2012).

### **2.2.4. La ruta de formación de los poliacetatos**

Proporciona las quinonas y las xantonas. Comienza a partir de una molécula inicial de acetilCoA, y a través de una serie de condensaciones se originan los poliacetatos. Por reducción de los poliacetatos se forman los ácidos grasos, y por ciclación posterior se forman una gran variedad de compuestos aromáticos (García y Carril, 2011; Pérez y Jiménez, 2011)

### **2.2.5. Flavonoides**

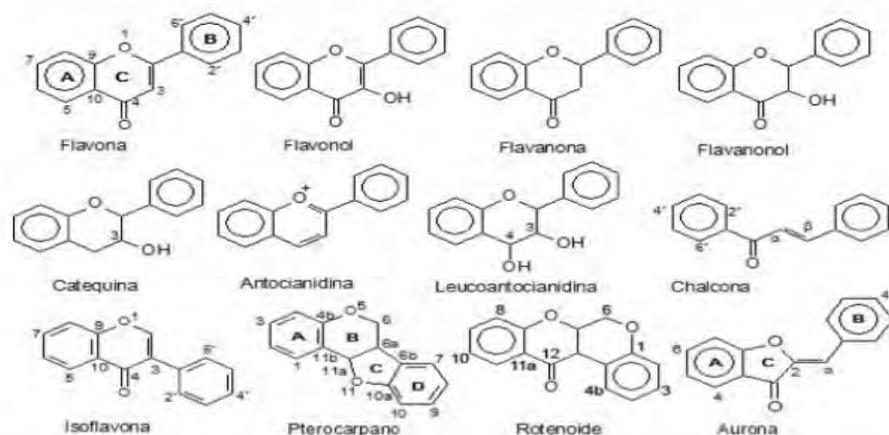
Constituyen un amplio y diverso grupo de metabolitos secundarios de plantas, constituyen la subclase de polifenoles más abundante dentro del reino vegetal.

Los flavonoides poseen un gran número de grupos hidroxilos formando glucósidos; son polares, por lo que son ligeramente solubles en disolventes polares, como el metanol, etanol, acetato de etilo o agua.

### **2.2.6. Taninos**

Constituyen un grupo de sustancias ampliamente distribuidas en el reino vegetal; se presentan como mezclas de polifenoles, muy difíciles de separar; con el agua forman disoluciones coloidales de reacción ácida y sabor astringente.

El ácido polifenólico más simple es el ácido gálico, por lo cual se utiliza como estándar para calcular la concentración de polifenoles en equivalentes de ácido gálico o quercetina (García y Carril, 2011).

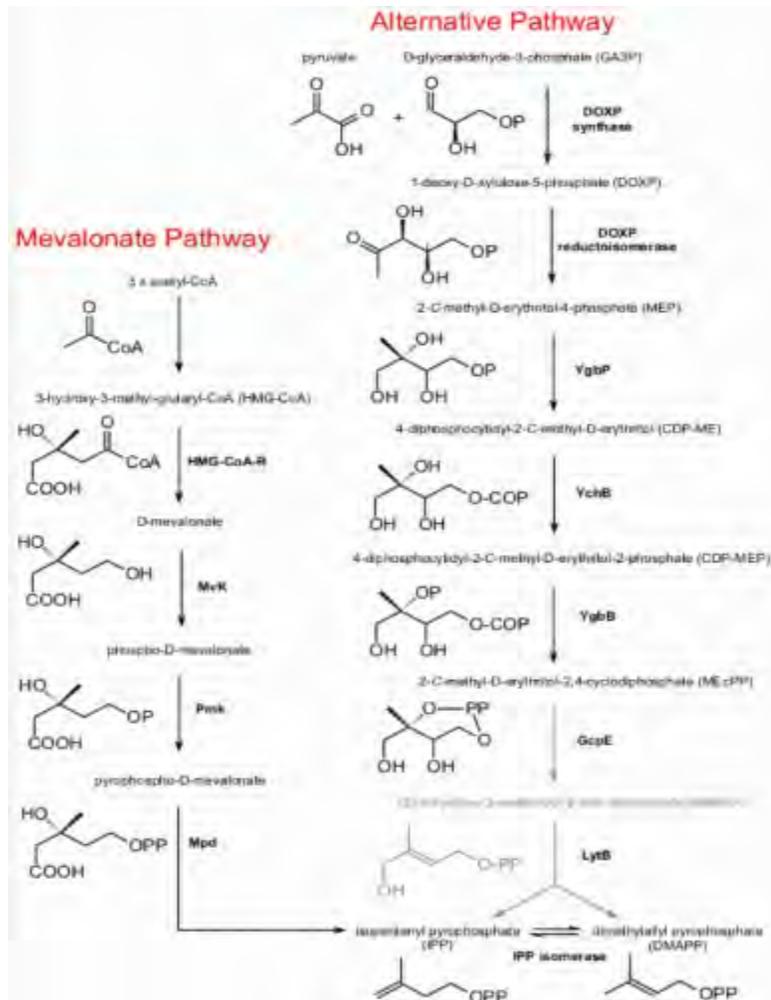


**Figura 5.** Estructura química de los principales grupos de flavonoides.

## 2.3 Terpenos

La ruta metabólica se inicia por condensación de dos moléculas de Acetil CoA, dando acetoacetil-CoA el cual se condensa a su vez con otra molécula de AcCoA originando 3- hidroxil-3-metilglutaril-CoA. Este compuesto se reduce para convertirse en ácido mevalónico (3,5-dihidroxil-3-metilvaleriánico) y posteriormente por fosforilación y descarboxilación, en isopentenilpirofosfato (IPP), el cual, por isomerización da lugar a dimetilalil-pirofosfato DAMPP), compuesto altamente reactivo. La condensación, mediante unión “cabeza-cola” de estos dos últimos compuestos, origina el geranil-pirofosfato (GPP) que posee 10 átomos de carbono y es precursor de un gran número de principios activos vegetales (Figura 6) (García y Carril, 2011; Viegas,2003).

El acoplamiento a este GPP de nuevas unidades de IPP origina moléculas de mayor peso molecular, incrementándose el número de carbonos de cinco en cinco: sesquiterpenos (C-15), diterpenos (C-20), triterpenos (C-30) (Viegas,2003)



**Figura 6.** Ruta metabólica de los terpenos.

Desde el punto de vista farmacéutico, los grupos de principios activos de naturaleza terpénica más interesantes son: monoterpenos y sesquiterpenos constituyentes de los aceites esenciales, derivados de monoterpenos correspondientes a los iridoídes, lactonas sesquiterpénicas que forman parte de los principios amargos, algunos diterpenos que poseen actividades farmacológicas de aplicación a la terapéutica y por último, triterpenos y esteroides entre los que se encuentran las saponinas y los heterósidos cardiotónicos (Viegas,2003; Cázarez, 2017).

Los aceites esenciales son mezclas complejas, normalmente líquidas, que presentan una característica: su volatilidad, por tanto, son extraíbles en corriente de vapor de agua.

### 2.3.1. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son producidos por plantas aromáticas, pertenecientes a diversas familias como: Apiaceae, Asteraceae, Cupressaceae, Hypericaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Pinaceae, Piperaceae, Rutaceae, Santalaceae, Verbenaceae, Zingiberaceae y Zygophyllaceae, entre otras (Başer y Demirci, 2007). Son una mezcla de compuestos volátiles (terpenos, alcoholes, ésteres, aldehídos y compuesto fenólicos) que son biosintetizados por la planta en flores, frutos, tallos, hojas y raíz; producto del metabolismo secundario vegetal y representan pequeñas cantidades con respecto al peso total de la planta (Bakkali *et al.*, 2008). Los aceites esenciales pueden ser obtenidos por diferentes métodos (Preedy, 2016; Cázarez, 2017):

#### Hidrodestilación

Es el método estandarizado para la extracción de aceites esenciales a partir de material vegetal como tallos, hojas, madera o flores, se aíslan productos naturales no solubles en agua con alto punto de ebullición; dicho proceso consiste en la completa inmersión de la planta en agua hasta su ebullición. Este método protege a los aceites extraídos de cierta degradación, ya que el agua circundante actúa como una barrera para evitar que se sobrecaliente.

#### Extracción con solventes

Se implementa para material vegetal como flores, semillas y hojas; se utilizan diversos solventes que generalmente se mezclan con la materia orgánica y se someten a calor o en ocasiones en frío para extraer los aceites esenciales, posteriormente se retira la materia orgánica, una vez filtrado se evapora el solvente para concentrar el aceite esencial. Sin embargo, los residuos que quedan en el producto final, pueden ser tóxicos para el ser humano (Günther, 1948).

#### Extracción por microondas

Es un método de rápida extracción para plantas aromáticas y semillas secas. Tiene la ventaja de presentar alta selectividad y obtención en corto tiempo, es una combinación de calentamiento con microondas y destilación en seco realizada a presión atmosférica sin ningún disolvente ni agua.

Para determinar qué método emplear, se debe considerar tanto la parte en la planta de la cual se realizará la extracción, como el uso del aceite esencial. Una inadecuada extracción influye en la calidad del aceite. Para la obtención de un aceite esencial considerado GRAS, los sistemas de extracción que utilizan vapor de agua, son los más aceptados por contener un alto contenido de compuestos aromáticos volátiles (terpenoides) y un mínimo de compuestos fenólicos de mediano y alto peso molecular, así como otros compuestos no deseables. (Cázarez, 2017).

### **2.3.2. Usos y propiedades de los aceites esenciales**

Se conocen cerca de 3,000 aceites esenciales, los cuales tienen uso cosmético, farmacéutico, perfumería y en la industria de los alimentos (saborizantes, fragancias en los alimentos). Esto se debe a sus propiedades antibacteriales, insecticidas, antioxidantes y antifúngicas. Al ser utilizados como aditivos en los alimentos, la FDA los ha clasificado como Sustancias Generalmente Reconocidas como Seguras (GRAS) (Burt, 2004).

## **2.4 Inflamación**

La inflamación es un proceso tisular, constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares, de finalidad defensiva frente a agresiones físicas, químicas o biológicas. Se caracteriza por tener los siguientes aspectos:

- 1) Respuesta focalizada en donde existe respuesta del organismo contra el agente agresor.
- 2) La respuesta inflamatoria inmediata, el foco inflamatorio atrae a las células inmunes de los tejidos cercanos.

Existen cuatro síntomas característicos del proceso de inflamación, los cuales son: calor, rubor, tumor y dolor.

La inflamación puede ser aguda o crónica, en función de la naturaleza del estímulo y la eficacia de la reacción inicial para eliminar el estímulo o los tejidos lesionados. La inflamación aguda se inicia de forma rápida (minutos) y dura poco, unas horas o pocos días; se caracteriza sobre todo por la exudación de líquido y proteínas plasmáticas (edema) Mitchell *et al.* (2017).

El proceso de inflamación se caracteriza por tener los siguientes pasos (Tabla 3) según Guisado *et al.* (1994):

**Tabla 3.** Proceso de inflamación.

<b>Procesos</b>	<b>Característica</b>
<b>Liberación de mediadores</b>	Son moléculas que se pueden generar a partir de células o de proteínas plasmáticas. Las de origen celular en su mayoría son liberadas por el mastocito (histamina) o pueden sintetizarse de novo (citocinas, prostaglandinas), bajo la actuación de determinados estímulos.
<b>Respuesta de los mediadores</b>	Una vez liberadas, estas moléculas producen alteraciones vasculares y efectos quimiotácticos que favorecen la llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio.
<b>Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio</b>	Proceden en su mayor parte de la sangre, pero también de las zonas circundantes al foco.
<b>Regulación del proceso inflamatorio</b>	Como la mayor parte de las respuestas inmunes, el fenómeno inflamatorio también integra una serie de mecanismos inhibidores tendentes a finalizar o equilibrar el proceso. Cuando se activan y liberan de la célula, la mayor parte de estos mediadores sobreviven poco tiempo; se degradan con rapidez (los metabolitos del ácido araquidónico) o son barridos por otros mecanismos (los antioxidantes barren los metabolitos del oxígeno tóxico).
<b>Reparación</b>	Fase constituida por fenómenos que van a determinar la reparación total o parcial de los tejidos dañados por el agente agresor o por la propia respuesta inflamatoria

La inflamación es caracterizada por alteraciones en la permeabilidad vascular y la producción de mediadores inflamatorios locales, como esteroides, prostaglandinas, histamina, serotonina, citocinas, quimiocinas y radicales libres de oxígeno. Mitchell *et al.* (2017)

### 2.4.1. Aminas vasoactivas: histamina y serotonina

Se llaman a sí porque tienen acciones importantes sobre los vasos. Se almacena en forma de moléculas preformadas en las células y por eso se encuentra entre los primeros mediadores de la inflamación.

Histamina: se encuentra en los gránulos de los mastocitos y se libera mediante desgranulación en respuesta a diversos estímulos.

Serotonina: es un mediador vasoactivo preformado, cuyas acciones se parecen a la histamina, está en plaquetas y en algunas células neuroendócrinas como las del aparato digestivo y en los mastocitos de los roedores, pero no de las personas.

### 2.4.2. Citocinas

Las citocinas son glucoproteínas extracelulares, hidrosolubles, con un peso molecular de entre 8 y 30 kDa que desempeñan funciones claves en el proceso inflamatorio, definido por un balance entre las que son proinflamatorias y antiinflamatorias (Oliveira *et al.*, 2011).

proinflamatorias están las interleucinas (IL) 1, 2, 6, y TNF- $\alpha$ .

**IL-1:** es un polipéptido de unos 15 a 20 kD, del que existen dos formas denominados IL 1 e IL 1  $\beta$ , ambas citocinas actúan sobre el mismo receptor, por lo que también compite el antagonista del receptor de la IL 1. Actúa principalmente intracelularmente y no se encuentra en circulación general, excepto en caso de enfermedad grave. Los macrófagos activados, son la principal fuente de los macrófagos activados; citocina que se destaca por su capacidad proinflamatoria. (Filella *et al.*,2002).

**IL2:** actúa al promover la células T, es producida principalmente por los linfocitos T activados. Efectúa su acción biológica a través de un receptor de membrana constituido por 3 subunidades  $\beta$ . En el individuo sano, existen 7 niveles del receptor soluble de la IL 2, mientras que en niveles superiores a los normales, pueden ser observados en numerosas enfermedades, hecho que refleja una excesiva activación linfocitaria. (Filella *et al.*,2002).

antiinflamatorias son las interleucinas 4, 10, 13 y el factor transformador de crecimiento  $\beta$  (FTC  $\beta$ ).

**IL10:** Está producida por los linfocitos T de tipo Th2 y con capacidad de inhibir la síntesis de IFN- $\gamma$  y de IL-2 por parte de los linfocitos T. Es la principal citocina antiinflamatoria, actuación que ejerce a través de la inhibición de la síntesis de IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  por parte de los macrófagos (Filella *et al.*,2002).

### **2.4.3. Quimiocinas**

Son una familia de proteínas pequeñas (8 a 10 kD) que actúan generalmente como quimiotaxinas para distintos tipos específicos de leucocitos. Realizan dos funciones fundamentales: estimulan el reclutamiento de los leucocitos en la inflamación y controlan la migración normal de las células a través de varios tejidos.

### **2.4.4. Metabolitos del ácido araquidónico (AA): prostaglandinas**

Cuando se activan las células por diversos estímulos, el ácido araquidónico de la membrana, se convierte con rapidez por acción enzimática y da lugar a las prostaglandinas y leucotrienos.

Estos mediadores lipídicos se comportan como señales intracelulares o extracelulares que influyen sobre diversos procesos biológicos, incluida la inflamación.

Prostaglandinas: se producen por los mastocitos, macrófagos, células endoteliales y muchos otros tipos y participan en las reacciones celulares y sistémicas de la inflamación. Se producen por acción de las ciclooxigenasas ( COX-1 y COX-2) (Mitchell *et al.* 2017)

### **2.4.5. Radicales libres**

La producción alta de radicales libres (óxido nítrico, peróxido de hidrógeno, radical/anión su peróxido) propicia el estrés oxidante y genera daños a nivel celular, que promueven la aparición que promueven la aparición de enfermedades crónicas degenerativas (Corrales *et al.*, 2012).

Los radicales libres, derivados del oxígeno, se pueden liberar a nivel extracelular de los leucocitos, tras su exposición al estímulo. Su producción depende de la activación del sistema de la NADPH oxidasa. El anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ), son las principales especies producidas dentro de las células, y el ( $O_2^{\cdot-}$ ) se puede combinar con el ON para dar lugar a especies reactivas de óxido nítrico.

La liberación extracelular de bajas concentraciones, de estos potentes mediadores, aumenta la expresión de quimiocinas, por ejemplo, la IL-8, citocinas y moléculas de adherencia leucocitarias endoteliales, de modo que amplifica la respuesta inflamatoria (Corrales *et al.*, 2012).

El suero, los líquidos tisulares y las células del anfitrión, disponen de mecanismos que les protegen frente a estos radicales derivados del oxígeno con capacidad lesiva. Estos antioxidantes son: la enzima superóxido dismutasa, que se encuentra o se activa en distintos tipos celulares; la enzima catalasa que detoxifica H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; glutatión peroxidasa, otro potente detoxificador de peróxido. Por tanto, la influencia de los radicales libres, derivados de oxígeno, en cualquier reacción inflamatoria, depende del equilibrio entre la producción y la inactivación de estos metabolitos, en las células y tejidos (Corrales *et al.*, 2012; Mitchell *et al.* 2017).

La artritis reumatoide es una enfermedad que se caracteriza por la inflamación de las articulaciones, puede causar deformidad e incapacidad funcional. Se presenta con mayor frecuencia en las mujeres, especialmente entre los 30 y 50 años de edad, pero también puede presentarse en hombres o a cualquier edad. Esta enfermedad afecta 0.5 % - 2% de la población mundial, se considera que el 0.3% de la población de México padece artritis reumatoide (Martínez, 2008). Actualmente, existe una gran variedad de tratamientos farmacéuticos o de medicina alternativa que favorece la disminución de síntomas, de los cuales, pocos son capaces de retardar o incluso detener su avance. En estudios realizados a la resina de *Boswellia carteri* y *Boswellia serrata*, esta ha sido usada para el tratamiento de artritis reumatoide y otras enfermedades inflamatorias en la medicina tradicional en muchos países. Estas propiedades se les atribuye a los terpenos (Banno *et al.*, 2006).

Respecto a la actividad antiinflamatoria, de los aceites esenciales de la hoja de *Aloysia triphylla* Britton, se le atribuye al citral, principal componente del aceite. Se ha informado de diversas actividades biológicas del citral, tales como la antiinflamatoria, en el modelo de edema de pata inducido por carragenina (Ponce *et al.*, 2010).

## **2.5. Nanoencapsulación**

La nanoencapsulación de moléculas bioactivas comprende la formación de partículas coloidales sólidas de tamaño nanométrico (1 a 100 nm de longitud), en cuyo interior se encuentra el ingrediente activo, el cual puede estar encapsulado o químicamente unido. Cuando la partícula es suficientemente pequeña, ésta puede simplemente deslizarse a través de la membrana de la célula, en un proceso conocido como penetración. Se pueden utilizar moléculas bioactivas hidrofílicas

como hidrofóbicas, las cuales dependen del material de pared (Tabla 4) para una liberación controlada (Jawahar y Meyyanathan, 2012; Madureira *et al.* 2015).

### **2.5.1. Métodos para obtener nanopartículas**

#### **Secado por aspersión**

Es un proceso basado en el secado de partículas atomizadas en un flujo de aire caliente. Consiste en la atomización de una mezcla acuosa del material de pared con la solución bioactiva para formar partículas pequeñas, a partir de la evaporación del solvente. Durante el proceso, es necesario controlar una serie de parámetros como la temperatura, el % de aspersión, la velocidad de flujo, la presión de atomización (Madureira *et al.* 2015).

#### **Precipitación**

Este método se basa en la baja solubilidad de algunos materiales de pared en medios alcalinos. Por ejemplo, para la obtención de nanopartículas a base de quitosano, se utiliza una solución alcalina de hidróxido de sodio e hidróxido de potasio, en algunos casos se utiliza como solventes al metanol o etanol. Esta solución es impulsada mediante aire comprimido hacia una boquilla, el tamaño se puede controlar variando el tamaño de la boquilla y la presión del aire (Madureira *et al.* 2015).

### **2.6. Biopelícula**

Las películas comestibles son redes poliméricas cuya forma se asemeja a la de una capa uniforme y delgada, estas matrices elaboradas con materiales biodegradables (Tabla 4) muestran un alto potencial para contener ingredientes activos, como pueden ser agentes antioxidantes, colorantes, saborizantes, nutrientes y agentes antimicrobianos, estas películas pueden ayudar a alargar la vida útil del compuesto bioactivo ya que estas actúan como barrera al agua y a los gases (oxígeno y dióxido de carbono) los cuales pueden oxidar a los antioxidantes antes de ser consumidos lo cual disminuye su actividad favorable en el organismo otra ventaja de las películas es su bajo costo de elaboración (Antunes *et al.*, 2012; Zúñiga *et al.*, 2012; Peyron, 1991).

#### **2.6.1. Proceso de elaboración de biopelículas**

Los procesos de formación de las películas comestibles, pueden ser por método húmedo y moldeo por compresión. En ambos el material que forma la película

debería de formar un gel que incorpore todos los agentes que forman la película, tales como biopolímeros, plastificantes u otros aditivos. La diferencia entre estos métodos, es debido a que el método húmedo parte de una mezcla del material filmogénico con solvente, los cuales pueden ser agua, etanol o la combinación de estos, después se secan para eliminar el solvente y así formar la estructura de la película. Para el método por compresión se forma la mezcla de los componentes de la película, se le aplica una presión y una temperatura durante un tiempo establecido, para lograr así la formación de la película (Peyron, 1991; Jung H. Han, 2014).

En estudios previos se ha demostrado que la incorporación de polifenoles en las biopelículas induce cierta capacidad antioxidante (Gómez et al., 2007). Bonilla et al., (2013) estudió el efecto de la incorporación de aceites esenciales de albahaca, tomillo, ácido cítrico y  $\alpha$ -tocoferol en sus propiedades físicas, mecánicas y estructurales en films de almidón de trigo y quitosano.

## 2.7. Componentes químicos usados en la elaboración de biopelículas y nanocápsulas

Las siguientes moléculas mostradas en la Tabla 4 producen un elevado aumento de la viscosidad y en algunos casos tienen efectos gelificantes, los cuales producen redes necesarias para la formación de películas y nanocápsulas.

**Tabla 4.** Principales moléculas formadoras de biopelícula.

<b>Moléculas</b>	<b>Ejemplos</b>	<b>Características</b>
<b>Polisacáridos</b>	Almidones Alginatos Gomas Pectinas Mucílagos Quitosano	Sus aplicaciones son variadas ya que poseen buenas propiedades de barrera frente al O <sub>2</sub> a fin de retrasar el proceso de maduración en frutas y vegetales.
<b>Proteínas</b>	Caseína Colágeno	Los recubrimientos resultan ser frágiles; por lo cual se utiliza un agente plastificante, como el alcohol polivinílico y glicerol, entre otros.
<b>Lípido</b>	Cera	La característica negativa de estas sustancias, es su escasa capacidad para formar recubrimientos, no poseen suficiente integridad estructural ni durabilidad.

### **2.7.1. Polisacáridos**

La mayoría de los glúcidos naturales son polisacáridos o polímeros de alto peso molecular. Constituyen la forma más generalizada, aunque no la única, de reserva energética en vegetales. Algunos otros son carbohidratos complejos y son ampliamente usados como formadores de películas (Martínez., 2008).

### **2.7.2. Alginatos**

El alginato es un polisacárido distribuido ampliamente en las paredes celulares de las algas marinas, constituido por los ácidos D-manúronico y L-gulurónico. Muchos alginatos son usados frecuentemente como espesantes, estabilizantes de emulsiones, gelificantes, inhibidores de sinéresis y como mejoradores de la sensación en boca. Alginato de sodio E 401 es un aditivo inofensivo que se utiliza en las industrias alimenticias como agente espumante y recientemente como agente gelificante.

### **2.7.3. Mucílagos**

El mucílago es una sustancia vegetal viscosa. Se puede considerar como hemicelulosas neutras (con bajos contenido en ácidos urónicos) (Martínez., 2008). Está formada por: L-arabinosa, D-xilosa, D-Galactosa, y trazas de L-ramnosa. Son utilizados para suspender sustancias insolubles y para aumentar la viscosidad.

En la industria se utiliza la semilla del plátano como materia prima para la extracción. En la actualidad se buscan diferentes materias primas para la extracción, entre algunas de ellas se encuentran el nopal (*Opuntia spp*) (Martínez., 2008).

### **3. Justificación**

Las plantas producen una gran diversidad de compuestos que pueden contribuir con diferentes propiedades de interés como la actividad antioxidante y capacidad antiinflamatoria, por lo que es importante realizar estudios que confirmen estas propiedades, así como identificar sus compuestos activos. Las hojas de *Aloysia citriodora* y otras especies cercanas, son utilizadas como medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades, en algunos casos en procesos relacionados con la inflamación. Es por ello, que se consideró en este estudio, realizar investigación de sus hojas para la determinación de su actividad antioxidante y antiinflamatoria, relacionando esta propiedad con su contenido de metabolitos secundarios y la forma factible de adicionarlos en una biopelícula para facilitar el consumo y preservación de estos.

### **4. Hipótesis**

Los compuestos bioactivos de las hojas del cedrón (*Aloysia citriodora*) tendrán un efecto antiinflamatorio, y estos se podrán nanoencapsular e incorporar en una biopelícula comestible.

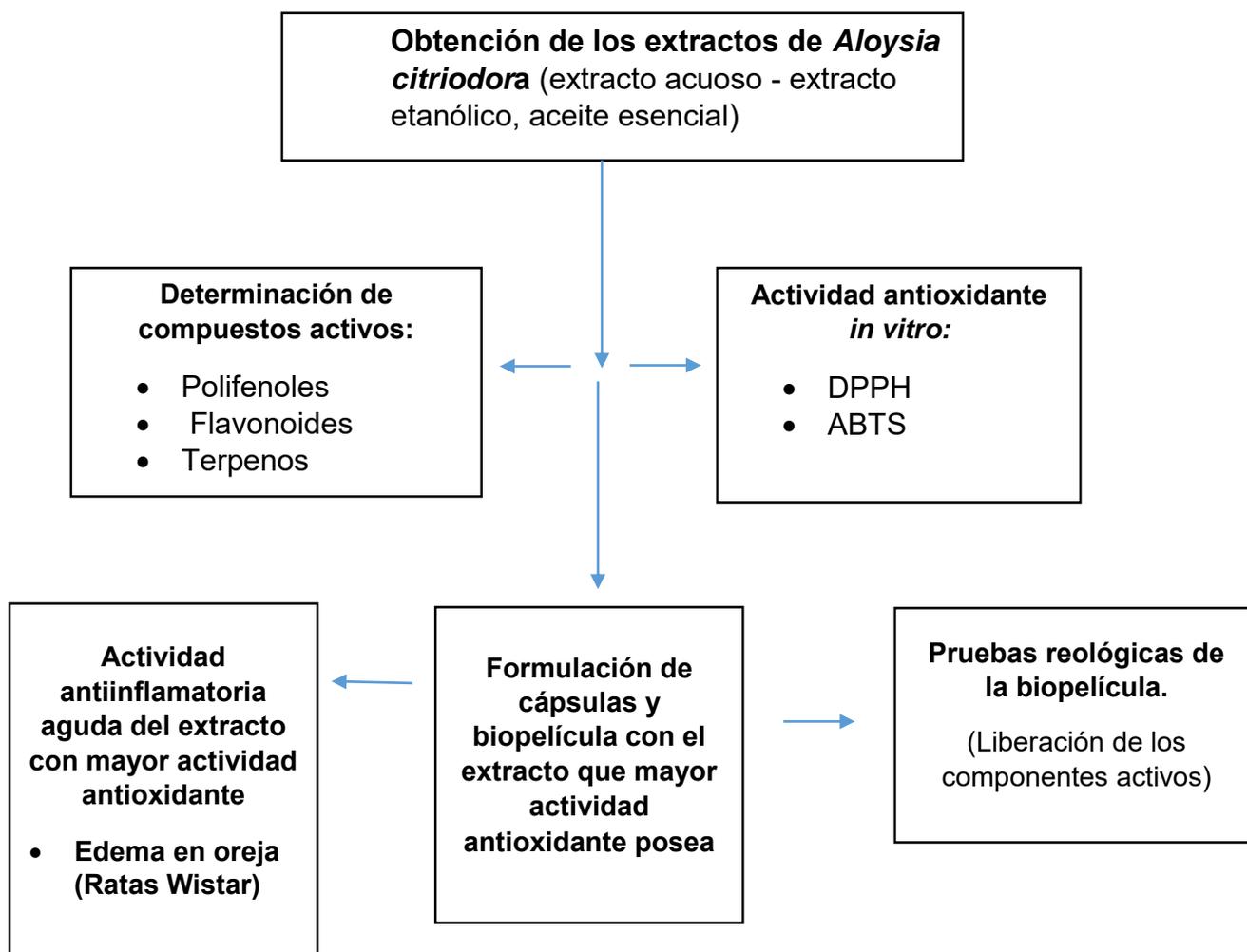
### **5. Objetivo general**

Elaborar una biopelícula comestible adicionada con nanocápsulas del extracto (con mayor actividad antioxidante) de hojas de cedrón con efecto antiinflamatorio, evaluado en un modelo de ratas Wistar, inducidas con edema auricular.

#### **5.1. Objetivos específicos**

1. Obtener los extractos (etanólico, acuoso y aceite esencial) de las hojas de cedrón, realizar su caracterización química y determinar su capacidad antioxidante.
2. Nano-encapsular el extracto (con mayor actividad antioxidante) de las hojas de cedrón basado en un diseño experimental que considere las mejores propiedades reológicas de los agentes encapsulantes.
3. Caracterizar morfológicamente las nano-cápsulas.
4. Realizar pruebas de liberación del extracto encapsulado.
5. Formular la biopelícula a partir de la mejor proporción de componentes para su mejor degradación y liberación de nano-cápsulas.
6. Evaluar el impacto del consumo del extracto en ratas Wistar, a las cuales se les inducirá edema auricular, determinando el volumen de la inflamación.

## 6. Estrategia experimental



## 7. Materiales y métodos

### 7.1. Plantas

La muestra se recolecto en Morelia Michoacán, se le retiraron ramas y flores, las hojas se secaron bajo sombra a temperatura ambiente. Para la extracción etanólica y acuosa se molieron las hojas y se tamizaron usando el tamiz con malla de 0.8 mm de diámetro; para la hidrodestilación se ocuparon las hojas enteras.



**Figura 7.** Hojas de cedrón.

### 7.2. Métodos de extracción

#### 7.2.1. Extracción etanólica

La obtención del extracto etanólico se realizó por maceración a temperatura ambiente durante 24 h, utilizando una relación de 1:10 (masa de las hojas /volumen disolvente), con una agitación de 100 rpm utilizando un Agitador Orbital Multipropósito CVP 2000P. Después de las 24 h el extracto se filtró a través de papel filtro comercial y se evaporó en un Rotaevaporador RE500 a una temperatura de 45 °C a 40 cmHg.

El extracto uno se disolvió en DMSO en una proporción de 2 mg/ml.



**Figura 8.** Evaporación del etanol para concentrar el extracto.

### **7.2.2. Extracción acuosa**

El extracto acuoso se obtuvo mediante maceración a 70 °C por 10 min en una relación de 1:10. Se filtró utilizando papel filtro 2.5 micras como requerimiento para secar en el equipo Nano spray dryer B 90. Las condiciones de secado fueron las siguientes: Spray 60%, Temperatura 97 °C, Presión 32 mbar.



**Figura 9.** Secado del extracto acuoso en Nano spray dryer B 90.

### **7.2.3. Hidrodestilación**

La obtención del aceite esencial y agua floral se realizó por el método de hidrodestilación directa, a una temperatura de 95 °C en una relación de 1:10. El

tiempo de hidrodestilación lo define la cantidad de agua evaporada, para este ensayo el tiempo de hidrodestilación fue hasta que se evaporara la mitad de agua.

El agua evaporada se vertió en un embudo para la separación del aceite esencial, el aceite recuperado fue almacenado en refrigeración hasta su uso.

Para determinar el rendimiento del aceite esencial se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de rendimiento} = \left( \frac{M_1}{M_2} \right) \times 100$$

Donde:

M1=masa final de aceite esencial      M2= masa inicial de parte aérea de la planta



**Figura 10.** Equipo de Hidrodestilación para obtener el aceite esencial.

### 7.3. Pruebas Antioxidantes

La capacidad antioxidante de los extractos puede ser medido por ensayos *in vitro* a partir de moléculas cromóforas, que cambian de color al aceptar un electrón o protón; se clasifican como ensayos basados en una transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT) o ensayos basados en transferencia de electrones (ET) (Camarena *et al.*, 2018). Estas técnicas son ensayos espectrofotométricos en donde se asocia la absorbancia con la concentración de las moléculas.

#### 7.3.1. Polifenoles totales

Los polifenoles totales se cuantificaron utilizando la metodología de Taga *et al.* (1984) con algunas modificaciones, a una longitud de onda de 750 nm.

##### Preparación de reactivos

Preparación del NaCO<sub>3</sub> 2%: 1 g de NaCO<sub>3</sub> se disolvieron en 50 ml de agua, la disolución se sónico por 2 min a temperatura ambiente.

Folin 1N: El reactivo de Folin comercial (2N) se diluyó en una proporción 1:1 con agua destilada.

##### Metodología

La curva de calibración se realizó utilizando una solución madre de ácido gálico (0.2 mg/ml) donde se tomaron las siguientes concentraciones (20, 16, 12, 9, 8,6,3, 2.4,2,0 µg de ácido gálico), para la construcción de la curva. Por triplicado, se dosificaron las siguientes cantidades:

**Tabla 5.** Preparación de la curva de calibración para medir polifenoles totales.

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ácido Gálico (µL)	0	10	12	15	30	40	45	60	80	100
Agua(µL)	100	90	88	85	70	60	55	40	20	0
Folin 1N(µL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>Agitación y reposo por 2 minutos</b>										
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 2% (µL)	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
<b>Agitación y reposos por 30 minutos</b>										
<b>Lectura a 750 nm</b>										



**Figura 11.** Reacción colorimétrica del ácido gálico a diferentes concentraciones.

### Preparación de las muestras

La muestra del extracto pulverizado se preparó a una concentración de 2 mg/mL agua (M1).

Para el extracto etanólico se tomaron 100  $\mu\text{L}$  y se disolvió en 1 mL de agua (M2).

Para el agua floral se tomaron directamente 100  $\mu\text{L}$  (M3).

Se realizó la siguiente dosificación para la muestra por triplicado.

**Tabla 6.** Preparación del extracto.

<b>Extracto (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	100
<b>Folin 1N (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	100
<b>Agitación y reposo por 2 min</b>	
<b><math>\text{Na}_2\text{CO}_3</math> 2% (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	2000
<b>Agitación y reposos por 30 min</b>	
<b>Lectura a 750 nm</b>	

### 7.3.2. Flavonoides totales

La cuantificación de flavonoides se realizó mediante la metodología de Dewanto (2002) a una longitud de onda de 415 nm, con algunas modificaciones.

#### Preparación de reactivos

Preparación del  $\text{AlCl}_3$  2 % (m/v): 0.2 g de  $\text{AlCl}_3$  se disolvieron en 10 mL metanol al 50 %, la disolución se sónico por 5 min.

La curva de calibración se realizó utilizando quercetina a diferentes concentraciones (0-50  $\mu\text{g}$ ).

#### Metodología

La curva de calibración se realizó utilizando una disolución madre de quercetina a 0.02 mg/mL donde se tomaron las siguientes concentraciones (35,20, 15, 10, 5, 0  $\mu\text{g}$ ) para la construcción de la curva. Por triplicado, se dosificaron las siguientes cantidades:

**Tabla 7.** Preparación de la curva de calibración para Flavonoides.

<b>Tubo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Quercetina (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	0	200	400	600	1200	1400
<b>Metanol 50 % (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	2000	1800	1600	1400	800	600
<b><math>\text{AlCl}_3</math> (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	500	500	500	500	500	500
<b>Agitación y reposos por 30 min.</b>						
<b>Lectura a 415 nm</b>						



**Figura 12.** Reacción colorimétrica de quercetina a diferentes concentraciones.

### Preparación de las muestras

La muestra del extracto pulverizado se preparó a una concentración de 0.1 mg/mL de metanol al 50 % (M1).

Para el extracto etanólico se tomaron 500 µL y se disolvieron en 10 mL de metanol al 50 % (M2).

Para el agua floral se tomaron directamente 100 mL (M3).

### 7.3.3. Radical DPPH. (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo)

La capacidad para capturar radicales libres de los extractos fue determinada utilizando como referencia la capacidad de atrapar el radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH). Esta determinación se realizó utilizando la metodología de Brand *et al.* (1994) a una longitud de onda de 515 nm.

### Preparación del radical y extractos

El reactivo 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) se preparó a una concentración de  $6 \times 10^{-5}$  M utilizando como diluyente al metanol. Una vez preparado el radical, la absorbencia se midió y se ajustó a 0.672.

El extracto acuoso se preparó a una concentración de 2 mg/ml en 5ml de metanol al 50% donde se tomaron diferentes concentraciones de extracto: 100 ,33.5 ,18.18 µg. Para el extracto etanólico se dosificaron las siguientes cantidades 50, 30, 9 µL.

**Tabla 8.** Preparación del extracto.

Extracto	100 µL
DPPH	1900 µL
Reposo por 6 minutos	
Lectura a 515 nm	

Para obtener el porcentaje de inhibición se realiza la siguiente formula:

$$\% \text{ inhibición} = \left( \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \right) * 100$$

$A_0 = \text{Absorbencia del DPPH}$        $A_1 = \text{Absorbencia del Extracto} + \text{DPPH}$   
 $A_0 = 0.672 \pm 0.066.$



**Figura 13.** Reacción colorimétrica del extracto acuoso frente al radical DPPH.

#### **7.3.4. Radical ABTS 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6- sulfónico)**

La capacidad para capturar radicales libres de los extractos fue determinada utilizando como referencia la capacidad de atrapar el radical ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6- sulfónico) (ABTS). Estos ensayos se realizaron con la metodología de Okoh (2015). En este ensayo, la molécula ABTS se convierte en su radical catiónico por adición de persulfato de sodio o potasio. Este radical es de color azul y absorbe a una longitud de onda de 734 nm.

#### **Preparación del radical y extractos**

El reactivo ABTS se preparó a una concentración de 7 mM utilizando como diluyente al metanol. Una vez disuelto el ABTS, se tomaron 25 mL y se mezclaron con 25 mL de persulfato de potasio disuelto en agua, a una concentración de 2.45 mM. La formación del radical se dejó por 24 h en refrigeración y oscuridad, después de las 24 h, la absorbancia del radical se midió y se ajustó a 0.62.

#### **Metodología**

Se preparó ácido gálico a una concentración de 0.0032 mg /ml. Con este reactivo se realizó una curva de calibración a diferentes concentraciones: 0-1.6 µg de ácido gálico.

**Tabla 9.** Preparación de la muestra.

Muestra	500 µL
ABTS	1500 µL
Reposo por 5 minutos	
Lectura a 515 nm	

#### **7.4. Elaboración de las nano partículas del extracto acuoso y observación morfológica por Microscopía Electrónica de Barrido.**

El extracto acuoso obtenido mediante maceración, se mezcló con diferentes concentraciones de material de pared en relación a los sólidos del extracto (1:1,1:2,1:3), siendo los materiales de pared el maltodextrina y caseinato de sodio.

La solución se filtró, utilizando papel filtro de 2.5 micras como requerimiento para secar en el equipo Nano spray dryer B 90.

Las condiciones de secado fueron las siguientes: Spray 70%, Temperatura 97 °C, Presión 32 mbar.

Posteriormente se analizaron las cápsulas del extracto, utilizando el microscopio electrónico de barrido JSM- 7600F, donde se utilizaron diferentes aumentos X1,000, X2,000 y X5,000 con una resolución de 2.00 kV Lei.



**Figura 14.** Microscopio electrónico de barrido JSM- 7600F.

##### **7.4.1. Contenido de polifenoles en las cápsulas del extracto acuoso**

Los polifenoles totales de las cápsulas se cuantificaron, metodología de Taga *et al.* (1984), con algunas modificaciones, a una longitud de onda de 750 nm.

##### **Preparación de las muestras**

La muestra del extracto pulverizado, se preparó a una concentración de 10 mg.

La muestra de las cápsulas de extracto, se preparó a una concentración de 10 mg.

La muestra de Maltodextrina, se preparó a una concentración de 10 mg

#### 7.4.2. Espectrometría infrarroja del extracto acuoso

El extracto y las cápsulas del extracto (1:2) se sometieron a análisis de espectrofotometría de infrarrojo, para la identificación de grupos funcionales presentes. Se utilizó un equipo IFTR (Vertex 70), empleando una longitud de onda  $600 - 4000 \text{ cm}^{-1}$  en el cual se colocaron pequeñas muestras de los extractos secos obtenidos.

#### 7.4.3. Tamaño de partícula

El tamaño de partícula, se analizó con el Nano Particle Analyzer SZ-100, donde primero se estudió un estándar para verificar su funcionamiento, mediante la metodología de Horiba (2009)

### Metodología

- 1) 120 mL de KCl se prepararon a una concentración 0.01M.
- 2) En un matraz se añadieron 25 g de 50 % de concentrado de LUDOX, posteriormente la disolución de KCl se agregó hasta llegar a 125 g.
- 3) En la celda de plástico se adicionaron 15 gotas del estándar de 30 nm.
- 4) 10 mL de la disolución de *KCl/LUDOX* se filtraron con filtro de  $2.5 \mu\text{m}$ , posteriormente y se utilizó el equipo SZ-100 con las condiciones mostradas en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Condiciones de medición.

<b>Temperatura</b>	25 °C
<b>Partícula</b>	LUDOX (1.45 - 0.000 i)
<b>Medio de dispersión</b>	Agua
<b>Celda</b>	Plástico
<b>Tipo de distribución</b>	Monodisperse Narrow

Se analizó el tamaño de partícula del extracto acuoso y de la formulación 1:2 con maltodextrina, se tomó una disolución con 1 mg muestra /mL de agua, se utilizó el equipo SZ-100 con las condiciones mostradas en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Condiciones de medición para el extracto acuoso.

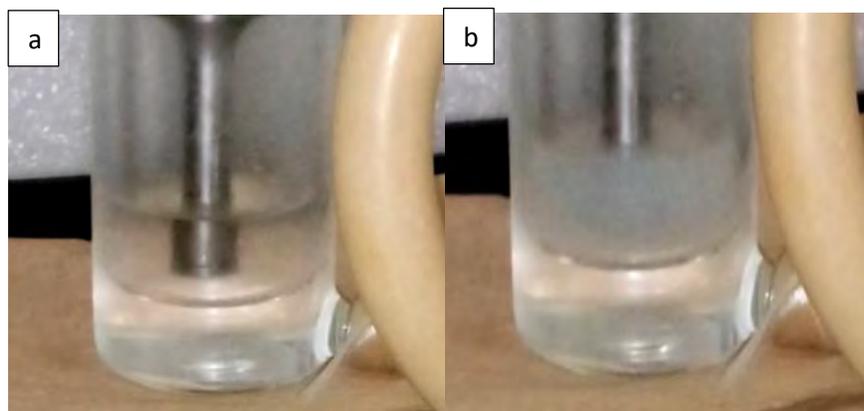
<b>Temperatura</b>	25 °C
<b>Partícula</b>	Mezcla orgánica (Software)
<b>Medio de dispersión</b>	Agua
<b>Celda</b>	Plástico
<b>Tipo de distribución</b>	Monodisperse Narrow

### 7.5. Emulsión y estabilidad del aceite

Para la elaboración de la emulsión, se utilizó la siguiente formulación: 50 g de agua destilada, 1 g de maltodextrina, 0.20 g de aceite y 0.08 g tween 80, esta mezcla se agitó por 20 min a 35 °C, empleando la técnica de Aldemar Gordillo (2014) modificada, dónde se utilizó el Ultrasonicador VCX 500, a una temperatura de 10 °C, una amplitud de 25% por 10 min.



**Figura 15.** Ultrasonicador VCX 500.



**Figura 16.** Formación de la emulsión por la fuerza sónica. a) Inicio, b) después de 10 min.

La estabilidad de la emulsión se midió empleando las técnicas mostradas por Nauman *et al.* (2017), utilizando como respuesta el tamaño de partícula con el Nano Particle Analyzer SZ-100. Las pruebas de estabilidad consistieron en centrifugación y ciclo de congelación-descongelación.

Las condiciones del equipo fueron las siguientes:

<b>Temperatura</b>	25 °C
<b>Partícula</b>	Mezcla orgánica (Software)
<b>Medio de dispersión</b>	Agua
<b>Celda</b>	Plástico
<b>Tipo de distribución</b>	Monodisperse Narrow

### 7.5.1. Centrifugación

Las emulsiones seleccionadas se centrifugaron en la centrífuga Velaquin (modelo 80-2) a 3.500 rpm durante 5,10,15 min.

### 7.5.2. Ciclo de congelación y descongelación.

Se realizó un ciclo de congelación-descongelación para las emulsiones entre - 15 y 25 °C.

## **7.6. Elaboración de las nano partículas de aceite y microscopía electrónica de barrido**

La emulsión obtenida mediante el ultrasonicador se pulverizó en el Nano spray dryer B 90. Las condiciones de secado fueron las siguientes: Spray 70%, Temperatura 95 °C, Presión 32 mbar.

Posteriormente se analizaron las cápsulas del aceite, utilizando el microscopio electrónico de barrido JSM- 7600F, donde se emplearon las siguientes condiciones diferentes: SEI MAG 2000x, HV:15.0 kV, WD:24.00mm.

### **7.6.1. CG-MS del aceite**

El aceite esencial fue analizado en el cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A GC System, acoplado a masas con las siguientes condiciones: se inyectaron 2  $\mu\text{L}$  de muestra a una velocidad de inyección de 50.00  $\mu\text{L}$ , usando helio como gas acarreador con un flujo de 1 mL/min, con una relación dividida (Split 5:1), usando una columna DB-5 ms: 1897-60013 (325°C: 60 m X 250  $\mu\text{m}$  X 0.25  $\mu\text{m}$ ), para el horno un temperatura inicial de 40 °C durante 10 min, seguida de una rampa de 3 °C/min hasta alcanzar 140 °C por 20 min, otra de 3 °C/min hasta los 220 °C por 5 min y una más de 10 °C/min hasta llegar a 260 °C por 5 min. El espectro de masas a una velocidad de 1 mL/min con una energía de 69.922 eV, con una temperatura de fuente masas de 230 a 250 °C y del cuadrupolo de 150 °C a 200 °C, en modo SCAN y un intervalo de masas de 33.0 a 600.0  $\text{m z}^{-1}$



**Figura 17.** Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A GC System.

### 7.6.2. Contenido de terpenos en las cápsulas

El protocolo describe un ensayo rápido, a pequeña escala y de alto rendimiento para aproximar el contenido total de terpenoides en el tejido vegetal, cápsulas o aceite. Utilizando un monoterpeno, el linalool como reactivo estándar con ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ).

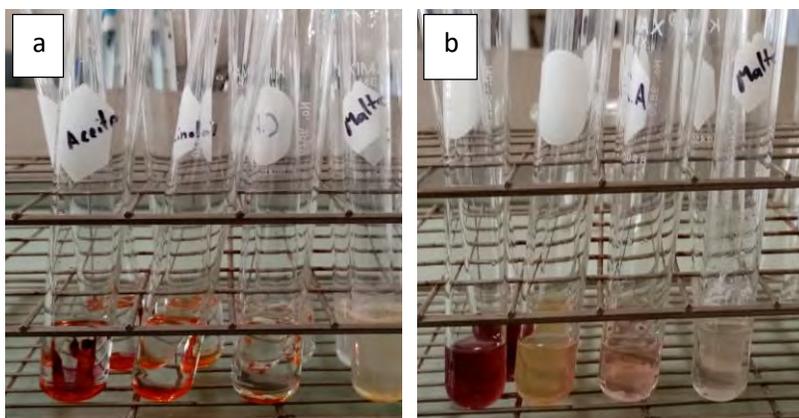
Se realizó la prueba de Ghorai *et al.* (2012) para la medición de terpenos totales de la muestra de aceite y de las cápsulas de aceite con un estándar, en este caso, linalool.

Se preparó una concentración de 100  $\mu L$  de linalool en 1 ml de cloroformo, posteriormente se tomaron alícuotas de (0, 55.5, 111, 166, 332  $\mu L$ ), agregándole 3ml de cloroformo a cada una, se agitaron en Vortex y reposaron 3 min. Se agregaron 100  $\mu L$  de  $H_2SO_4$  concentrado sin agitar, posteriormente se dejaron incubar a 1 h en obscuridad. Después de la hora, se desechó con cuidado el sobrenadante sin que el precipitado se disolviera, el precipitado se disolvió en 3 ml de metanol al 95% (v/v) y se agito en un Vortex por 1 min. Después se midió la muestra en el espectrofotómetro de UV- Visible a 538 nm.

Las muestras se prepararon de la siguiente manera: 20  $\mu L$  de aceite esencial, 0.001g de cápsulas de aceite y 0.001g de maltodextrina se colocaron en 3 ml de cloroformo. Se agitaron en Vortex y reposaron 3 min; se agregaron 100  $\mu L$  de  $H_2SO_4$  concentrado sin agitar, posteriormente se dejaron incubar a 1 h en obscuridad. Después de la hora se desechó con cuidado el sobrenadante, sin que el precipitado se disolviera, ya que debió de disolverse en 3 ml de metanol al 95% (v/v) y agitando en el Vortex por 1 min. Después se midió la muestra en el espectrofotómetro de UV-Visible a 538 nm.



**Figura 18.** Curva de calibración para cuantificación de Terpenos.



**Figura 19.** a) Extracción de los terpenos de las diferentes muestras. b) Terpenos disueltos en metanol después de la extracción.

### 7.6.3. Espectrometría infrarroja del extracto aceite y cápsulas

El aceite esencial y las cápsulas se sometieron a análisis de espectrofotometría de infrarrojo, para la identificación de grupos funcionales presentes. Se empleó un equipo IFTR (Vertex 70), empleando una longitud de onda  $600 - 4000 \text{ cm}^{-1}$  en el cual se colocaron las muestras.

### 7.7. Elaboración de la película

Las pruebas para la formulación de película se hicieron por triplicado, a tres de ellos se adicionaron las cápsulas del extracto con maltodextrina.

Para la realización de la película en un matraz de Erlenmeyer se agregó 0.1 g de alginato de sodio, 0.050 g de Agar-Agar, 0.070 g de alcohol polivinílico y goma arábica 0.07 g en 98 ml de agua desionizada.

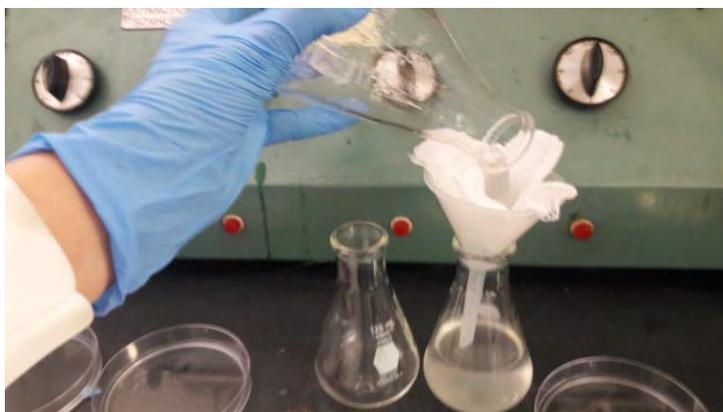
Esta mezcla se llevó a una parrilla de calentamiento, a una temperatura de  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 min, hasta observarse homogenizado; después de alcanzar la temperatura

ambiente, se adicionó 0.5 g del extracto acuoso encapsulado con maltodextrina a uno de los matraces.



**Figura 20.** Calentamiento preparación de muestra para película.

Una vez homogenizado la mezcla, se llevó a filtrado con ayuda de un embudo y gasas. Se vertieron 30 ml de la mezcla ya filtrada a las cajas Petri y se llevó al horno durante un periodo de 24 h.



**Figura 21.** Filtrado del homogenizado de película.

#### **7.7.1. Pruebas en películas**

Las películas se secaron durante 24 h en un horno a una temperatura de 43°C, una vez secas se desprendieron de la caja Petri y se recortaron en láminas de 1x3 cm. Con un micrómetro digital se midió el espesor de las películas en milímetros.



**Figura 22.** Secado en horno por un periodo de 24 h y películas formadas.

### **7.7.2 Determinación de solubilidad en agua de las películas elaboradas**

Se recortaron las películas en trozos de 2 X 2 cm; se colocaron a peso constante; posteriormente se colocaron en tubos de ensayo con 10 mL de agua desionizada, se agitaron a 100 rpm por 15 min a una temperatura de 34°C. Transcurrido el tiempo se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min, se decantó el sobrenadante y los tubos con la película, se colocaron en un horno a 90 °C por 24 h. Se pesaron de nuevo los tubos y con la siguiente ecuación, se determinó el porcentaje de masa total soluble.

$$\%TSM = \left( \frac{W1 - W2}{W1} \right) * 100$$

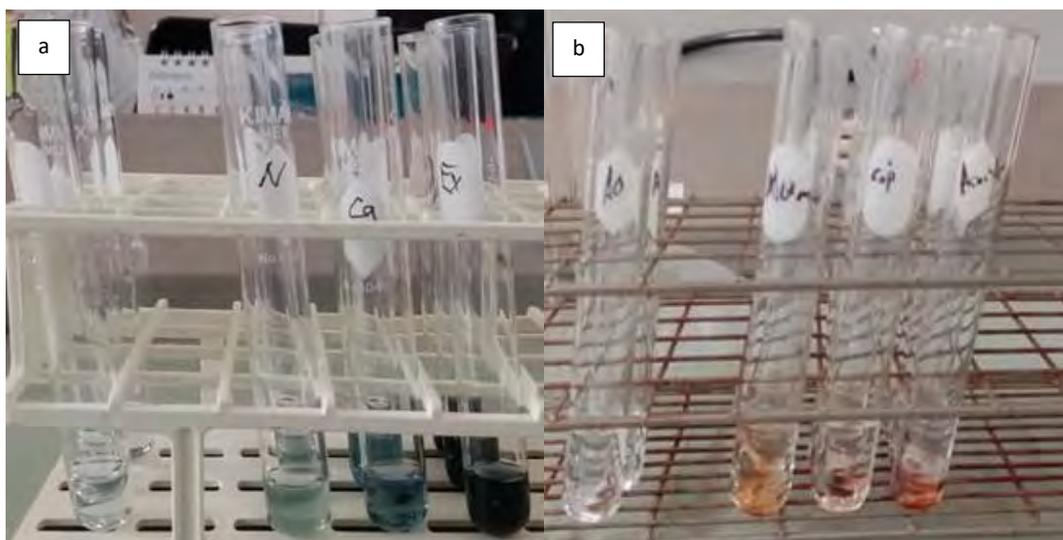
Donde W1 y W2 son la masa seca inicial antes de las pruebas y la masa seca final después de la prueba.

### **7.7.3. Determinación de polifenoles y terpenos en las películas**

La elaboración de las películas se realizó la metodología anterior donde se adiciono a cada caja petri 25 ml de la solución filmogénica y 5 ml de los extractos con las siguientes concentraciones: para el extracto acuoso fueron 15 mg/ml, para las cápsulas del extracto acuoso fueron 30 mg/ml, para el aceite emulsionado fueron 1 mg/ml y para las cápsulas de aceite fueron 2 mg/ml. Posteriormente las películas se secaron durante 24 h en un horno a una temperatura de 43°C, una vez secas se desprendieron de la caja Petri y se recortaron en láminas de 1x3 cm.

La determinación de polifenoles se realizó con la técnica de Taga *et al.* (1984), con algunas modificaciones, a una longitud de onda de 750 nm.

La determinación de terpenos se realizó con la técnica de Ghorai *et al.* (2012), a una longitud de onda de 538 nm.



**Figura 23.** a) Reacción colorimétrica de polifenoles presentes en la película, b) Reacción colorimétrica de terpenos presentes en la película.

## 7.8. Inflamación

Se utilizaron 30 ratas macho Wistar, con un peso de 250 a 300 g, de 6 a 7 semanas de edad, procedentes del bioterio de la Universidad Nacional Autónoma de México campus Juriquilla, Querétaro. Las ratas fueron mantenidas en jaulas individuales de 90 cm de largo y 50 cm de ancho, con una temperatura constante de  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , humedad ambiental de 40-60% y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. Los animales tuvieron libre acceso al agua y a la comida.

Se dividieron seis grupos, en los cuales, a uno de ellos se administró una solución de dexametasona en la zona peritoneal, en dosis de 2 mg/Kg, se suministraron vía oral canular los extractos acuosos a 15 mg/kg, cápsulas del extracto acuoso a 30 mg/kg, emulsión del aceite a una concentración de 100 mg/Kg, cápsulas del aceite a 200 mg/kg y de Maltodextrina 15mg/kg (Brand *et al.*, 2002). Se utilizó el método del edema auricular inducido por carragenina. Los animales fueron anestesiados con ketamina y xilacina (20 y 10 mg/kg) vía intraperitoneal, respectivamente.

Después de 30 min, se inyectaron 0.01 mL de  $\lambda$ -carragenina al 1% en solución salina en la superficie de la oreja izquierda de cada grupo de ratas Wistar. La derecha, utilizada como control, recibió el vehículo (solución salina).

La medición de la inflamación se realizó mediante el uso de un micrómetro digital durante un periodo de 6 h; cada hora se realizó la medición del edema registrado en milímetros. Posteriormente se midió a las 24, 48 y 72 h (Winter *et al.*, 1962; Pitsillides, 2004).



**Figura 24.** Edema auricular en ratas Wistar.

Se calculó la actividad antiinflamatoria con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad antiinflamatoria} = \left( 1 - \frac{\text{mm de la extremidad a evaluar} - \text{mm de la extremidad sin inflamar}}{\text{mm que aumenta la extremidad durante la inflamación máxima}} \right) \times 100$$

Después de la última medición, los animales fueron sacrificados utilizando una dosis de pentobarbital sódico (100 mg/kg) vía intraperitoneal, posteriormente cuando el animal estuvo sedado se extrajo sangre del corazón con una jeringa de 10 ml y fueron colocados en tubos Tubo BD Vacutainer® para posteriormente centrifugar a 3500 rpm por 10 min y obtener el suero, el suero obtenido se refrigeró a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Se tomaron muestras de tejido de oreja donde se indujo el edema utilizando una perforadora de 6 mm diámetro, se pesaron y guardaron en RNA Later a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 8. Resultados y discusión

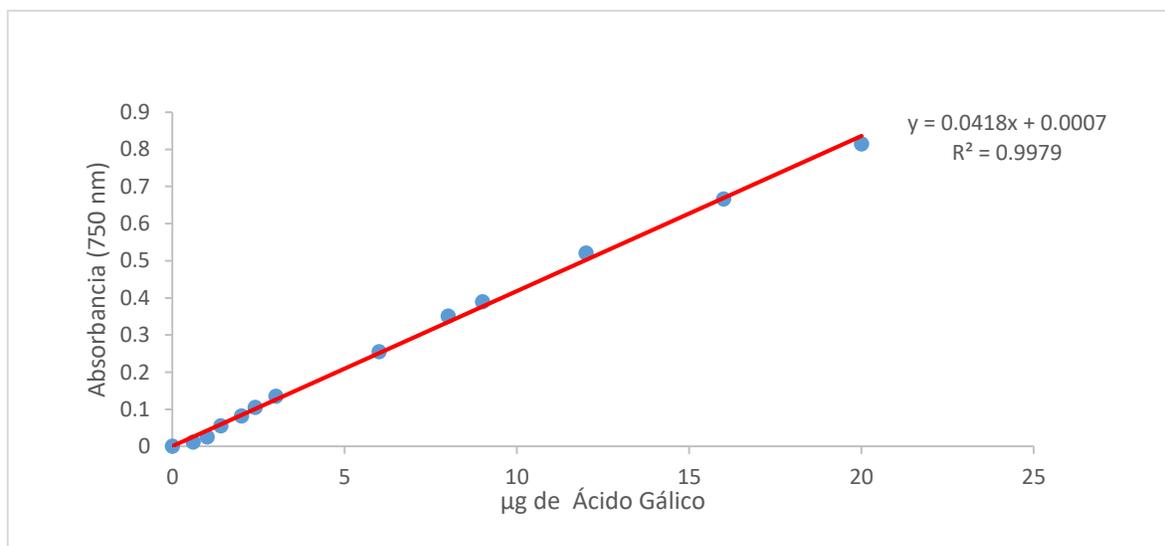
### Métodos de extracción

La obtención del aceite de esencial de las hojas de cedrón por el método de hidrodestilación directa presentó un rendimiento de 0.87%, para el extracto acuoso se obtuvo  $1.779 \pm 0.444$  g por cada 100 g de hojas, para el extracto etanólico se obtuvo  $1.7973 \pm 0.23$  g por cada 100 g de hojas y para el agua florar se obtuvo 0.5 L por cada 100 g de hojas.

### Pruebas Antioxidantes

#### Polifenoles totales

Se realizó las mediciones de polifenoles totales utilizando la metodología de Taga *et al.* (1984), para la obtención de la curva de calibración (Figura 25) se utilizó ácido gálico como estándar obteniendo una  $R^2 = 0.9979$ . Las absorbancias obtenidas de cada uno de los extractos (acuoso, etanólico y agua florar) se sustituyeron en la ecuación lineal obteniendo los siguientes resultados mostrados en la Tabla 12.



**Figura 25.** Curva de calibración para cuantificación de polifenoles totales.

**Tabla 12.** Resultado obtenido en equivalentes de ácido gálico.

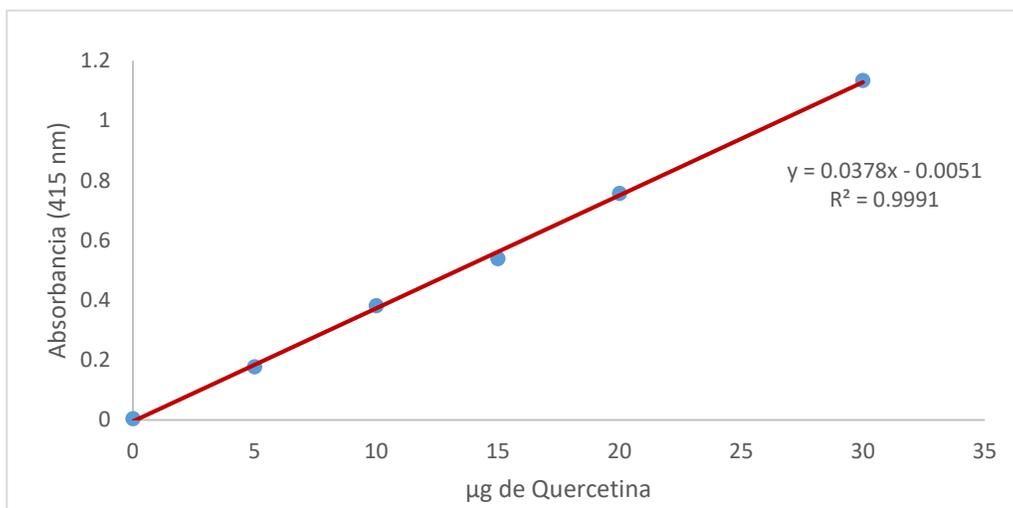
Muestras	Absorbancia (750 nm)	µg de ácido gálico		
Extracto acuoso (M1)	0.697	17.375	86 <sup>a</sup>	mg equivalentes ácido gálico / g Extracto
Extracto etanólico (M2)	0.500	11.952	1.328 <sup>b</sup>	mg equivalentes ácido gálico / ml Extracto
Agua Floral (M3)	0.120	2.862	0.028 <sup>c</sup>	mg equivalentes ácido gálico / ml Extracto

Los resultados fueron analizados mediante prueba estadística Tukey (p=0.05).

Se observa que el extracto acuoso de cedrón, fue el que obtuvo una mayor cantidad de mg equivalentes de ácido gálico, debido a que los polifenoles son solubles en agua, comparando con los resultados obtenidos por Ricco *et al* (2010) donde el utiliza el método de infusión sin pulverizar el obtuvo  $30,80 \pm 1,29$  mg ácido tánico / g material seco, por lo cual la temperatura de pulverización no influyo sobre la eficiencia en la extracción, debido a que existen presencia de compuestos polifenólicos después del proceso de pulverización.

## Flavonoides

Se realizó las mediciones de flavonoides utilizando la metodología de Dewanto (2002), para la obtención de la curva de calibración (Figura 26) se utilizó quercetina como estándar, donde se tomaron las siguientes concentraciones (35,20, 15, 10, 5, 0 µg) para la construcción de la curva obteniendo una  $R^2 = 0.9991$ . Las absorbancias obtenidas de cada uno de los extractos (acuoso, etanólico y agua floral) se sustituyeron en la ecuación lineal obteniendo los siguientes resultados mostrados en la Tabla 13.



**Figura 26.** Curva de calibración para cuantificación de Flavonoides.

**Tabla 13.** Resultados obtenidos en equivalentes de quercetina.

Muestras	Absorbancia (415 nm)	µg de Quercetina		
Extracto acuoso (M1)	0.463	12.476	62.38 <sup>a</sup>	mg equivalentes Quercetina / g Extracto
Extracto etanólico (M2)	0.500	3.655	0.038 <sup>b</sup>	mg equivalentes Quercetina / ml Extracto
Agua Floral (M3)	0.120	2.862	0.008 <sup>c</sup>	mg equivalentes Quercetina / ml Extracto

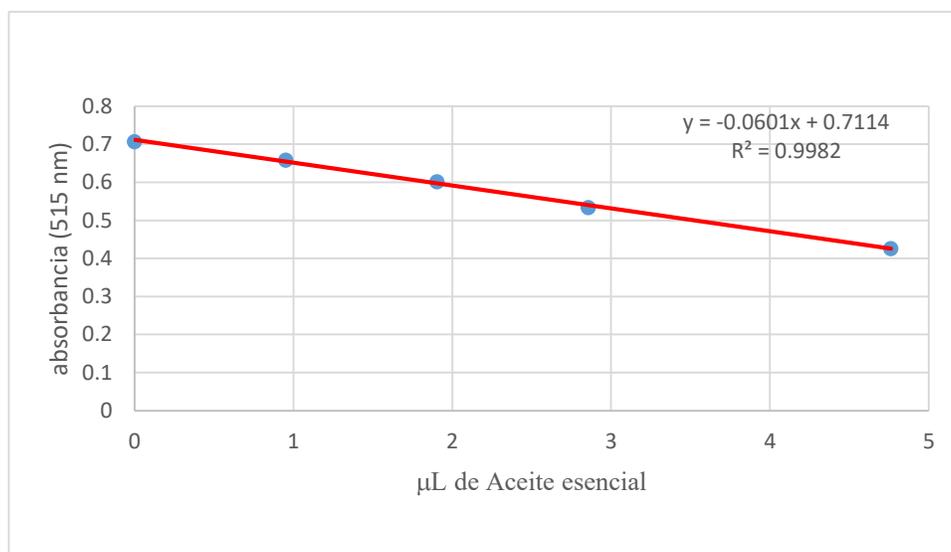
Los resultados fueron analizados mediante prueba estadística Tukey ( $p=0.05$ )

Los resultados obtenidos en la cuantificación de polifenoles totales y flavonoides tienen una relación, ya que los flavonoides deben de presentarse en menor proporción que los polifenoles totales, dado que los flavonoides pertenecen a este grupo de polifenoles totales.

## DPPH

Se utilizó el ácido ascórbico como control positivo, el cual obtuvo el mejor rendimiento entre inhibición y concentración utilizada, siendo para este 10.6  $\mu\text{g}$  para inhibir el 50 % del radical DPPH; para el extracto acuoso 24.04  $\mu\text{g}$  y para el extracto etanólico 40  $\mu\text{g}$ . En el caso del agua floral, no mostro ningún tipo de inhibición frente el radical DPPH. Los extractos con mayor cantidad de polifenoles, ocuparon concentraciones más bajas para llegar IC 50.

En el caso del aceite esencial se realizó una curva de calibración (Figura 27) dónde observó que para inhibir el radical DPPH ocupa 5.95  $\mu\text{L}$ .

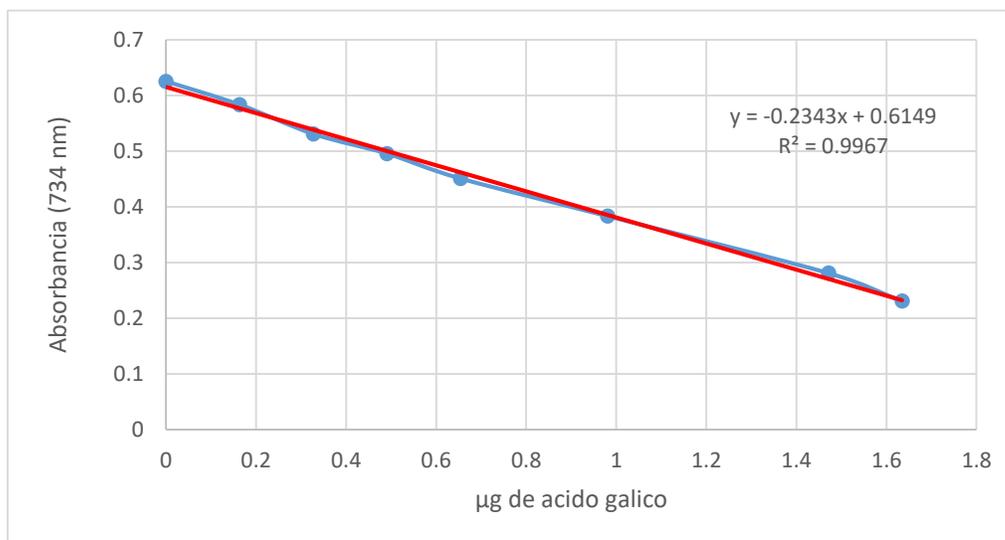


**Figura 27.** Curva de inhibición del radical DPPH con el aceite esencial.

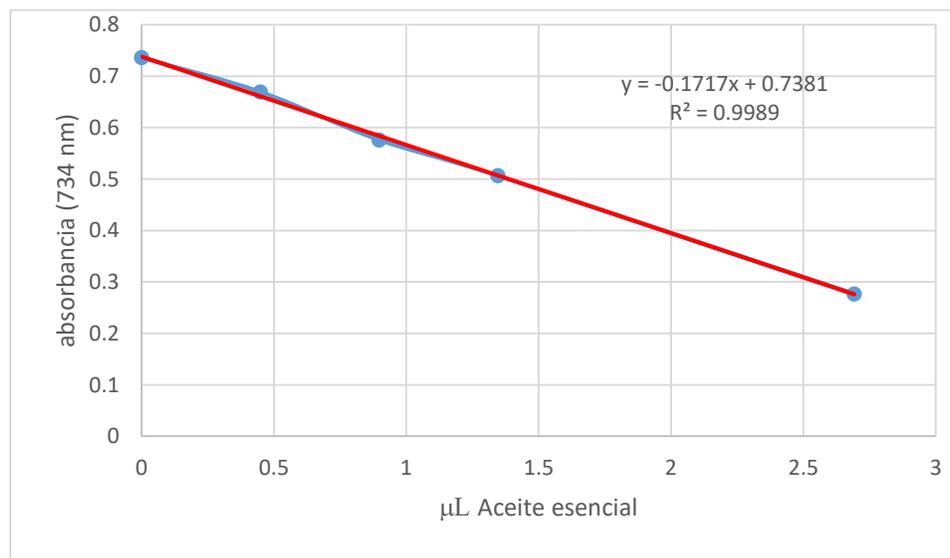
## ABTS

Se realizó una curva de inhibición del radical ABTS utilizando como estándar al ácido gálico (Figura 28) partiendo de las siguientes concentraciones (1.63, 1.47, 0.98, 0.65, 0.49, 0.32, 0.163 y 0  $\mu\text{g}$ ) obteniendo una inhibición del 50% del radical ABTS a una concentración de 1.29  $\mu\text{g}$  de ácido gálico, mientras que para el extracto

acuoso se ocupan 64.17  $\mu\text{g}$ , extracto etanólico 80  $\mu\text{g}$ , en el caso del agua floral, no mostro ningún tipo de inhibición frente el radical ABTS.



**Figura 28.** Curva de inhibición del radical ABTS con ácido gálico.



**Figura 29.** Curva de inhibición del radical ABTS con aceite esencial.

De acuerdo a todo lo dicho anteriormente afirmamos que la capacidad antioxidante está relacionada a la concentración de polifenoles. En el caso del aceite esencial se realizó una curva de calibración (Figura 29) donde observó que para inhibir el radical ABTS ocupa 1.34  $\mu\text{L}$ . Por lo visto anteriormente se decidió trabajar con el extracto acuoso y el aceite esencial debido a su alta capacidad para inhibir los radicales DPPH y ABTS.

**Elaboración de las nano partículas del extracto acuoso y observación morfológica por Microscopía Electrónica de Barrido.**

Se observó que al introducir 3 veces más el caseinato de sodio, la viscosidad aumentó y fue un mayor tiempo de secado. El material que mostró un mejor rendimiento fue la maltodextrina, obteniéndose un 90 % de rendimiento en la formulación 1:2 en 6 h.

**Tabla 14.** Rendimientos de material secado.

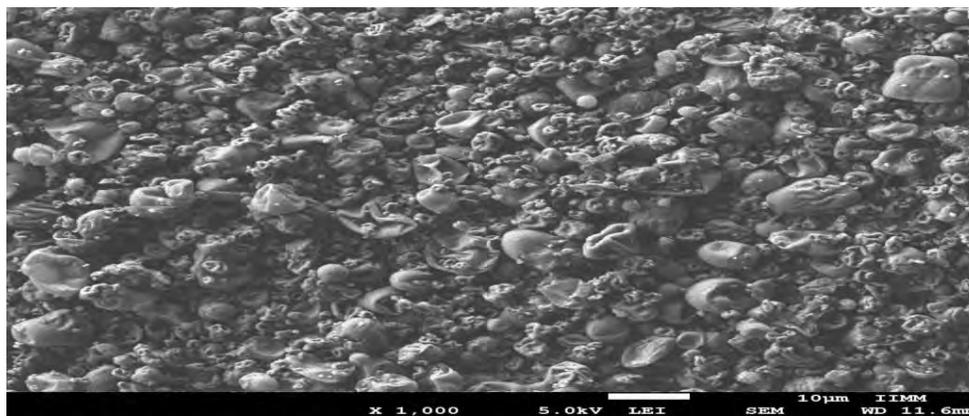
Maltodextrina	1:1 100ml en 5h	1:2 100 ml en 6h	1:3 100 ml en 7h
promedio	1.03±0.15	2.29±0.18	3.03±0.15

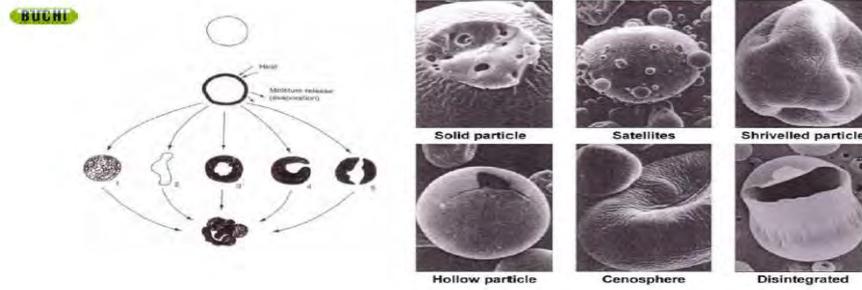
solo extracto 100 ml en 5h	Caseinato de Sodio	1:1 100ml en 5h	1:2 100 ml en 6h	1:3 50 ml en 6h
0.843 ±0.06	promedio	1.33±0.17	2.20±0.18	1.43 ±0.208

En la Figura 31 se observan las formas de las partículas, que se obtienen utilizando el equipo Nano spray dryer.

En la micrografía del extracto acuoso (Figura 30) mostró algunas partículas esféricas, haciendo satelitismo en partículas Shrivelled, donde el tamaño promedio fue de 4 micras.

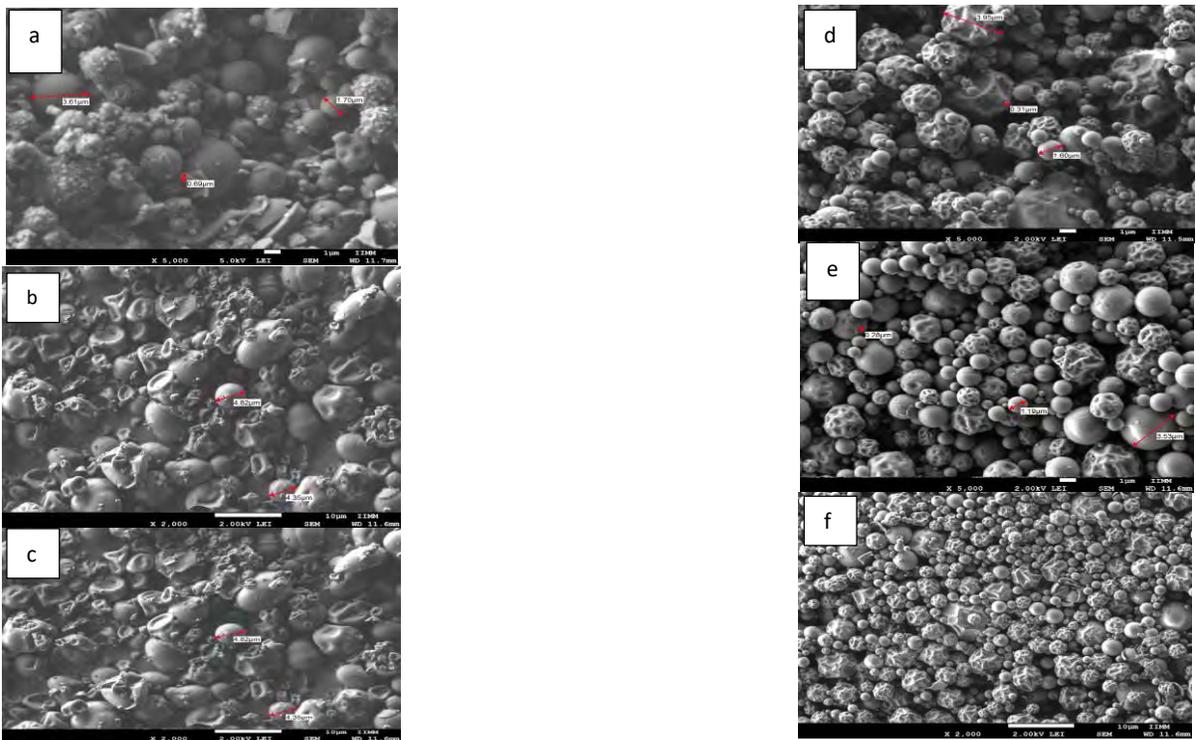


**Figura 30.** Microfotografía del extracto acuoso.



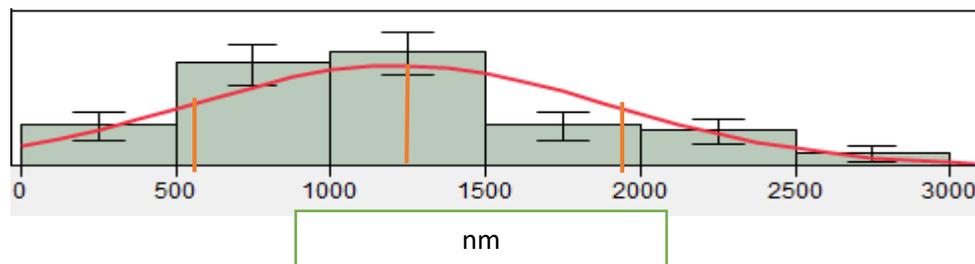
**Figura 31.** Diferentes tipos de partícula obtenidas por Nano spray dryer (tomadas por BÜCHI Labortechnik).

En la Figura 32 se observó que en las muestras en las que se utilizó caseinato de sodio, morfologías de Shrivalled y cenosphere de tamaños de 4 micras a 600 nm. La formulación de 1:2 de maltodextrina mostró partículas esféricas sólidas de 3.5 micras a 200 nm.



**Figura 32.** Microfotografías de las muestras (resolución 2.00kV): a) caseinato de sodio 1:1, b) caseinato de sodio 1:2, c) caseinato de sodio 1:3, d) maltodextrina 1:1, e) maltodextrina 1:2, f) maltodextrina 1:3.

Se utilizó el programa Image j para el análisis de tamaño de partícula de las cápsulas de la formulación 1:2 de maltodextrina, obteniendo la siguiente distribución Figura 33, teniendo una media de 1220.27 nm  $\pm$  678.300. Realizando una prueba de confiabilidad de Sharpiro–Wilk, se detecta que la distribución tiende a la normalidad. De acuerdo al tamaño obtenido de las cápsulas, estas se encuentran en la clasificación de partículas finas.



**Figura 33.** Diferentes tipos de tamaño de partícula obtenidas por Nano spray dryer.

### Contenido de polifenoles en las cápsulas del extracto acuoso

Se realizó las mediciones de polifenoles totales en las cápsulas utilizando la metodología de Taga *et al.* (1984), para la obtención de la curva de calibración (Figura 25) se utilizó ácido gálico como estándar, las absorbancias obtenidas de cada uno de las muestras (extracto acuoso, cápsulas de extracto y maltodextrina) se sustituyeron en la ecuación lineal de la Figura 25 obteniendo los siguientes resultados mostrados en la Tabla 15.

**Tabla 15.** Resultado obtenido en equivalentes de ácido gálico.

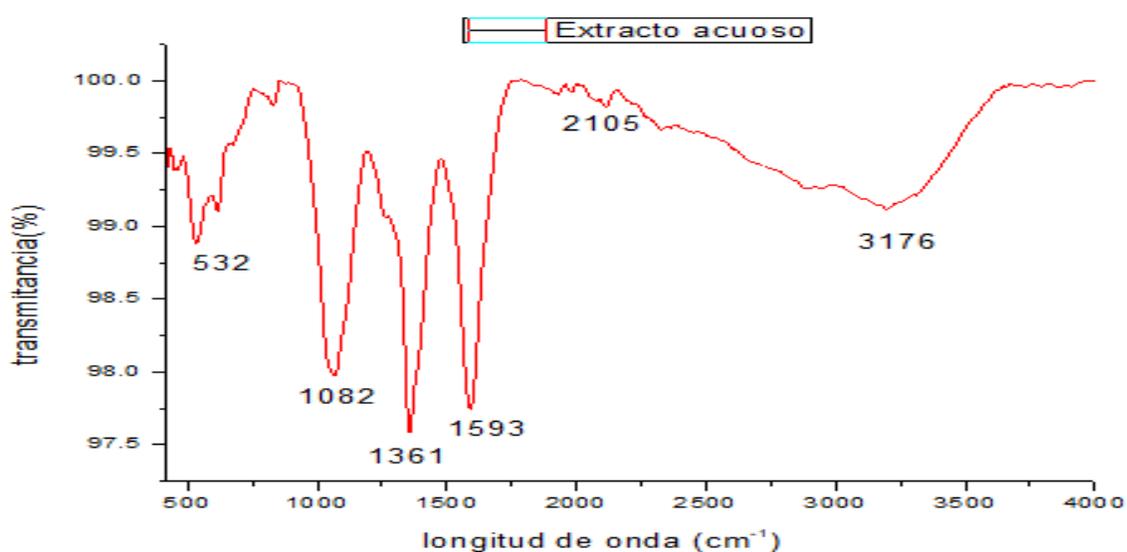
Muestras	Absorbancia (750 nm)	$\mu$ g de ácido gálico		
Extracto acuoso	0.432	10.320	1.032 <sup>a</sup>	mg equivalentes ácido gálico / g Extracto
Cápsulas de extracto	0.250	5.964	0.596 <sup>b</sup>	mg equivalentes ácido gálico / g cápsulas
Maltodextrina	0.010	0.230	0.023 <sup>c</sup>	mg equivalentes ácido gálico / g Maltodextrina

Los resultados fueron analizados mediante prueba estadística Tukey (p=0.05)

Se observó que las cápsulas obtenidas contienen compuestos polifenólicos manteniendo la relación utilizada 1:2 con el extracto sin encapsular, dado que el material de pared no reacciona con el reactivo de Folin.

### Espectroscopia infrarroja del extracto acuoso

Al comparar el espectro reportado por Delgado *et al.* (2015) en muestras de propóleos se observaron algunas señales similares, que corresponden a las siguientes frecuencias (Tablas 16-18)



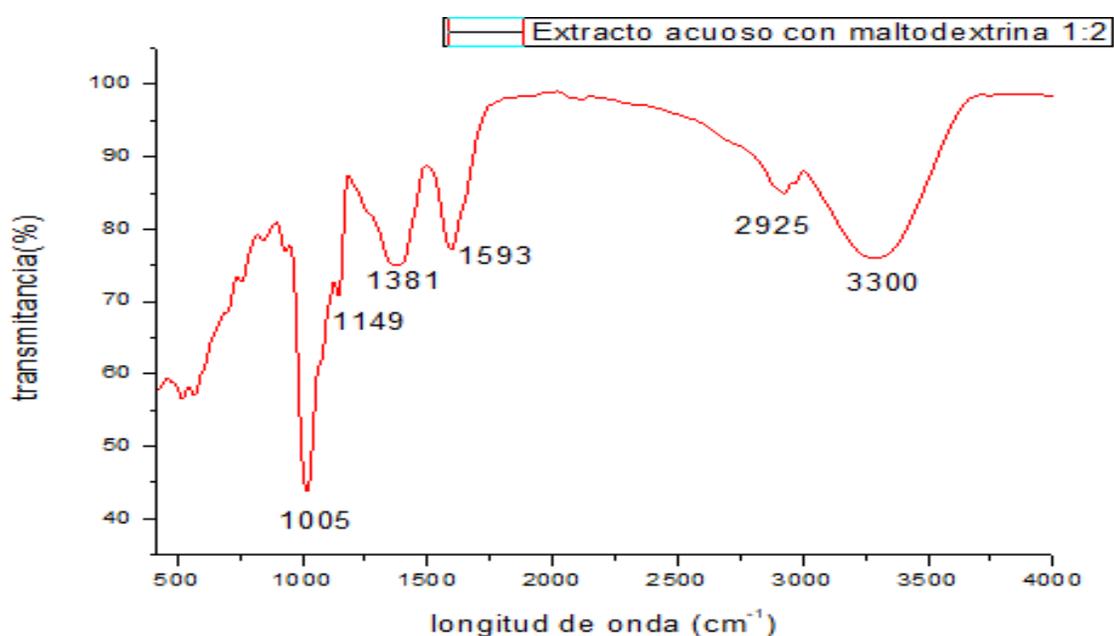
**Figura 34.** Espectro de FTIR del extracto acuoso.

**Tabla 16.** señales FTIR obtenidas y su asignación.

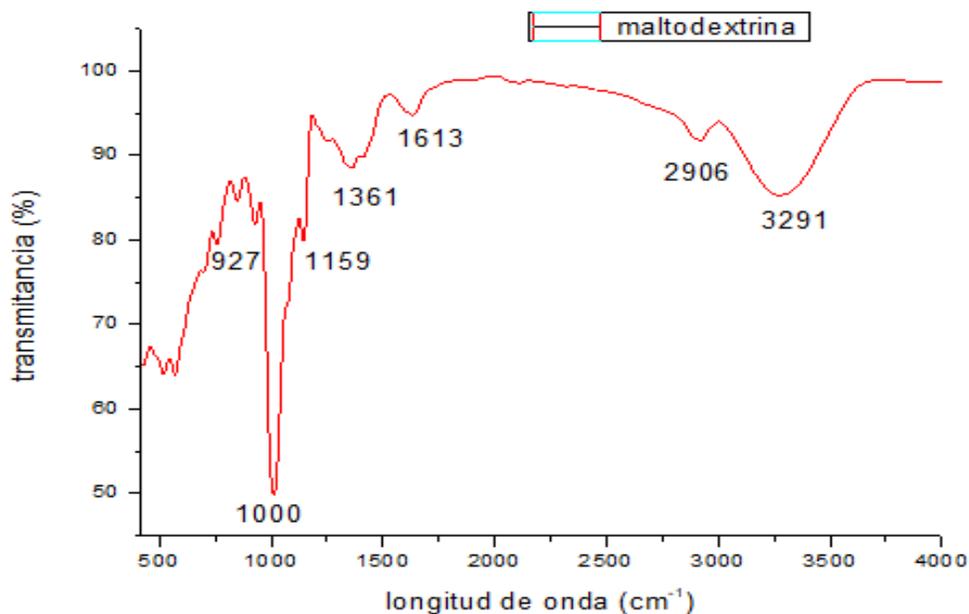
Frecuencia de delgado <i>et al.</i> (2015) $\text{cm}^{-1}$	Frecuencia obtenida $\text{cm}^{-1}$	Asignación
3000-3307	3176	Hidroxilo y aminas
1456-1600	1593	Flavonoides y anillos aromáticos
1365-1380	1361	Grupo $\text{CH}_3$ de flavonoides

En las señales de transmitancia, mostradas en la Figura 34, se observó la posibilidad de poseer núcleo polifenólico en los extractos, debido a la señal que presenta en la región  $1593\text{ cm}^{-1}$  de grupos aromáticos, con presencia de una banda asociada a grupos hidroxilo.

En los espectros obtenidos del material de pared Figura 36 y del material encapsulado Figura 35, se observa una mayor área de transmitancia en la combinación de material de pared y extracto, resaltado el pico de  $1593\text{ cm}^{-1}$  asociado a anillos aromáticos, ausente en el espectro de maltodextrina.



**Figura 35.** Espectro de FTIR del extracto acuosos con maltodextrina 1:2.



**Figura 36.** Espectro de FTIR de maltodextrina.

**Tabla 17.** Señales de FTIR.

Frecuencia, $\text{cm}^{-1}$	Tipo de señal	Tipo de enlace	Asignación
3335	Alargamiento	O-H y N-H	Hidroxilo y aminas
2917	Alargamiento asimétrico	C-H	Grupos de $\text{CH}_2$ de saturación
2849	Alargamiento simétrico	C-H	Hidrocarburos.
1699	Vibración de flexión asimétrica	C=O	Lípidos, Flavonoides y aminoácidos
1661	Vibración de alargamiento (C-O) y flexión (C-OH)	C-O y C-OH	Lípidos y alcoholes terciarios
1513	Alargamiento	Compuestos aromáticos	Flavonoides y anillos aromáticos
1450, 1580	Vibración de flexión	C-H de grupos $\text{CH}_2$ y $\text{CH}_3$ . Aromáticos	Flavonoides y anillos aromáticos
1369	Vibración de flexión	C-H	Grupo $\text{CH}_3$ de flavonoides
1269	Vibración de flexión (O-H) y flexión asimétrica (C-CO)	O-H y C-CO	Hidrocarburos, Ester.

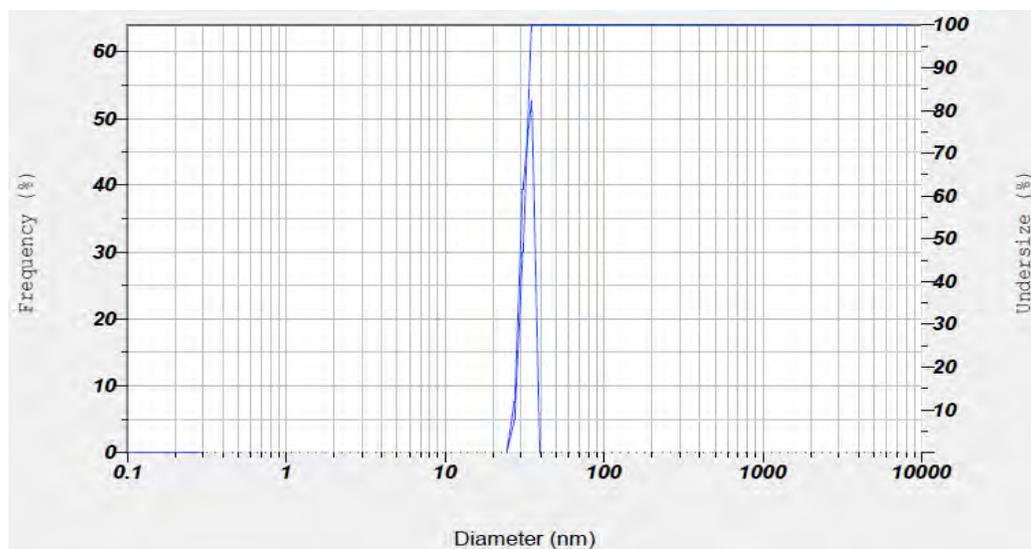
**Tabla 18.** Señales de FTIR.

Frecuencia, $\text{cm}^{-1}$	Tipo de señal	Tipo de enlace	Asignación
1088	Vibración de alargamiento (C-C) y flexión (OH)	C-C y C-OH	Flavonoides y alcoholes secundarios
1043	Alargamiento (C-C) y flexión (C-OH)	=C-O-C, C-C y C-OH	Alcoholes primarios
881	Estiramiento asimétrico	C-C-O	Alcoholes primarios y secundarios

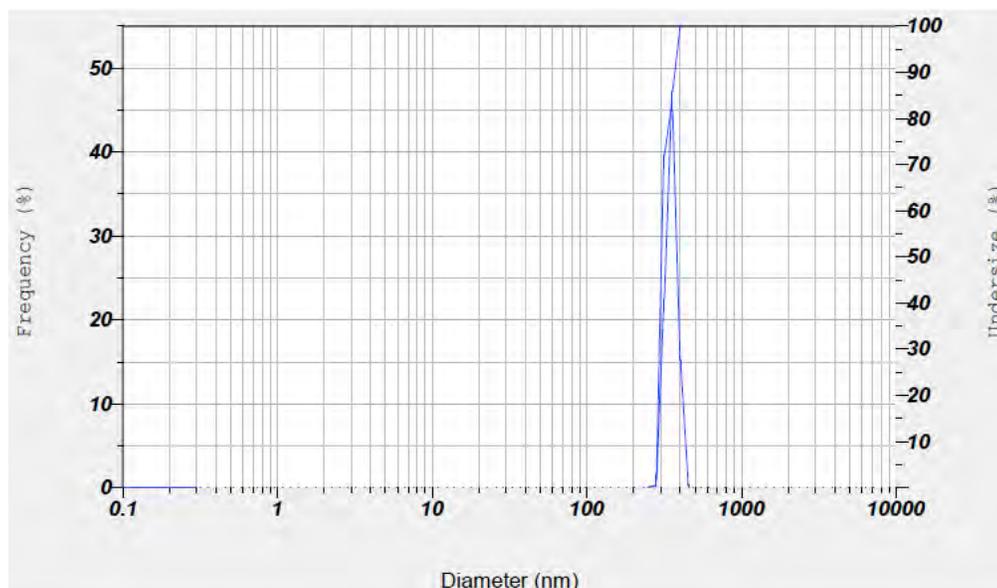
### Tamaño de partícula

El tamaño de las nanocápsulas es uno de los parámetros de mayor importancia, ya que determina la aplicación y destino del biocompuesto formulado (Gan *et al.* 2005)

En la Figura 37 se muestra tamaño de partícula obtenido para el estándar 30 nm /Ludox fue de 30.9 nm, por lo cual el equipo Nano Particle Analyzer SZ-100 se encuentra calibrado. Posteriormente se realizó la medición del tamaño partícula del extracto el cual fue  $242.2 \pm 18.7\text{nm}$  (Figura 38) y para el extracto encapsulado se obtuvo de  $113 \pm 9.6 \text{ nm}$ , donde se puede observar que el material de pared (maltodextrina) reduce el tamaño de partícula.



**Figura 37.** Tamaño de partícula de estándar 30 nm /Ludox.



**Figura 38.** Tamaño de partícula del extracto

De acuerdo al tamaño obtenido de las cápsulas disueltas en agua, estas se encuentran en la clasificación de nanopartículas.

### Estabilidad de la emulsión

Se realizaron diferentes procesos mecánicos para verificar la estabilidad de la emulsión obtenida por ultrasonido, utilizando como parámetro el tamaño de micela dada por el equipo Nano Particle Analyzer SZ-100, obteniendo los siguientes resultados mostrados en las Tablas (19-21) (Din *et al.* 2015).

**Tabla 19.** Tamaño de micela con y sin emulsión.

Muestra	Tamaño de micela(nm)
Sin Emulsión	2318.01 ± 2809.17 <sup>a</sup>
Emulsión	183.50 ± 29.62 <sup>b</sup>

Los resultados fueron analizados mediante prueba estadística T Student (p=0.05).

## Centrifugación

**Tabla 20.** Tamaño de micela en el ciclo de centrifugación.

Muestra	Tamaño de micela(nm)
Emulsión	183.50 ± 29.62 <sup>a</sup>
5 Minutos	211± 97.21 <sup>a</sup>
10 Minutos	231± 134.78 <sup>a</sup>
15 Minutos	162 ± 19.88 <sup>a</sup>

Los resultados fueron analizados mediante prueba estadística Tukey (p=0.05)

## Congelación

**Tabla 21.** Tamaño de micela en el ciclo de congelación y descongelación.

Muestra	Tamaño de micela(nm)
Ciclo de congelación-descongelación	294.57±19.67 <sup>b</sup>
Sin Emulsión	2318.01 ± 2809.17 <sup>a</sup>
Emulsión	183.50 ± 29.62 <sup>b</sup>

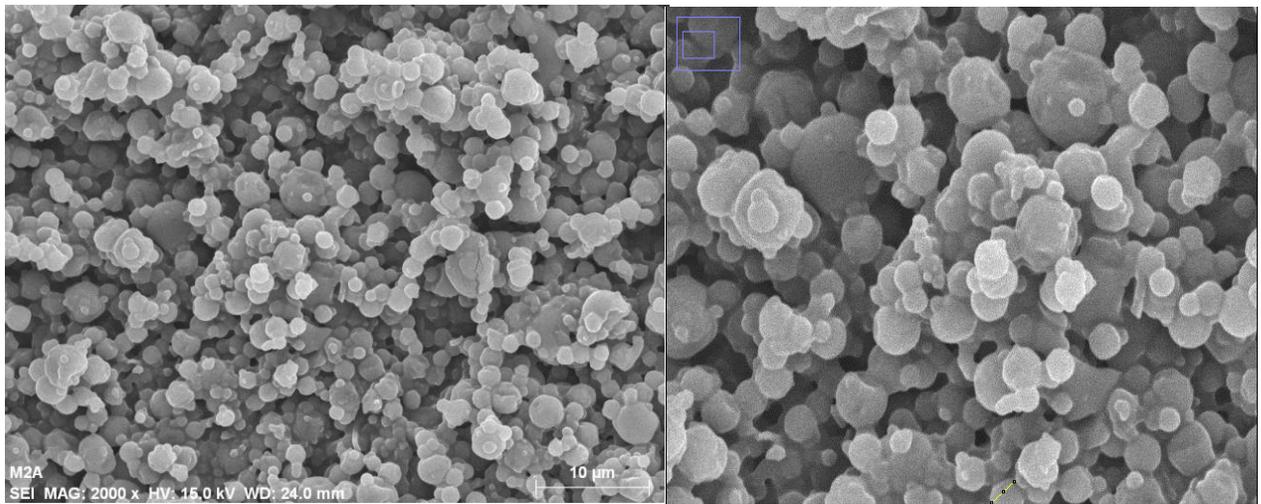
Los resultados fueron analizados mediante prueba estadística T Student (p=0.05)

Se observó una eficiencia alta en la estabilidad de la emulsión, debido a que no hubo diferencia significativa entre cada uno de los tratamientos y sólo existió diferencia cuando se comparó el tamaño de micela (nm) antes y después de emulsionar el aceite. Por lo cual se reitera que los procesos de ultrasonido tienen muchas aplicaciones potenciales en la industria de alimentos, debido a que se puede obtener un menor tamaño de partícula y mayor estabilidad que las emulsiones convencionales. De acuerdo al tamaño obtenido de las micelas, estas se encuentran en la clasificación de nanomicelas.

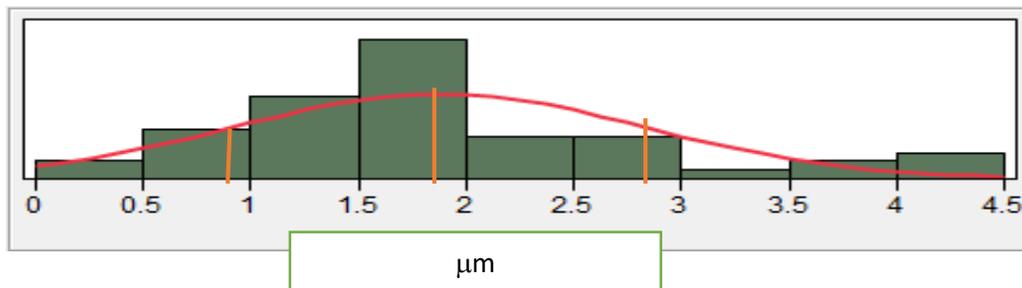
## Elaboración de las nano partículas de aceite y microscopía electrónica de barrido

Por cada 50 ml de emulsión pulverizada se obtuvieron 0.831 ± 0.039 g. En la micrografía de las cápsulas de aceite (Figura 39) mostró algunas partículas esféricas, haciendo satelitismo en partículas Shrivelled, donde el tamaño vario de 4

a 0.5 micras. De acuerdo al tamaño obtenido de las cápsulas de aceite esencial, estas se encuentran en la clasificación de partículas finas y gruesas (diámetros inferiores a 2.5  $\mu\text{m}$  se denominan partículas finas, mayores a 2.5 partículas gruesas).



**Figura 39.** Microfotografías de las muestras: a) cápsulas de aceite, b) Zoom de un cuadrante de la micrografía anterior.

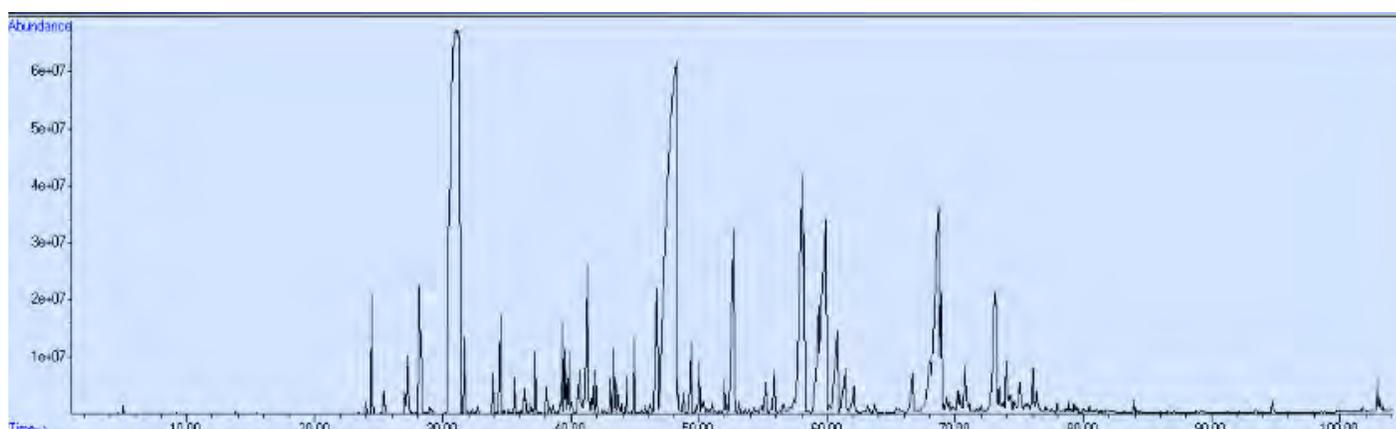


**Figura 40.** Diferentes tipos de tamaño de partícula obtenidas por Nano spray dryer.

Utilizando el programa Image J se midió el tamaño de partícula para elaborar un histograma, donde nos muestra la distribución de la Figura 40, teniendo una media de  $1.876 \pm 0.960 \mu\text{m}$ . Realizando una prueba de confiabilidad de Shapiro–Wilk se encontró que la distribución tendió a una normalidad.

### CG-MS del aceite

Se observa que la Crisantenona y D-Limoneno (Tabla 22), son los componentes mayoritarios del aceite. El contenido de cariofileno, citral, espatulenol, óxido de cariofileno,  $\alpha$ -curcumeno y  $\alpha$ -pineno coinciden con los componentes obtenidos Hawary *et al.* (2011) en hojas de *Lippia citriodora* cultivadas en Egipto.



**Figura 41.** Cromatograma de gases del aceite esencial de Cedrón (*Aloysia citriodora*).

Carnat *et al.* (1999) reporta en hojas de cedrón, provenientes de Chile, la siguiente composición y que tiene como mayor componente al geranial (23.5%), neral (17.6%), oxido de cariofileno (6.3%), 1,8.cineol (5.7%) y citronelol (5.3%).

**Tabla 22.** Composición química de compuestos volátiles del aceite esencial del cedrón.

<b>Componentes</b>	<b>Tiempo de Retención (min)</b>	<b>abundancia</b>
Canfeno	31.264	1.77
Cariofileno	52.701	2.95
cis Carveol	46.687	1.749
Citral	41.684	1.2
Crisantenona	47.948	15.105
D-Limoneno	30.903	11.79
Espatuleno	68.681	5
Oxido de cariofileno	68.905	1.388
Santolina triene	31.007	4.10
$\alpha$ -Bergamotene	59.325	1.74
$\alpha$ -curcumeno	58.063	5.01
$\alpha$ -Gurjunene	59.89	4.89
$\alpha$ -Pino	31.079	3.36
$\beta$ -Cuvebene	58.193	1.35
$\gamma$ -Cadineno	68.024	1.263
$\delta$ -Cadineno	73.087	1.868

Cariofileno es capaz de modular los procesos inflamatorios (Zamora-Burbano *et al.*, 2016). El alfa-pino es un anti-inflamatorio a través de PGE1, inhibiendo (COX-2) (Russo, 2011).

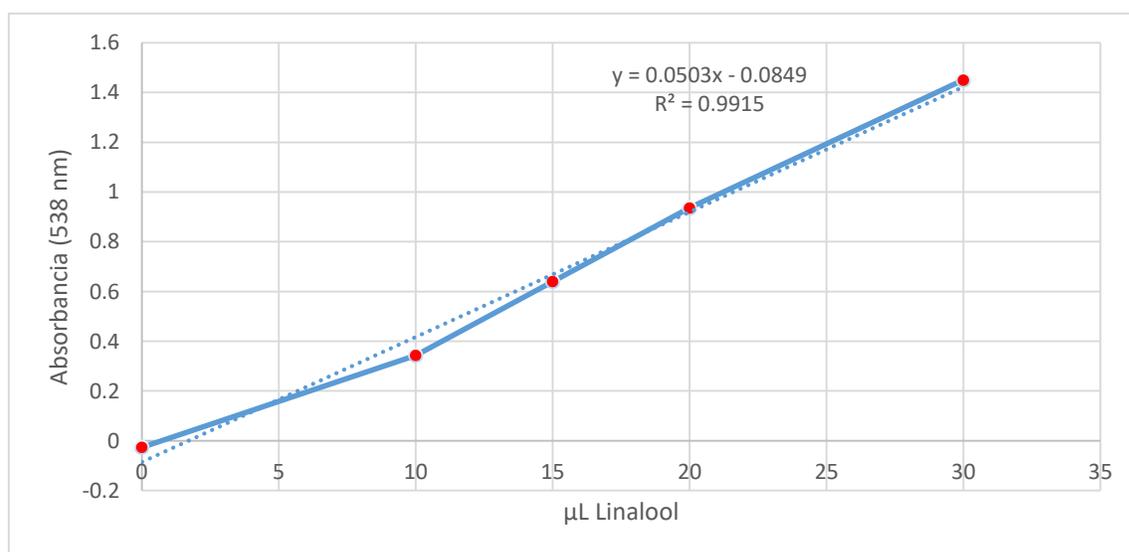
### Contenido de terpenos en las cápsulas

Se realizó la técnica de Ghorai *et al.* (2012) para la medición de terpenos totales de la muestra de aceite y de las cápsulas de aceite, utilizando como estándar al terpeno linalool obteniendo la siguiente curva de calibración (Figura 42).

En la tabla 23 se puede observar las cápsulas obtenidas contienen compuestos terpenicos, dado que el material de pared obtuvo un falso positivo se realizó la resta entre las absorbancias de las cápsulas de aceite y maltodextrina, obtenido como resultado que cada mg de cápsulas contiene 5.489  $\mu\text{L}$  de Linalool.

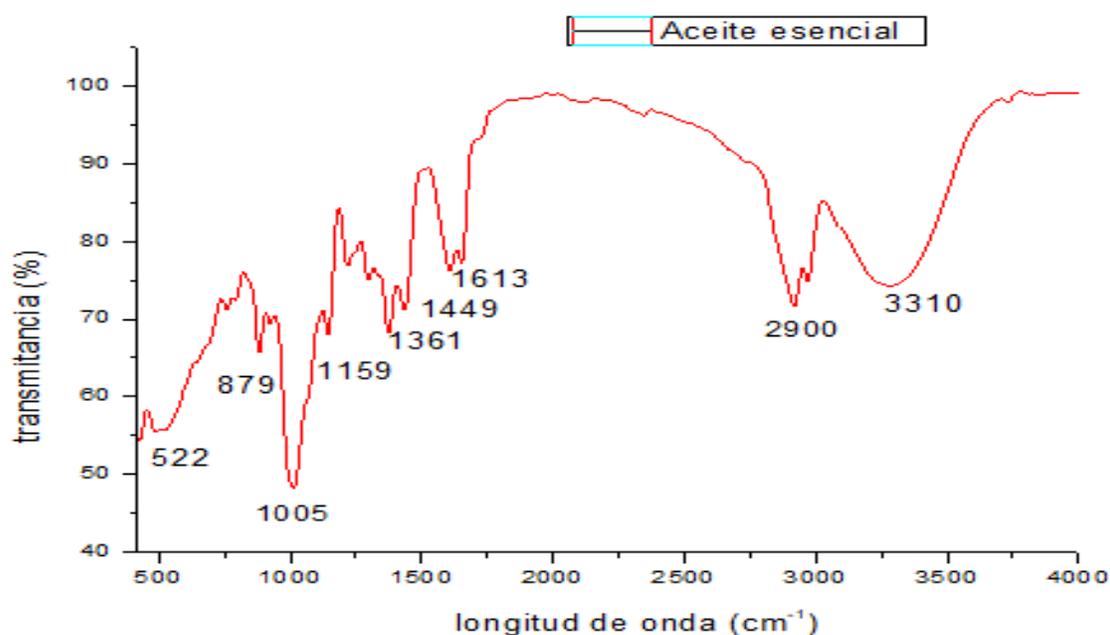
**Tabla 23.** Resultados de terpenos.

Muestra	$\mu\text{L}$ Linalool
Aceite (20 $\mu\text{L}$ )	15.514
Cápsulas de aceite (1mg)	10.951
Maltodextrina (1mg)	5.462



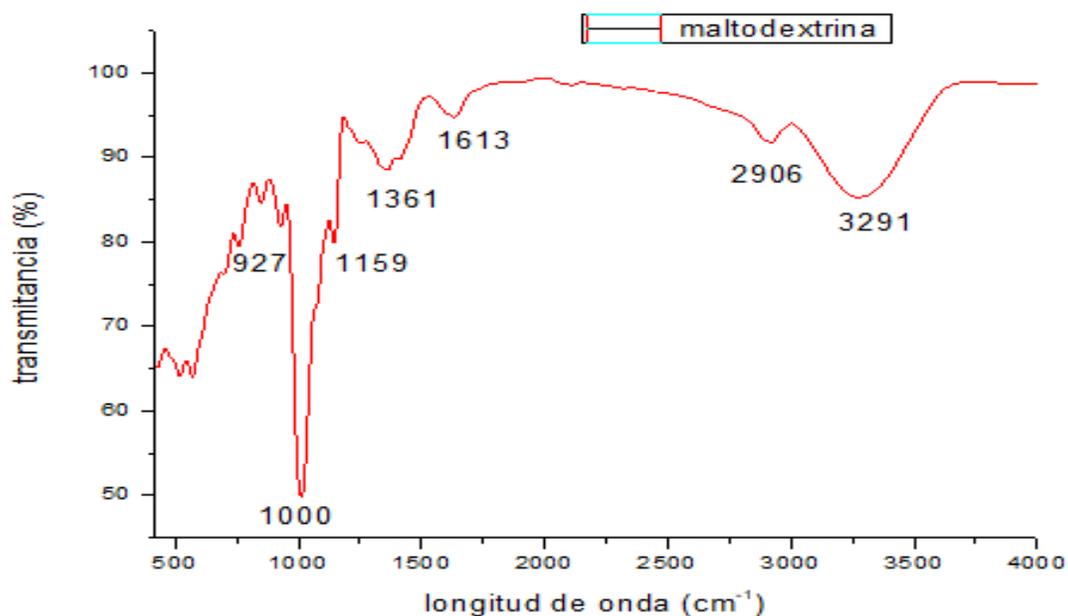
**Figura 42.** Curva de calibración de linalool.

## Espectrometría infrarroja del extracto aceite y cápsulas

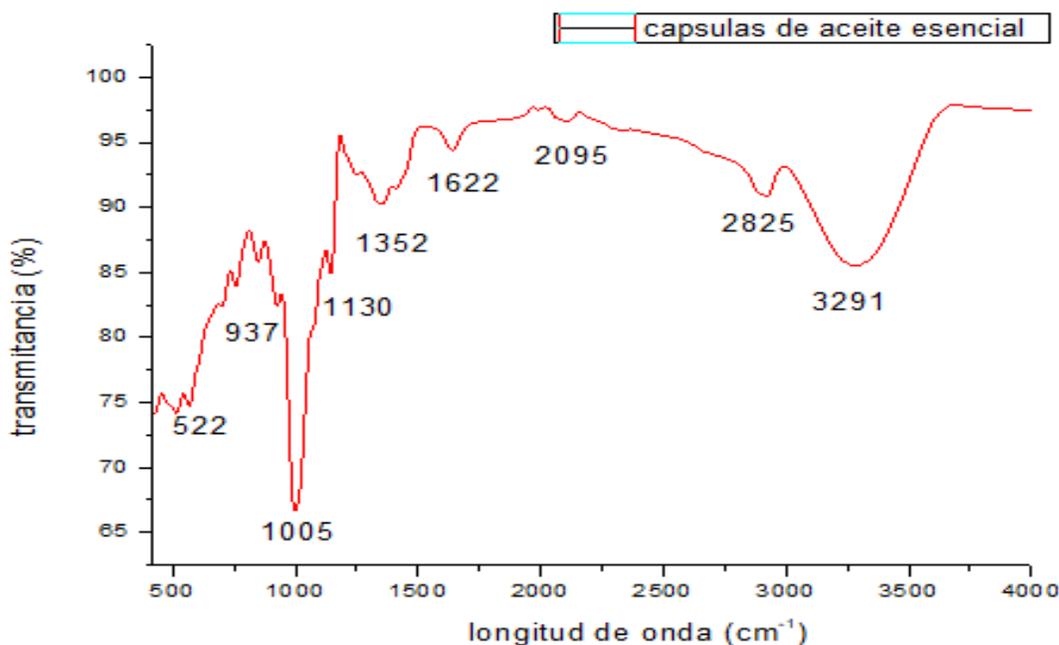


**Figura 43.** Espectros de FTIR del aceite de cedrón.

Bañuelos-Valenzuela *et al.* (2015) compararon diferentes espectros de diversos aceites entre ellos Linalool, Timol, Limoneno y Terpineno, al comparar el espectro del aceite de cedrón (Figura 43) muestran señales en las bandas 500 a 1005  $\text{cm}^{-1}$ , donde se asocian con grupos aromáticos  $\text{C} \equiv \text{C}$  y  $\text{C}-\text{H}$ . Los valores de 1159 a 1233  $\text{cm}^{-1}$  correspondieron al éster de  $\text{C}-\text{O}$ , lo cual coincidió con lo señalado por Delgado *et al.* (2015). Las frecuencias de 1580-1600  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a grupos aminos presentes en carvacrol, timol, y terpineno. Los valores 2800 y 2900  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a vibraciones simétricas de grupos  $\text{CH}_3$  alifático, presentes en los estándares y el aceite de cedrón, las frecuencias de 3300 a 3400  $\text{cm}^{-1}$  correspondieron a grupos hidroxilo ( $\text{O}-\text{H}$ ) en los grupos aromáticos.



**Figura 44.** Espectros de FTIR de maltodextrina.



**Figura 45.** Espectros de FTIR de cápsulas de aceite.

Los espectros obtenidos del material de pared, Figura 44 y de las cápsulas de aceite Figura 45, se observa un área mayor de transmitancia en las cápsulas, resaltado el pico de  $937\text{ cm}^{-1}$  donde incrementó, asociado a anillos aromáticos.

## Inflamación

Las Figuras (46-47) muestra los resultados de la medición del edema en mm, donde se observó un aumento significativo en el tamaño de la oreja inyectada con carragenina, comparado con la inyectada con vehículo de solución salina, alcanzándose el mayor nivel de edema a la primera hora de seguimiento, disminuyendo a partir de la hora.

En los resultados de la Tablas 24-27 muestran el gran potencial de dexametasona para desinflamar, siendo el mejor tratamiento a la 6, 24 y 48 h, y el tratamiento que obtuvo una menor actividad fue maltodextrina en todas las mediciones.

**Tabla 24.** Actividad antiinflamatoria de los diferentes tratamientos a las 6 h.

Tratamiento	Actividad antiinflamatoria
Dexametasona	88.48±3.97 <sup>a</sup>
Maltodextrina	70.39±3.978 <sup>b</sup>
Extracto acuoso	75.57±4.59 <sup>ab</sup>
Cápsulas de extracto acuoso	70.754±3.55 <sup>b</sup>
Aceite	83.739±3.97 <sup>ab</sup>
Cápsulas de aceite	70.715±3.55 <sup>b</sup>

Los resultados fueron analizados mediante prueba estadística Tukey (p=0.05)

**Tabla 25.** Actividad antiinflamatoria de los diferentes tratamientos a las 24 h.

Tratamiento	Actividad antiinflamatoria
Dexametasona	99.2509±3.81 <sup>a</sup>
Maltodextrina	69.230±7.40 <sup>b</sup>
Extracto acuoso	81.681±12.55 <sup>ab</sup>
Cápsulas de extracto acuoso	71.3836±8.76 <sup>b</sup>
Aceite	82.723±13.71 <sup>ab</sup>
Cápsulas de aceite	81.200±6.97 <sup>ab</sup>

Los resultados fueron analizados mediante prueba estadística Tukey (p=0.05)

**Tabla 26.** Actividad antiinflamatoria de los diferentes tratamientos a las 48 h.

<b>Tratamiento</b>	<b>Actividad antiinflamatoria</b>
Dexametasona	91.13±6.71 <sup>a</sup>
Maltodextrina	68.609±4.78 <sup>b</sup>
Extracto acuoso	77.01±9.53 <sup>ab</sup>
Cápsulas de extracto acuoso	75.471±7.36 <sup>ab</sup>
Aceite	76.117±6.55 <sup>ab</sup>
Cápsulas de aceite	74.620±10.04 <sup>ab</sup>

Los resultados fueron analizados mediante prueba estadística Tukey (p=0.05)

**Tabla 27.** Actividad antiinflamatoria de los diferentes tratamientos a las 72 h.

<b>Tratamiento</b>	<b>Actividad antiinflamatoria</b>
Dexametasona	92.50±3.81 <sup>ab</sup>
Maltodextrina	70.47±3.88 <sup>c</sup>
Extracto acuoso	95.47±10.47 <sup>a</sup>
Cápsulas de extracto acuoso	80.943±11.97 <sup>abc</sup>
Aceite	95.426±12.09 <sup>a</sup>
Cápsulas de aceite	74.83±4.22 <sup>b<sup>c</sup></sup>

Los resultados fueron analizados mediante prueba estadística Tukey (p=0.05)

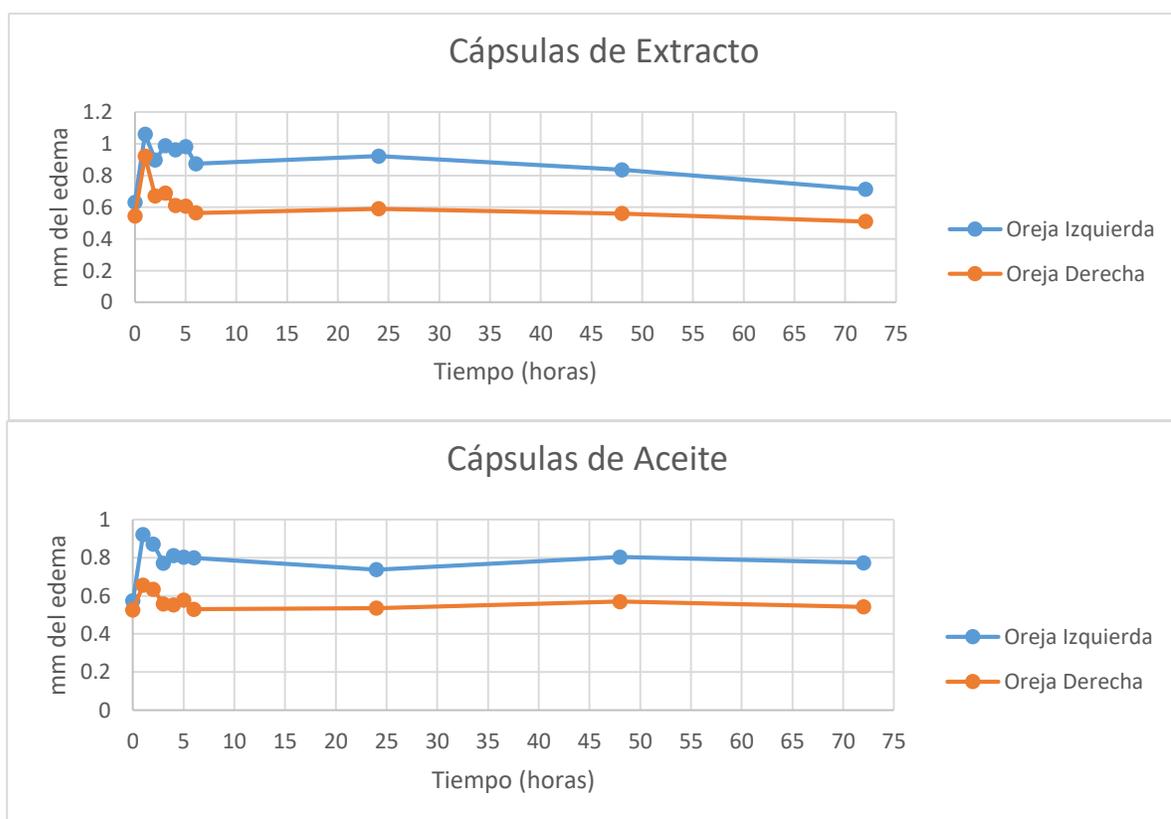
Los extractos administrados tuvieron un efecto en la actividad antiinflamatoria debido a que obtuvieron un valor mayor que el vehículo (maltodextrina), tendiendo a parecerse al control positivo dexametasona.

En el extracto acuoso y aceite a las 72 h obtuvieron un mejor rendimiento que dexametasona, al realizar la prueba de Tukey. Esto pudiera deberse a la forma en la cual fue suministrada el fármaco dexametasona, el cual fue suministrado vía intraperitoneal teniendo un rápido efecto antiinflamatorio y un menor tiempo de residencia, al contrario, cuando se suministran los extractos acuosos y terpenicos

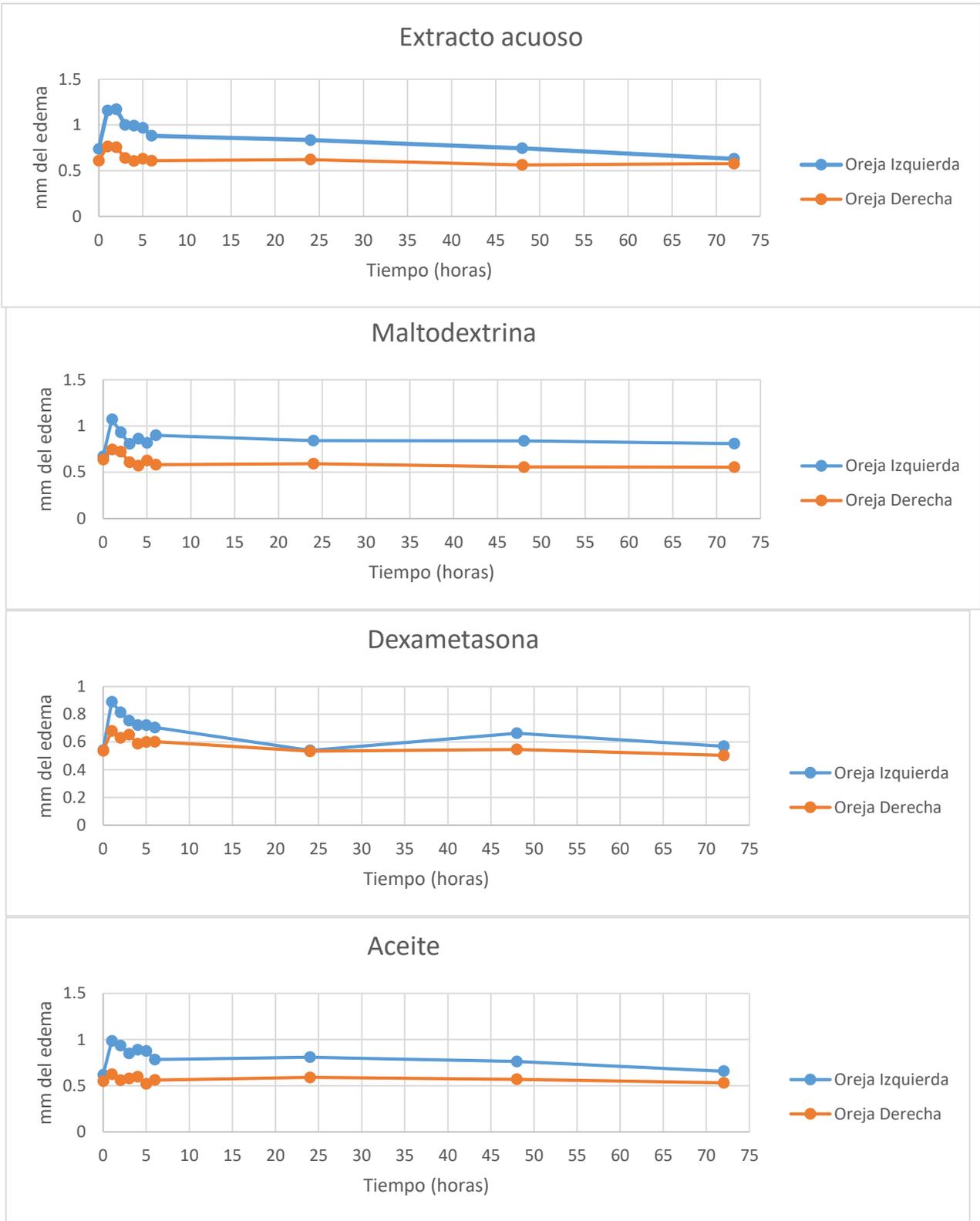
vía canular estos tuvieron un mayor tiempo de actividad antiinflamatoria debido al tiempo que tarda en metabolizarse los compuestos. Uno de estos compuestos son los flavonoides se encuentran presentes generalmente en combinaciones con azúcares en forma de glicósidos, que son más solubles que las correspondientes agliconas, y que pueden necesitar una hidrólisis enzimática de la porción glicídica mediante glicosidasas bacterianas o humanas antes de la absorción.

La actividad antiinflamatoria del aceite esencial puede estar asociada, al contenido de cariofileno que es capaz de modular los procesos inflamatorios (Zamora-Burbano *et al.*, 2016). El alfa-pineno es un anti-inflamatorio a través de PGE1, inhibiendo (COX-2) (Russo, 2011).

La actividad antiinflamatoria del extracto acuoso puede estar asociada, al contenido verbascosido (es un feniletanoides) presente en hojas de cedrón. Speranza *et al.*, (2009) realizó estudios en células THP-1 (leucemia mielomonocítica humana) donde muestran una disminución significativa en la expresión y actividad de iNOS y O2 extracelular cuando las células fueron tratadas con verbascosido.



**Figura 46.** Edema auricular en ratas Wistar.



**Figura 47.** Edema auricular en ratas Wistar

**Tabla 28.** Pesos del tejido auricular de los diferentes tratamientos.

<b>Tratamiento</b>	<b>Peso de tejido de oreja izquierda (g)</b>	<b>Peso de tejido de oreja derecha (g)</b>
Dexametasona	0.0193 ± 0.00086	0.0160 ± 0.0007
Maltodextrina	0.0249 ± 0.0022	0.0174 ± 0.0019
Extracto acuoso	0.0218 ± 0.008	0.0171 ± 0.0021
Cápsulas de extracto acuoso	0.0236 ± 0.0065	0.017 ± 0.0021
Aceite	0.0203 ± 0.0042	0.0176 ± 0.0012
Cápsulas de aceite	0.02128 ± 0.0024	0.0179 ± 0.0011

En la Tabla 28 se mostró los resultados del peso del tejido de oreja, donde se observó un incremento en el tejido de la oreja izquierda de cada tratamiento comparándolo con la oreja derecha, este incremento se puede deber a la inflamación provocada por carragenina.

### **Elaboración de la película**

Al realizar las pruebas de espesor en las películas se obtuvieron como resultado: 0.027± 0.005 mm grosor de la película sin cápsulas de extracto y 0.026 ± 0.003 mm de grosor de la película con cápsulas de extracto, obteniendo mediciones similares para ambas películas. Los resultados obtenidos de la solubilidad de estas películas fueron los siguientes valores: 92.18 ± 0.23 para la película sin cápsulas de extracto y 94.35 ± 0.56 para la película con cápsulas de extracto, estos resultados están expresados en % de solubilidad.

La concentración de polifenoles de las películas con el extracto acuoso y cápsulas fueron los siguientes: 41.813 ± 2.310 y 6.633 ± 1.885 expresados en µg equivalentes ácido gálico / mg película. Al determinar la concentración de terpenos para las películas con el aceite emulsionado y cápsulas se obtuvieron los siguientes valores 6.038 ± 0.803 y 2.895 ± 0.235 expresados en µL equivalentes linalool / mg película.

Se observó que el secado no elimina los compuestos que contienen las películas, comparando los resultados de las películas tratadas con extractos y las que no se observa un aumento en la concentración de los de polifenoles y terpenos respectivamente.

## 9. Conclusión

Con el extracto acuoso de hojas de *A. citriodora* se obtuvo el contenido mayor de polifenoles y presentó la actividad antioxidante más alta frente a los radicales ABTS y DPPH.

Al comparar el aceite esencial con el extracto acuoso, el primero obtuvo una mayor actividad antioxidante frente a los radicales ABTS y DPPH. En éste se identificaron 16 componentes volátiles, siendo los mayoritarios la crisantenona (15.105%), D-limoneno (11.79%),  $\alpha$ -curcumeno (5.01%), espatulenol (5%)  $\alpha$ -gurjunene (4.89%), santolina triene (4.10%),  $\alpha$ -pineno (3.36%), cariofileno (2.95%), oxido de cariofileno (1.38%) y citral (1.2%).

Se logró la encapsulación tanto del extracto acuoso como del aceite esencial de hojas de cedrón, ya que las cápsulas presentaron un tamaño óptimo con  $1220.27 \text{ nm} \pm 678.300 \text{ nm}$  y  $1876 \pm 960 \text{ nm}$ , respectivamente. Por su tamaño y características son nanopartículas y partículas finas para el extracto acuoso y partículas finas para el aceite esencial.

Se obtuvieron películas a base de polímeros y extractos de cedrón con propiedades antioxidantes, estas películas pueden dar lugar a envases biodegradables o recubrimientos comestibles, que podrían minimizar o prevenir procesos oxidativos en el organismo ya que pueden prolongar la vida útil de los compuestos antioxidantes.

Durante el proceso inflamatorio en el modelo de edema auricular en ratas, a las 72 h se observó una alta actividad antiinflamatoria tanto del extracto acuoso como del aceite esencial de cedrón, ya que mostraron un valor mayor al ejercido por la solución vehículo (maltodextrina) y al control positivo (dexametasona).

## 10. Literatura citada

- Abud-Mendoza, C.** (2005). Prevalencia de enfermedades reumáticas en México. *Rev Mex Reumatol.* 20(1):20(S7).
- Antunes, M., M Gago, C., M Cavaco, A., & G Miguel, M.** (2012). Edible coatings enriched with essential oils and their compounds for fresh and fresh-cut fruit. *Recent patents on food, nutrition & agriculture*, 4(2), 114-122.
- Bakkali, F., Averbeck S., Averbeck D. e Idaomar M.** (2008). Biological effects of essential oils- A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46:446-475.
- Banno, N., Akihisa, T., Yasukawa, K., Tokuda, H., Tabata, K., Nakamura, Y., Nishimura, R., Kimura, Y., Suzuki, T.** (2006). Anti-inflammatory activities of the triterpene acids from the resin of *Boswellia carteri*. *Journal of Ethnopharmacology* 107: 249–253.
- Bañuelos-Valenzuela, Rómulo & Delgadillo, Lucía & Chairez, Francisco & Delgadillo, Olivia & Meza-López, Carlos.** (2018). Composición química y ftir de extractos etanólicos de *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* Y *Ruta graveolens* chemical composition and ftir of ethane extracts of *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* and *Ruta graveolens*. *Agrociencia*. 52-86.
- Baßer, K.H.C. y Demirci F.** (2007). Chemistry of essential oils. En *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability USA*: CRC Press, Boca Raton. pp. 43–86.
- Bonilla, J., Talón, E., Atarés, L., Vargas, M. and Chiralt, A.** (2013). Effect of the incorporation of antioxidants on physicochemical and antioxidant properties of wheat starch–chitosan films. *Journal of Food Engineering*, 118(3), pp.271-278.
- Botta, S.M.** (1979). Las especies argentinas del género *Aloysia* (Verbenaceae). *Darwiniana*, 22(1/3), 67-108.
- Brand, C., Townley, S. L., Finlay-Jones, J. J., & Hart, P. H.** (2002). Tea tree oil reduces histamine-induced oedema in murine ears. *Inflammation Research*, 51(6), 283-289.
- Brand-Williams W., Cuvelier Marie-Elisabeth, Berset, C.L.W.T.** (1994). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol.* 28(1):25-30.

- Burt, S. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3):223–53.
- Cáceres A., Cano, O., Samayoa, B., Aguilar, L. (1990).** Plants used in Guatemala for treatment of gastrointestinal disorders. "Screening of 84 plants against enterobacteria". *J Ethnopharmacol.* 30:55-73.
- Camarena Tello J.C., Martínez-Flores H.E., Garnica Romo, M.G., Padilla Ramírez, J.S., Saavedra-Molina, A., Alvarez Cortes, O., BartoloméCamacho, M.C.; Rodiles-López, J.O. (2018)** Quantification of Phenolic Compounds and In Vitro Radical Scavenging Abilities with Leaf Extracts from Two Varieties of *Psidium guajava* L.. *Antioxidants*, 7, 34.
- Campo Fernández, M., Cuesta Rubio, O., & Márquez Hernández, I. (2015).** Introducción a la caracterización estructural de flavonoides.
- Carnat, A., Carnat, A. P., Fraisse, D., & Lamaison, J. L. (1999).** The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea. *Fitoterapia*, 70(1), 44-49.
- Cázarez Chávez Denisse. (2017).** Efecto del aceite esencial de *Tagetes lucida* en una biopelícula de quitosano sobre *Botrytis cinerea* en frutos de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi), universidad michoacana de san Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México.
- CNETS. Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud (2010)** Diagnóstico y tratamiento de artritis reumatoide del Adulto. Guía Práctica del Consejo de Salubridad General D.F, México.
- Corrales, L.C., Muñoz Ariza, M.M. (2012).** Oxidative Stress: origin, evolution and consequences of oxygen toxicity. *Nova*, 10(18):213-225.
- Delgado Aceves, María de Lourdes; Andrade Ortega, Jesús Ángel y Ramírez Barragán, Carlos Alberto. (2015).** Caracterización fisicoquímica de propóleos colectados en el Bosque La Primavera Zapopan, Jalisco. *Rev. mex. decien. Forestales [online]*, vol.6, n.28, pp.74- 87. ISSN 2007-1132.
- Dellacassa, E., Bandoni, A. L. (2003).** *Aloysia Citriodora* Palau. *Revista de Fitoterapia*, 3(1), 19-25.
- Dewanto V., Wu X., Adom K.K., Liu, R.H. (2002).** Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agricult Food Chem*, 50(10):3010-3014.
- Di Leo Lira P, van Baren C.M., Retta D., Bandoni A.L., Gil A., Gattuso, M. (2008).** Characterization of lemon verbena (*Aloysia citriodora* Palau) from Argentina by the essential oil. *J Essent Oil Res.* 20(4):350-353.

- Din, M. U., Sarfraz, R. A., & Shahid, T.** (2015). Biological activity-based assessment of essential oil emulsions. *Journal of food processing and preservation*, 39(6), 1452-1456.
- Drago-Serrano, M.E., López-López, M., Sainz-Espuñes.** (2006). Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Rev Mex Ciencias Farmac.* (37):58-68.
- Estrada, E., Soto, B., Garza, M., Villarreal, J., Jiménez, J., Pando, M.** (2012). Plantas útiles en el centro-sur del Estado de Nuevo León. Universidad Autónoma de Nuevo León Press, Linares, NL, México, 381.
- Filella, X., Molina, R., y Ballesta, A. M.** (2002). Formación continuada del médico práctico: estructura y función de las citocinas. *Medicina integral: Medicina preventiva y asistencial en atención primaria de la salud*, 39(2), 63-71.
- Fretes Francisco.** (2010). Plantas medicinales y aromáticas: una alternativa de producción comercial. Paraguay: Agencia del Gobierno de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID).
- Gan, Q.** (2005). Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan – TPP nanoparticles intended for gene delivery. , 44, pp.65–73.
- García, A.Á., Carril, E.P.U.** (2011). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (biología)*, 2(3).
- Ghorai, N., Chakraborty, S., Guchait, S., Saha, S. K., & Biswas, S.** (2012). Estimation of total Terpenoids concentration in plant tissues using a monoterpene, Linalool as standard reagent. *Protocol Exchange*, 5(10), 1038.
- Gómez-Guillén, M. C., Ihl, M., Bifani, V., Silva, A., & Montero, P.** (2007). Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae* Turcz). *Food Hydrocolloids*, 21(7), 1133- 1143.
- Gordillo Galeano, A.** (2014). Preparación y caracterización de micropartículas sólidas lipídicas cargadas con aceite esencial de cidrón (*Aloysia triphylla*) mediante emulsificación por ultrasonido. Departamento de Farmacia.
- Guisado Barrilao, R., Martínez Beltrán, M., García Olivares, E., Bordés González, R.** (1994). El proceso inflamatorio. *Rev de Enfermería*, (4):30-33.
- Günther, E.** (1948) *The Essential Oils. Vol. 1: History and origin in Plants Production Analysis.* Krieger Publishing: New York, USA.

- Hawary, S. E., Yousif, M., Motaal, A. A., & Hameed, L. A. E.** (2011). Composition and bioactivities of the essential oil from Leaves of *Lippia citriodora* kunth cultivated in Egypt. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 1(2), 112-119.
- Horiba.** (2009). Colloidal silica as a particle size and charge reference material <http://www.titanex.com.tw/doc/tecsupport/TN-HR-Particle%20Size%20and%20Charge%20Reference%20Material.pdf> (Accesada el 30 de mayo de 2019)
- Jawahar, N., y Meyyanathan, S.** (2012). Polymeric nanoparticles for drug delivery and targeting: A comprehensive review. *International Journal of Health & Allied Sciences*, 1, 217-223.
- Juárez-Rosete, Cecilia.** (2013). Hierbas aromáticas y medicinales en México: tradición e innovación. *Revista Bio ciencias*. 2. 19-29.
- Jung H.** (2014) Edible films and coatings: a review. *Innovations in food packaging*. Second Edition. 9, 213\_255.
- Kumar, N.K., Kumar, K.S., Raman, B., Reddy, I., Ramarao, M., Rajagopal, S.** (2008) Antibacterial activity of *Lippia citriodora* a folklore plant. *JPAM*. 2(1):249-52.
- Madureira, A.R., Pereira, A. & Pintado, M.,** (2015). Current state on the development of nanoparticles for use against bacterial gastrointestinal pathogens. Focus on chitosan nanoparticles loaded with phenolic compounds., 130, pp.429–439.
- Martínez Flores Héctor Eduardo.** (2008). *Temas selectos en alimentos, nutrición y salud* 1 ed. Morelia, Mich., México: Morevallado.
- Martínez-Elizondo, P., Abud-Mendoza, C., Martínez-Osuma, P.** (2008). Introducción a la reumatología. *Rev. Colegio Mexicano de Reumatología* (4):2.
- Mitchell, R. N., Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C.** (2017). *Compendio de Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional*. Elsevier Health Sciences.. Ed. 6, Cap. 3(53).
- Nauman Khalid, Isao Kobayashi, Marcos A. Neves, Kunihiro Uemura and Mitsutoshi Nakajima** (2017). Microchannel emulsification: A promising technique towards encapsulation of functional compounds, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 10.1080/10408398.2017.1323724, 58, 14, (2364-2385).

- Okoh Sunday, O.** (2015). Antioxidant and Free Radical Scavenging Capacity of Crude and Refined Oil Extracted From *Azadirachta indica* A. Juss. *Intern J Biol.* 7(2):78-85.
- Oliveira, C.M.B.D., Sakata, R.K., Issy, A.M., Gerola, L.R., Salomão, R.** (2011). Cytokines and pain. *Rev Brasileira de Anestesiologia*, 61(2), 260-265.
- Pereira, E., Barros, L., Antonio, A. L., Cabo Verde, S., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C., & Rodrigues, P.** (2017). Is gamma radiation suitable to preserve phenolic compounds and to decontaminate mycotoxins in aromatic plants? A case-study with *Aloysia citrodora* Paláu. *Molecules*, 22(3), 347.
- Pérez-Alonso, N., & Jiménez, E.** (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotecnología vegetal*, 11(4).
- Peyron, A.** (1991). L'enrobage et les produits filmogènes: un nouveau mode d'emballage. *Viandes et produits carnés*, 12(2), 41-46.
- Pitsillides, A. A.** (2004). Inflammation Protocols. *Methods In Molecular Biology. Rheumatology*, 43(6).
- Ponce H, Fernández E, Ortiz M, Ramírez M, Cruz D, Pérez N.** (2010). Spasmolytic and antiinflammatory effects of *Aloysia triphylla* and citral, *in vitro* and *in vivo* studies. *J. Smooth Muscle* 46(6):309-19.
- Preedy, V.R.** (2016). *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety.* Academic Press. Londres, Inglaterra. pp 31-37.
- Quiñones, M., Miguel, M., Alexandre, A.** (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1): 76-89.
- Ricco, R. A., Wagner, M. L., Portmann, E., Reides, C., Llesuy, S., Gurni, A. A., & Carballo, M. A.** (2010). Análisis de polifenoles, actividad antioxidante y genotoxicidad en especies argentinas de *Lippia* y *Aloysia* (Verbenaceae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9(5), 388-396.
- Ricco, R.A., Wagner, M.L., Gurni, A.Á.** (2011). Dinámica de polifenoles de" Cedrón. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10(1):67-74.
- Rojas A.J., Palacios, A.O, Ortiz, S.J.M, López, L.** (2015). Evaluación de la toxicidad del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Britton (cedrón) y de la actividad anti-Trypanosoma cruzi del citral, in vivo. In *Anales de la Facultad de Medicina UNMSM Lima, Perú.* 76, (2):129-134.

- Russo, E. B.** (2011). Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British journal of pharmacology*, 163(7), 1344-1364.
- Smirnoff, N., Cumbes, Q.J.** (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochem.* 28(4):1057-1060.
- Speranza, L., Franceschelli, S., Pesce, M., Menghini, L., Patruno, A., Vinciguerra, I., y Grilli, A.** (2009). Anti-inflammatory properties of the plant *Verbascum mallophorum*. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, 23(3), 189-195.
- Taga, M.S., Miller, E.E., Pratt, D.E.** (1984). Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *J Amer Oil Chem Soc*, 61(5):928–931.
- Vargas Corrales, V.** (2012). Elaboración de té aromático a base de plantas cedrón (*Aloysia citrodora*) y toronjil (*Mellisa officinalis*) procesado con stevia (*Steviarebaudiana bertonii*) endulzante natural, utilizando el método de deshidratación. (tesis) Universidad Técnica de Cotopaxi. Ecuador
- Viegas Júnior, C. (2003).** Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova*, 390-400.
- Wernert, M.F., Wagner, M.L., Gurni, A.A., Carballo, M.A., Ricco, R.A.** (2009). Estudio de polifenoles de infusiones y cocimientos de hojas de Cedrón. *Boletín Latinoamer Caribe Plantas Medicin Arom*, 8(4):308-311.
- Winter, C.A., Riskey, E.A., Nuss, G.W.** (1962). Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proceedings Soc Experim Biol Medic.* 111(3):544-547.
- Zamora-Burbano, A. M., & Arturo-Perdomo, D. E.** (2016). Composición química del aceite esencial de hojas *Hedyosmum translucidum* Cuatrec., Chloranthaceae (Granizo). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 15(3), 192-198.
- Zúñiga, R. N., Skurtys, O., Osorio, F., Aguilera, J. M., & Pedreschi, F.** (2012). Physical properties of emulsion-based hydroxypropyl methylcellulose films: Effect of their microstructure. *Carbohydrate polymers*, 90(2), 1147-1158.