



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

División de Estudios de Posgrado



PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

OPCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

“Actividad antiinflamatoria y antiartrítica evaluada en rata por efecto de polifenoles extraídos por procesamiento ultrasónico y nanoencapsulados, a partir de hojas de cedrón (*Aloysia citriodora* Palau)”

TESIS

Que para obtener el grado académico de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Que presenta:

M.C. Osvaldo Alvarez Cortes

Director: Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores

Comité Tutorial

Dra. Martha Estrella García Pérez

Dra. Martha Eva Viveros Sandoval

Dra. María Carmen Bartolome Camacho

Dr. Juan Carlos González Hernández

Morelia, Michoacán, México, enero de 2026

EL SIGUIENTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO, A CARGO DEL DR. HÉCTOR EDUARDO MARTÍNEZ FLORES.

Agradecimientos

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

Dedicatoria

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 SECIHTI (Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación) por servir como intermediario, entre los ciudadanos mexicanos y yo, para poder brindarme el apoyo económico durante el Doctorado.

Agradezco al Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores, asesor del proyecto de investigación titulado “Actividad antiinflamatoria y antiartrítica evaluada en rata por efecto de polifenoles extraídos por procesamiento ultrasónico y nanoencapsulados, a partir de hojas de cedrón (*Aloysia citriodora* Paláu)”, por su invaluable apoyo, orientación y acompañamiento a lo largo del desarrollo de este trabajo. Reconozco especialmente las facilidades brindadas para el uso de la infraestructura y equipamiento, las cuales hicieron posible la realización de esta tesis. Asimismo, expreso mi profundo agradecimiento por la confianza otorgada para integrarme y desarrollarme en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Alimentos (L.I.D.A.), y por haber sido un pilar fundamental y un “padre académico” en mi formación como investigador.

Agradezco profundamente a mi familia, en especial a mi padre, José Guadalupe Alvarez Alvarez; a mi madre, Ofelia Cortes Rangel; y a mi hermana, María Guadalupe Alvarez Cortes, por su apoyo constante, comprensión y los valiosos consejos que me brindaron a lo largo de este proceso. Asimismo, agradezco a mi novia, Itzia Ileri Cerano Medina, por su acompañamiento, apoyo incondicional y motivación, los cuales fueron fundamentales para la realización y culminación de este proyecto.

Expreso mi más sincero agradecimiento a la Dra. Martha Estrella García Pérez, a la Dra. Martha Eva Viveros Sandoval, a la Dra. María Carmen Bartolomé Camacho y al Dr. Juan Carlos González Hernández por aceptar formar parte de mi comité sinodal durante mis cuatro años de formación doctoral. Aprecio profundamente el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis, así como sus valiosas observaciones, orientación académica y aportes profesionales, los cuales contribuyeron de manera significativa al fortalecimiento y a la calidad del presente trabajo.

Agradezco a la D.C. Eunice Tranquilino, al M.C. Rafael Contreras Chávez, a la M.C. Grecia Elena Hurtado Núñez, a la MC. Gabriela Ochoa Manzo y a la Dra. Sandra Guadalupe Sánchez Ceja por el valioso apoyo brindado y las asesorías ofrecidas durante el desarrollo del presente trabajo de tesis. Reconozco y valoro profundamente su disposición, acompañamiento académico y contribuciones, así como la amistad y el respaldo incondicional que me otorgaron a lo largo de este proceso. 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.

Tabla de contenidos

I. RESUMEN GENERAL	1
II. ABSTRACT	2
1. INTRODUCCION GENERAL	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Artritis reumatoide	5
2.2 Diagnóstico de la artritis reumatoide (AR)	7
2.2.1 Tratamientos para la artritis reumatoide	8
2.2.2 Fármacos modificadores de la enfermedad (FARME)	9
2.2.3 Plantas medicinales con efecto antiartrítico	11
2.2.4 Cedrón (<i>Aloysia citriodora</i> Paláu)	12
2.2.5 Métodos de extracción de fenoles	14
2.2.6 Secado y encapsulación de compuestos fenólicos	16
2.2.7 Materiales para encapsular fenoles	16
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVOS	19
5.1 OBJETIVO GENERAL	19
5.1.1. OBJETIVO PARTICULARES	19
6. Estrategia experimental	20
7. Capítulo 1: Análisis multifactorial de la temperatura, la relación soluto- disolvente y la amplitud del ultrasonido en la extracción de compuestos fenólicos y antioxidantes de hojas de <i>Aloysia citriodora</i> Paláu	21
7.1 Resumen	21
7.2 Abstract	22
7.3 Introducción	23
7.4 Materiales y métodos	24
7.4.1 Recolección de las hojas de <i>A. citriodora</i>	24
7.4.2 Obtención de los extractos fenólicos	24
7.4.3 Determinación de compuestos fenólicos y pruebas antioxidantes	25
7.4.4 Determinación de la actividad antioxidante	26

7.4.5 Análisis estadístico.....	27
7.5 Resultados.....	28
7.5.1 Identificación de la planta	28
7.5.2 Humedad y actividad de agua de las hojas de <i>A. citriodora</i>	29
7.5.3 Obtención de los extractos.....	30
7.5.4 Fenoles totales.....	31
7.5.5 Flavonoides totales.....	31
7.5.6 Radical DPPH•	33
7.5.7 Radical ABTS•+	33
7.5.8 Radical hidroxilo.....	34
7.5.9 Análisis multifactorial	37
7.5.10 Formulación de la Hipótesis	37
7.6 Conclusión	42
7.7 Referencias primer capítulo.....	43
8. Capítulo 2: Análisis de la superficie de respuesta para la encapsulación de extracto acuoso de hojas de <i>Aloysia citriodora</i> Paláu.....	48
8.1 Resumen	48
8.2 Abstract.....	49
8.3 Introducción	50
8.4 Materiales y métodos.....	51
8.4.1 Obtención de los extractos fenólicos	51
8.4.2 Contenido de sólidos totales	51
8.4.3 Método Box-Behnken.....	51
8.4.4 Preparación del extracto y el material de pared	52
8.4.5 Nanoencapsulación	52
8.4.6 Análisis Espectrofotométricos (uv-vis)	53
8.4.7 Análisis de cápsulas en polvo	54
8.4.8 Análisis estadístico.....	56
8.5 Resultados.....	56
8.5.1 Contenido de sólidos totales	56
8.5.2 Método Box-Behnken.....	57
8.5.3 Análisis HPLC del extracto pulverizado y las cápsulas óptimas	62
8.5.4 Morfología y tamaño de partícula de las cápsulas en polvo	69

8.5.5 Espectrometría infrarroja del extracto acuoso pulverizado y las cápsulas óptimas	72
8.6 Conclusión del capítulo II.....	74
8.7 Referencias segundo capítulo	75
9. Capítulo 3: Actividad antiinflamatoria y antiartrítica evaluada en un modelo in vivo.....	81
9.1 Resumen	81
9.2 Abstract.....	83
9.3 Introducción	85
9.4 Materiales y métodos.....	88
9.4.1 Inhibición de los ensayos de desnaturalización de proteínas	88
9.4.2 Determinación de la actividad antiinflamatoria.....	88
9.4.3 Determinación de la actividad antiartrítica.....	89
9.4.4 Puntuación de artritis.....	90
9.4.5 Hinchazón de las patas traseras	91
9.4.6 Radiología de la pata de rata.....	91
9.4.7 Medición del índice esplénico y tímico	91
9.4.8 Procesamiento histológico del tejido óseo.....	92
9.4.9 Procesamiento histológico de riñones y bazo	93
9.4.10 Tinciones	94
9.4.11 Evaluación histológica	95
9.4.12 Análisis estadístico	96
9.5 Resultados y discusión.....	96
9.5.1 Inhibición de los ensayos de desnaturalización de proteínas	96
9.5.2 Actividad antiinflamatoria: Edema subplantar inducido por carragenina ..	97
9.5.3 Determinación de la actividad antiartrítica: peso corporal	99
9.5.4 Actividad antiinflamatoria: inducidas por colágeno tipo II bovino y adyuvante incompleto de Freund	102
9.5.5 Efecto sobre el índice esplénico, el tímico y renal en rata.....	104
9.5.6 Análisis Radiográfico	107
9.5.7 Índice histopatológico articular.....	109
9.5.8 Evaluación del daño renal y bazo	114
9.6 Conclusión	118
9.7 Referencias tercer capítulo.....	119

9.8 Conclusión general	125
9.9 Referencias generales	126
Anexo 1	135
Anexo 2	140

Índice de figuras

Figura 1. Patogénesis de la AR. Imagen realizada en BioRender software.	7
Figura 2. Mecanismo de acción de FARMES biológicos. Tomado y modificado de Nick Delrose (2024). Imagen realizada en BioRender software.	11
Figura 3. Hojas de cedrón (<i>A. citriodora</i>).	28
Figura 4. Flor de cedrón (<i>A. citriodora</i>).	28
Figura 5. Fruto de cedrón (<i>A. citriodora</i>).	29
Figura 6. Valores de fenoles <i>r</i> (media de mínimos cuadrados) calculados a partir de la ecuación de regresión lineal múltiple reportada considerando todos posibles combinaciones de los factores de temperatura (<i>T</i>), concentración soluto/solvente (<i>R</i>) y amplitud (<i>A</i>).	39
Figura 7. Valores de flavonoides <i>r</i> (media de mínimos cuadrados) calculados de la ecuación de regresión lineal múltiple considerando las posibles combinaciones de los factores de temperatura (<i>T</i>), concentración soluto/solvente (<i>R</i>) y amplitud (<i>A</i>).	41
Figura 8. Valores del radical hidroxilo <i>r</i> (media de mínimos cuadrados) calculados de la ecuación de regresión lineal múltiple considerando las posibles combinaciones de los factores de temperatura (<i>T</i>), concentración soluto/solvente (<i>R</i>) y amplitud (<i>A</i>).	41
Figura 9. Secado del extracto acuoso en Nano spray dryer B 90. (Tomado de Alvarez, 2020). ____	53
Figura 10. Grafica de efectos principales para E.E.	59
Figura 11. Grafica de efectos principales para flavonoides.	60
Figura 12. Gráfica de efectos principales para IC50 radical hidroxilo.	61
Figura 13. Gráfica de superficie de respuesta estimada.	62
Figura 14. Cromatogramas a) verbascósido, b) extracto acuoso, c) cápsulas óptimas.	68
Figura 15. Cromatograma del extracto pulverizado.	68
Figura 16. Micrografías de las diferentes cápsulas a) cápsulas optimas, b) cápsulas #5, c) cápsulas #10 d) cápsulas # 15.	71
Figura 17. Micrografías del extracto óptimo pulverizado.	72
Figura 18. Espectros de FTIR a) extracto pulverizado, b) cápsulas óptimas, c) verbascósido. ____	73
Figura 19. Esquema de articulación femorotibiales.	93
Figura 20. Efecto de las cápsulas de <i>A. citriodora</i> de en peso corporal e índice artrítico. Grupo con AR + cápsulas del extracto acuoso a 200 mg/kg/día *; β Grupo con AR + cápsulas del extracto acuoso a 400 mg/kg/día **; δ Grupo control sin Artritis.; γ Grupo con AR + MTX a 1 mg/kg/día; ϵ con AR + H ₂ O).	99
Figura 21. Efecto de las cápsulas de <i>A. citriodora</i> de en el edema subplantar inducido 102	
Figura 22. Efecto de las cápsulas de <i>A. citriodora</i> en órganos de ratas Wistar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0.05$ (ANOVA, seguido de la prueba de Tukey). N = 6. (α Grupo con AR + cápsulas del extracto acuoso a 200 mg/kg/día *; β Grupo con AR + cápsulas	

del extracto acuoso a 400 mg/kg/día**; δ Grupo control sin Artritis.; γ Grupo con AR + MTX a 1 mg/kg/día; ε con AR + H ₂ O).	106
Figura 23. Radiografía de grupos control: donde a) y c) pertenecen al control positivo de la enfermedad; b) y d) al control sano.	108
Figura 24. Radiografía de grupos control donde a) y b) pertenecen al grupo metotrexato (γ), c) a las cápsulas 200 mg (α) y d) cápsulas a 400 mg (β).	108
Figura 25. Corte histológico de la articulación femorotibial. ES - Espacio sinovial, Ca – Cartílago articular, M – Menisco, MS – Membrana sinovial, H- Hueso, Mo – Médula ósea, Csb – Cartílago subcondral, Hs – Hiperplasia de la membrana sinovial, D – Perdida de la tinción de Safranina O, InL – Infiltrado linfocitario, P - Pannus, Corchetes – Perdida de la tinción y fisuras en cartílago subcondral, E – Espícula ósea, Aq – Anquilosis, F - Fibrosis, E – Edema, Rm – Ruptura del menisco, Flecha de punta doble - Hiperplasia de la membrana sinovial, Cc – Cartílago calcificado, Er – erosión del cartílago, Fs - Fisura del cartílago, Línea punteada – Pérdida del cartílago subcondral, Pc – Pérdida de condrocitos. (α Grupo con AR + cápsulas del extracto acuoso a 200 mg/kg/día *; β Grupo con AR + cápsulas del extracto acuoso a 400 mg/kg/día**; δ Grupo control sin Artritis.; γ Grupo con AR + MTX a 1 mg/kg/día; ε Con AR + H ₂ O).	112
Figura 26. Corte histológico del riñón y bazo. H - Hiperplasia glomerular, Cg – Congestión capilar glomerular, Ct - Congestión capilar tubulointersticial, Inp-Inflamación periglomerular, Int – Infiltrado túbulo intersticial, D – Degeneración celular cariólisis y cariorexis, A – Atrofia tubular, E-Edema, InL – Infiltrado linfocitario. (α Grupo con AR + cápsulas del extracto acuoso a 200 mg/kg/día *; β Grupo con AR + cápsulas del extracto acuoso a 400 mg/kg/día**; δ Grupo control sin Artritis.; γ Grupo con AR + MTX a 1 mg/kg/día; ε Con AR + H ₂ O).	117

Índice de tablas

Tabla 1. Criterios de exclusión para la AR. (Tomado y modificado de Mikuls et al., 2014).	7
Tabla 2. Categorías taxonómicas del cedrón.	13
Tabla 3. Metabolitos secundarios de A. citriodora. (Tomado y modificada de Bahramsoltani et al., 2018).	15
Tabla 4. Parámetros para la extracción asistida por ultrasonido.	25
Tabla 5. Parámetros para la extracción por ultrasonido.	30
Tabla 6. Fenoles y flavonoides totales de extractos de A. citriodora obtenidos por extracción ultrasónica.	32
Tabla 7. Eliminación de radicales libres de extractos de A. citriodora.	35
Tabla 8. TEAC de extractos de A. citriodora.	36
Tabla 9. Niveles de Valor p del análisis de varianza de tres vías para el efecto del Temperatura (T), concentración soluto/solvente (R) y Amplitud (A).	38
Tabla 10. Efecto de la temperatura sobre las variables respuesta.	39
Tabla 11. Efecto de la relación (soluto/solvente) sobre las variables respuesta.	40
Tabla 12. Efecto de la amplitud sobre las variables respuesta.	40
Tabla 13. Diseño Box-Behnken.	52
Tabla 14. Capacidad antioxidante del extracto de cedrón (T3R3A2).	56
Tabla 15. Análisis de microcápsulas.	57
Tabla 16. Moléculas presentes en el extracto de hojas de cedrón.	64

Tabla 17. Caracterización de los compuestos presentes en el extracto de hojas de cedrón (<i>A. citriodora</i>) encapsulado y no encapsulado.	66
Tabla 18. Tamaño de cápsulas.	70
Tabla 19. Plan de Tratamiento.	90
Tabla 20. Criterios para el índice artrítico.	91
Tabla 21. Esquema de procesamiento histológico para tejido óseo.	92
Tabla 22. Esquema de tinción para tejido óseo, riñón y bazo.	94
Tabla 23. Inhibición de la Desnaturalización de la albumina de huevo.	97
Tabla 24. Efecto de las cápsulas de <i>Aloysia citriodora</i> en el edema subplantar inducido por carragenina.	98
Tabla 25. Peso corporal de ratas artríticas tratadas con cápsulas de <i>A. citriodora</i> .	100
Tabla 26. Índice artrítico en ratas tratadas con cápsulas de <i>A. citriodora</i> .	101
Tabla 27. Cambios del diámetro de la pata en ratas tratadas con cápsulas de <i>A. citriodora</i> .	103
Tabla 28. Efecto de los tratamientos con cápsulas de <i>A. citriodora</i> y metotrexato sobre los índices esplénico, tímico y renal en ratas con artritis.	107
Tabla 29. Índice histopatológico del daño articular.	111
Tabla 30. Evaluación histológica del daño renal.	115

Abreviaturas

A:	Amplitud
AH:	Albúmina de huevo
At:	Atrofia tubular
ABTS^{•+}:	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
Ae. :	Ácida- escarlata
AGEs:	Productos finales de glucosilación avanzada
AICAR:	5-aminoimidazol-4-carboxamida ribósido
AINEs:	Antinflamatorios no esteroideos
An. :	Anilina
ANOVA:	Análisis de la varianza
anti-CCP:	Anticuerpos contra péptidos citrulinados cíclicos
Aq:	Anquilosis
AR:	Artritis reumatoide
ATIC:	Inosina monofosfato sintasa
Aw:	Actividad de agua
C1-C2:	Vértebras cervicales Atlas y Axis
Ca:	Cartílago articular

Cc:	Cartílago calcificado
CCP:	Péptido citrulinado
CFS:	Compuestos fenólicos en de superficie de las cápsulas
Cg:	Congestión capilar glomerular
CI₅₀:	Mitad de la concentración inhibitoria
CMC:	Carboximetilcelulosa
COX-2:	Ciclooxigenasa-2
Csb:	Cartílago subcondral
Ct:	Congestión capilar tubulointerstitial
D:	Pérdida de la tinción de Safranina O
De:	Degeneración celular cariólisis y cariorexis
DHFR:	Dihidrofolato reductasa
DPPH:	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
Eo:	Espícula ósea
E:	Edema
E. E:	Eficiencia de encapsulación
EAU:	Extracción asistida por ultrasonido
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
Er:	Erosión del cartílago
ERO:	Especies reactivas de oxígeno
ES:	Espacio sinovial
F:	Fibrosis
FARME:	Medicamentos antirreumáticos modificadores de la enfermedad
FC:	Folin-Ciocalteu
FDA:	Administración de alimentos y medicamentos
fos. :	Fosfomolibdicofostungstico.
FPGS:	Folilpoliglutamato sintasa
FR:	Factor reumatoide
Fs:	Fisura del cartílago
GAE:	Equivalentes de ácido gálico
Hu:	Hueso
Hg:	Hiperplasia glomerular
H&E:	Hematoxilina y eosina
Ho:	Hipótesis nula
HPLC:	Cromatografía líquida de alta eficacia
Hs:	Hiperplasia de la membrana sinovial
IF:	Interfalángica
IFP:	Interfalángicas proximales
FTIR:	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier
IL:	Interleucina
InL:	Infiltrado linfocitario

Inm. :	Inmersiones
iNOS:	Enzima sintasa de óxido nítrico inducible
Inp:	Inflamación periglomerular
Int:	Infiltrado túbulo intersticial
JMP:	John's Macintosh Project
LPS:	Lipopolisacárido
LSN:	Límite superior del intervalo normal
M:	Menisco
MCF:	Metacarpofalángicas
Mo:	Médula ósea
MS:	Membrana sinovial
MTF:	Metatarsofalángicas
MTX:	Metotrexato
NFκB:	Factor Nuclear kappa B
NO:	Óxido nítrico
OH·:	Radical hidroxilo
OVA:	Ovoalbúmina
P:	Pannus
Pc:	Pérdida de condrocitos
PCR:	Proteína C reactiva
PBS:	Solución salina tamponada con fosfato
QE:	Equivalente de quercetina
R:	Concentración soluto/solvente
R. T:	Tiempo de retención
RAW:	Macrófagos murinos de ratón
Rm:	Ruptura del menisco
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
T:	Temperatura
TEAC:	Actividad Equivalente de Trolox
THF:	Tetrahidrofolato
TNF-α:	Factor de necrosis tumoral alfa
Trolox:	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
VSG:	Velocidad de sedimentación globular

I. RESUMEN GENERAL

En este estudio se evaluó la eficiencia de la extracción asistida por ultrasonidos y la nanoencapsulación de compuestos fenólicos obtenidos de hojas de *Aloysia citriodora* Paláu, así como su potencial terapéutico en un modelo experimental de artritis reumatoide. La extracción ultrasónica fue optimizada mediante un diseño factorial 3³, identificándose que las condiciones de 75 °C, una relación soluto-solvente de 1:15 y una amplitud del 25 % generaron el extracto con mayor actividad antioxidante. Este extracto presentó altos contenidos de compuestos fenólicos y flavonoides, y una notable capacidad de neutralización de los radicales ABTS^{•+}, DPPH[•] y OH[•]. Los extractos fueron nanoencapsulados utilizando un diseño Box-Behnken para evaluar la eficacia de materiales de pared como maltodextrina, carboximetilcelulosa (CMC) y goma guar. La encapsulación con CMC mostró la mayor eficiencia (94.93%) y buena actividad antioxidante, preservando compuestos bioactivos como verbascósido, luteolina y martinósido. Las cápsulas presentaron morfología esférica y estabilidad estructural. El análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución y Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier confirmaron la integridad química post-encapsulación. La técnica de secado por aspersión protegió eficazmente los compuestos y mejoraron su liberación controlada, resaltando su potencial para aplicaciones terapéuticas. Las cápsulas de *A. citriodora* fueron evaluadas en un modelo de artritis reumatoide inducida por colágeno tipo II y adyuvante incompleto de Freund. La dosis de 400 mg/kg/día mostró un efecto antiartrítico y antiinflamatorio significativo, retrasando la aparición de signos clínicos, mejorando la movilidad y reduciendo el daño histopatológico en la articulación femorotibial. Además, se preservó la estructura esplénica y no se observaron efectos tóxicos renales, lo que respalda su seguridad. La dosis de 200 mg/kg/día no produjo beneficios terapéuticos evidentes. La eficacia del extracto a 400 mg/kg/día superó la del metotrexato, sugiriendo que compuestos como verbascósido, martinósido, luteolina y kaempferol podrían actuar de forma individual o sinérgica para modular la inflamación. Los resultados evidenciaron que la extracción ultrasónica, la nanoencapsulación y la

administración de extractos de *A. citriodora* representan una estrategia prometedora para el desarrollo de tratamientos naturales contra la artritis reumatoide.

Palabras clave: Cedrón; Artritis; Polifenoles; Inflamación; Verbascósido.

II. ABSTRACT

In this study, the efficiency of ultrasound-assisted extraction and the nanoencapsulation of phenolic compounds obtained from the leaves of *Aloysia citriodora Palau* was evaluated, as well as their therapeutic potential in an experimental model of rheumatoid arthritis. Ultrasound extraction was optimized using a 3³ factorial design, identifying that the conditions of 75 °C, a solute–solvent ratio of 1:15, and an amplitude of 25 % produced the extract with the highest antioxidant activity. This extract showed high levels of phenolic compounds and flavonoids, and a remarkable capacity to neutralize ABTS^{•+}, DPPH[•] and OH[•] radicals. The extracts were nanoencapsulated using a Box–Behnken design to evaluate the efficiency of wall materials such as maltodextrin, CMC, and guar gum. Encapsulation with CMC exhibited the highest efficiency (94.93%) and strong antioxidant activity, preserving bioactive compounds such as verbascoside, luteolin, and martynoside. The resulting microcapsules displayed spherical morphology and structural stability. The high-performance liquid chromatographic and Fourier Transform Infrared Spectroscopy analyses confirmed the chemical integrity of the phenolics after encapsulation. The spray-drying technique effectively protected the compounds and improved their controlled release, highlighting their potential for therapeutic use. The *A. citriodora* capsules were evaluated in a rheumatoid arthritis model induced by type II collagen and incomplete Freund's adjuvant. The 400 mg/kg/day dose showed significant anti-arthritic and anti-inflammatory effects, delaying the onset of clinical signs, improving mobility, and reducing histopathological damage in the femorotibial joint. Additionally, spleen architecture was preserved and no renal toxicity was observed, supporting the safety of the treatment. The 200 mg/kg/day dose did not produce evident therapeutic benefits. The 400 mg/kg/day extract demonstrated greater efficacy than methotrexate, suggesting that compounds such as verbascoside, martynoside, luteolin, and

kaempferol may act individually or synergistically to modulate inflammation. Overall, these results demonstrate that ultrasound extraction, nanoencapsulation, and oral administration of *A. citriodora* extracts represent a promising strategy for the development of natural treatments for rheumatoid arthritis.

Keywords: Lemon verbena; Arthritis; Polyphenols; Inflammation; Verbascoside.

1. INTRODUCCION GENERAL

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad reumática poliarticular simétrica, clasificada como conectivopatía, ya que afecta el tejido sinovial de las articulaciones. Aunque la inflamación articular es característica de la AR, también puede ser causada por otras patologías, como la artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, o el lupus eritematoso sistémico (Firestein, 2003; McGonagle *et al.*, 1998). La AR afecta aproximadamente del 0.2 al 2 % de los adultos y es casi tres veces más frecuente en mujeres que en hombres. La etiología de la AR es multifactorial y aún no completamente comprendida, entre las causas principales se incluyen factores genéticos y ambientales, el alelo HLA-DR4 es uno de los genes más asociados a la enfermedad, aunque no es el único. Otros genes, como Traf1 y Stat4, también incrementan el riesgo de desarrollar AR (Holoshitz, 2010; Anderson *et al.*, 2021; Mohannad *et al.*, 2016). La AR es lentamente progresiva con evolución a daño articular, se caracteriza por afectación simétrica de pequeñas articulaciones de las manos y los pies, posteriormente avanza a grandes articulaciones. El manejo de la AR inicia con un diagnóstico oportuno y el inicio pertinente de la terapia. Esta se sustenta en el uso de medicamentos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME), antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y corticoides. Los FARME pueden clasificarse en convencionales y biológicos, los convencionales son los más empleados por su accesible costo, siendo el metotrexato el tratamiento de primera línea. En la AR, el tejido sinovial prolifera de manera descontrolada, causando distensión de tendones y ligamentos, acompañado de destrucción ósea. Esto lleva a deformidades y discapacidad progresiva lo que ocasiona problemas laborales y hasta afectaciones psicológicas. En México en el año 2021, un estudio transversal en

pacientes con AR se observó que los pacientes con actividad de la enfermedad reportaron puntuaciones más altas de depresión en comparación con los pacientes en remisión, destacando una relación entre los síntomas depresivos, los factores sociales, la percepción de la enfermedad y la sinovitis en ecografía (Sánchez *et al.*, 2022). Es por ello, que, ante la falta de una solución completamente satisfactoria con los medicamentos disponibles, algunos pacientes recurren a alternativas medicinales, incluyendo el uso de plantas medicinales, cuyo interés ha ido en aumento (Shalini *et al.*, 2023).

A. citriondora (conocida como cedrón) ha sido estudiada en diversos países con el propósito de conocer su composición en metabolitos secundarios y las diferentes propiedades que ejercen en los sistemas biológicos. La infusión de las hojas es usada en México y en países sudamericanos para calmar dolores, afecciones nerviosas y gastrointestinales, como son, cólicos, diarrea, indigestión, flatulencias, náuseas, vómito, inflamaciones, úlceras y dolores menstruales (Maia *et al.*, 2011; El-Hawary *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2015; García *et al.*, 2018). En estudios realizados en extractos acuosos de *A. citriondora* se encontraron 51.85 mg equivalentes de ácido tánico/g material seco (Wernert *et al.*, 2009); por otro lado, Köroğlu *et al.* (2015) obtuvo 483.56 mg equivalentes a de ácido gálico/g de extracto metanólico. Las hojas del cedrón son abundantes en compuestos fenólicos cuyo componente principal es el verbascósido, al cual se le atribuye actividad antiinflamatoria y además contiene luteolina 7-O-diglucurónico, ácido p-cumárico, feniletanoide, eucovósido, y martinósido (Pereira *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2020). Las anteriores moléculas ejercen efectos antioxidantes mediante la eliminación especies reactivas de oxígeno (ERO) a corto plazo, previniendo reacciones iniciales que generan daño oxidativo; a largo plazo interactúa al nivel de genes que codifican enzimas prooxidantes, reduciendo la producción de ERO. 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; Alvarez, 2020). 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. La estabilidad de los polifenoles podría mejorarse utilizando tecnologías de encapsulación, como el secado por aspersión (Ersus y Yurdagel, 2007). Por lo relatado anteriormente, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de las cápsulas del extracto de *A. citriodora* sobre la capacidad antiinflamatoria y antiartrítica en ratas Wistar.

2. ANTECEDENTES

2.1 Artritis reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es una patología crónico-degenerativa autoinmune que compromete principalmente el tejido sinovial, provocando poliartritis simétrica con manifestaciones de dolor, inflamación y rigidez articular. Su inicio es insidioso y progresivo, afectando inicialmente las articulaciones pequeñas y periféricas como las metacarpofalángicas e interfalángicas proximales, con posterior extensión a rodillas, hombros y eventualmente caderas. A nivel mundial se ve una tendencia al alza, con números que demuestran el incremento de casos en las últimas décadas. En el año 2020, aproximadamente 17.6 millones de personas tenían diagnóstico de AR en todo el mundo, con una tasa de prevalencia global estandarizada por edad de 208.8 casos por cada 100,000 habitantes, lo que refleja un aumento del 14.1 % desde 1990 (Black et al., 2023). La AR es más frecuente de 2 a 3 veces más en mujeres que en hombres. La AR se presenta de 2 a 3 veces más en mujeres que en hombres. En un estudio transversal realizado en el año 2015, donde se incluyeron a 19,213 personas mayores de 18 años en cinco regiones geográficas de México, se encontró que la prevalencia de la AR osciló entre 0.77% y 2.8% entre las regiones, lo que resalta la variabilidad geográfica en la preponderancia de esta enfermedad (Moreno *et al.*, 2015). El origen de la AR involucra múltiples causas y permanece parcialmente desconocido. Entre los elementos más relevantes se encuentran influencias hereditarias y del entorno, destacando el alelo HLA-DR4 como uno de los más vinculados, aunque no exclusivo. Además, la exposición a factores ambientales como

a la sílice o el tabaquismo puede contribuir al desarrollo de la enfermedad en personas genéticamente predispuestas (Yahya *et al.*, 2013).

En la Figura 1 se observa la patogénesis de la AR, que comienza con la síntesis de grandes cantidades de anticuerpos contra péptidos citrulinados cíclicos (anti-CCP) y la producción de factor reumatoide (FR). En estos procesos participan células presentadoras de antígenos, como macrófagos y células dendríticas, así como de linfocitos T y B, en las articulaciones inflamadas también intervienen sinoviocitos y neutrófilos (Mehta *et al.*, 2023; Ma *et al.*, 2024). Por otro lado, la AR causa un desequilibrio entre el crecimiento y la resorción ósea, donde se ven afectados osteocitos, osteoclastos, y osteoblastos (Akyer *et al.*, 2023). En los tejidos afectados se identifican mediadores inflamatorios clave, como las interleucinas IL-6, IL-1 e IL-23, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), y ERO, que desempeñan un papel crucial en la inflamación y daño articular característicos de la AR (Barik y Bhatt, 2021; Ahsan *et al.*, 2023). La AR tiene una sintomatología que inicia con la anemia y fatiga, en una fase primaria se inflaman las articulaciones entre las que se encuentran articulaciones metacarpofalángicas (MCF), interfalángicas proximales (IFP) y metatarsofalángicas (MTF). Después, en una fase intermedia, se afectan articulaciones como las de los codos, muñecas, tobillos y rodillas. En una etapa tardía, la enfermedad puede comprometer articulaciones cervicales especialmente en C1-C2 (vértebras cervicales Atlas y Axis). Además, se desarrolla el pannus, un tejido inflamatorio que invade cartílago y hueso provocando erosión y deformidad articular. Otro hallazgo característico son los nódulos reumatoides, lesiones inflamatorias subcutáneas que aparecen en zonas de presión y reflejan la naturaleza sistémica de la enfermedad (Mikuls *et al.*, 2014).

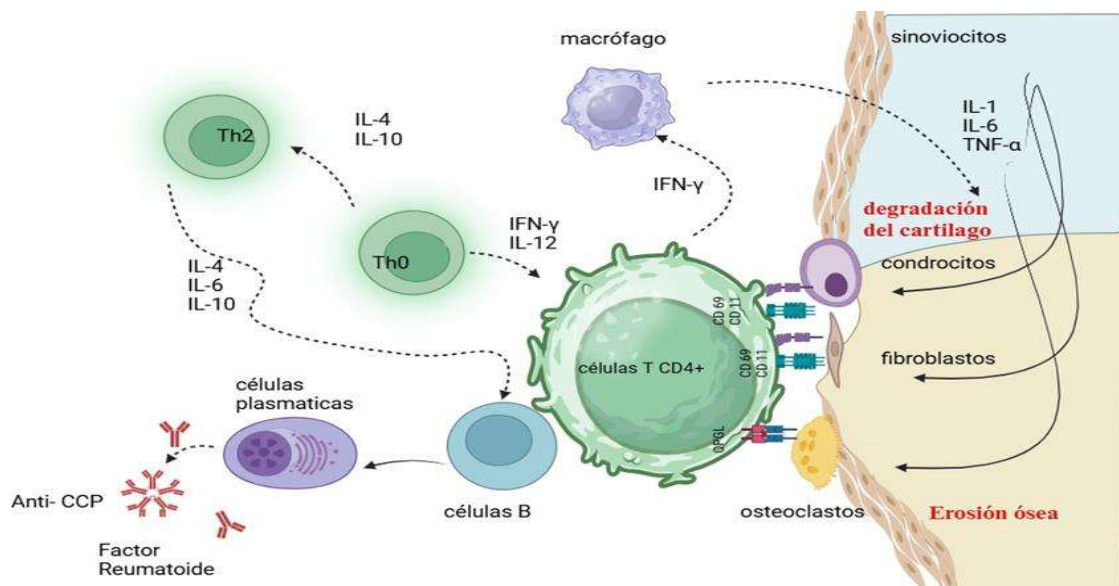


Figura 1. Patogénesis de la AR. Imagen realizada en BioRender software.

2.2 Diagnóstico de la artritis reumatoide (AR)

La “American College of Rheumatology y European League Against Rheumatism” ha establecido criterios de clasificación para la AR, y diferenciarla de otras enfermedades reumáticas. Los criterios incluyen: interrogatorio clínico, exploración física, estudios de laboratorio, pruebas de imagen como radiografías, y detección de autoanticuerpos, como el anti-CCP y el factor reumatoide (FR) (Aletaha *et al.*, 2023). En la Tabla 1 se muestran los criterios del diagnóstico de AR, aprobados por EULAR en el año 2010, donde si se cumplen ≥ 6 puntos se considera que padece AR y debe iniciar su tratamiento (Mikuls *et al.*, 2014).

Tabla 1. Criterios de exclusión para la AR. (Tomado y modificado de Mikuls *et al.*, 2014).

Afectación articular (incluye aumento de volumen o hipersensibilidad al dolor en la articulación)
1 articulación grande (0 puntos)
De 2 – 10 articulaciones grandes (1 punto)
De 1 – 3 articulaciones pequeñas (2 puntos)
De 4 – 10 articulaciones pequeñas (3 puntos)
> 10 articulaciones (al menos una articulación pequeña) (5 puntos)
Serología
FR negativo y anticuerpo contra CCP negativo (0 puntos)
FR positivo o cifra baja de anticuerpo contra CCP (2 puntos)
FR con valor alto o anticuerpo contra CCP con valor alto (3 puntos)
Marcadores de la fase aguda
PCR normal y VSG normal (0 puntos)

PCR anormal o VSG anormal (1 punto)
Duración de la sintomatología
< 6 semanas (0 puntos)
≥ 6 semanas (1 punto)
Articulaciones grandes = hombros, codos, caderas, rodillas y tobillos; articulaciones pequeñas= MCF, IFP, segunda a quinta MTF, IF del pulgar y muñecas. Valor positivo bajo: > LSN, pero < x 3 LSN; positivo alto: >x3LSN. CCP: péptido citrulinado; PCR: proteína C reactiva; VSG: velocidad de sedimentación globular; IF: Interfalángica; MCF: metacarpofalángicas; MTF; metatarsofalángica; IFP: Interfalángica proximal; FR: factor reumatoide; LSN: límite superior del intervalo normal.

Es importante el diagnóstico oportuno y adecuado para iniciar el tratamiento y evitar la evolución de la AR. La AR puede derivar en otras patologías, se conoce que la causa del aumento de la mortalidad de la AR está asociada a la inflamación sistemática y sus efectos en el endotelio vascular lo que conduce a una patología renal o cardíaca (Mikuls *et al.*, 2014).

2.2.1 Tratamientos para la artritis reumatoide

El tratamiento de la AR requiere detección temprana e intervención farmacológica oportuna. Se emplean principalmente fármacos modificadores de la enfermedad (FARME), antiinflamatorios no esteroideos y glucocorticoides. Los FARME se dividen en sintéticos y biológicos, siendo los primeros los más prescritos por su bajo costo. Dentro de ellos metotrexato es el agente de elección. En ocasiones, se combina con otros FARME como la hidroxicloroquina o la sulfasalazina. Por otro lado, los FARME biológicos son más selectivos en su mecanismo de acción, por lo cual son más costosos. Algunos ejemplos incluyen el infliximab, un anticuerpo dirigido contra el TNF- α , y el tocilizumab, que bloquea el receptor de IL-6. La combinación de un inhibidor de TNF- α con metotrexato ha demostrado ofrecer mejores resultados en el control de la enfermedad (Saag *et al.*, 2008; Bullock *et al.*, 2019). En la AR, la membrana sinovial sufre una hiperplasia patológica que conduce a la formación de un pannus inflamatorio, el cual infiltra y erosiona cartílago, hueso subcondral y tejidos periarticulares, provocando distensión ligamentosa, daño tendinoso y destrucción

ósea progresiva, el cual provoca un dolor intenso. Si bien la AR hasta el momento no tiene una cura, existen medicamentos que pueden retrasar la evolución y aliviar los dolores que agobian a los enfermos.

2.2.2 Fármacos modificadores de la enfermedad (FARME)

Los FARME ralentizan o detienen el daño articular causado por el sistema inmunitario. El FARME más usado es el metotrexato (MTX), el cual tiene acción anti-folato. El MTX ingresa a la célula mediante el transportador SLC19A1 y su retención intracelular mediante poliglutamación catalizada por folilpoliglutamato sintasa (FPGS). Al ingresar a la célula, el MTX y sus poliglutamatos inhiben competitivamente el dihidrofolato reductasa (DHFR), perturbando la regeneración de tetrahidrofolato (THF) y alterando el ciclo de folatos. Esta intervención facilita el potencial de daño celular inducido por el agente. La inhibición de la vía de las purinas provoca la disminución de la disponibilidad de cofactores cruciales para la síntesis *in novo* de purinas y pirimidinas; además, se han inhibido las enzimas, así como el impedimento de la sintetasa de monofosfato de inosina (ATIC), en la vía de las purinas y como de las pirimidinas, en la síntesis de timidilato. Como consecuencia, se reduce la producción de nucleótidos necesarios para la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN), lo que limita la proliferación celular. La acumulación del intermediario 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribósido (AICAR), derivada de la inhibición de ATIC, incrementa la concentración de adenosina, contribuyendo a los efectos antiinflamatorios del fármaco. En el estudio de Williams en 1985, a 189 pacientes se les suministró vía oral MTX (7.5-15 mg), y se observó en el 32% de los pacientes una disminución en el dolor y rigidez articular, y un 21% de índice de hinchazón. En otro estudio, en 1985 se observó que en un ensayo cruzado doble ciego de 35 pacientes y 24 semanas de duración de MTX semanal a baja dosis (7.5 a 15.0 mg). Comenzó a verse una mejora clínica a las tres semanas del inicio de MTX. En este estudio se observó un aumento de la actividad de la enfermedad en pacientes que pasaron de MTX a placebo (Williams *et al.*, 1985; Weinblatt *et al.*, 1985; Coury y Weinblatt, 2010). En 1988, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) otorgó la aprobación oficial de MTX, reconociendo su eficacia y perfil de seguridad en esta

indicación. En un estudio transcripcional reportado en el año 2025, identificaron reguladores clave como EGR1, JAK2 y SOCS1 en monocitos y linfocitos T de memoria CD4+, como mediadores centrales de los efectos inmunomoduladores del MTX. En este estudio se abordaron rutas como la señalización de TNF- α , del receptor de linfocitos B y la apoptosis mediada por el receptor de linfocitos T, los cuales también tiene un efecto el uso del MTX (Preglej *et al.*, 2025). En diversos estudios se ha observado como efecto secundario más frecuente al uso de MTX, alteraciones gastrointestinales, hepatotoxicidad, neumonitis, disfunciones hematológicas, infecciones, nefrotoxicidad y reacciones cutáneas (Wang *et al.*, 2018). Se recomienda como terapia inicial a personas con AR, el uso de MTX, combinado con hidroxicloroquina o sulfasalazina, ya que el uso del MTX por sí solo no tiene un efecto benéfico sobre el paciente. Cuando este tratamiento no logra tener una remisión de la patología, se opta por el uso de FARME biológicos. El avance tecnológico en la producción de nuevos fármacos específicos ha aumentado debido a la identificación de las estructuras de los anticuerpos, así como la recombinación genética. La administración de alimentos y medicamentos (FDA) aprobó el uso de FARME biológicos para el tratamiento de AR, e incluyen: anticuerpos monoclonales, antagonistas del receptor de interleucinas y proteínas de fusión. En agosto de 1998, la FDA aprobó infliximab para el tratamiento de AR, en combinación con MTX, en pacientes que han tenido una respuesta inadecuada a MTX solo (Malviya *et al.*, 2013). En la Figura 2 se muestran algunos mecanismos de acción de medicamentos biológicos.

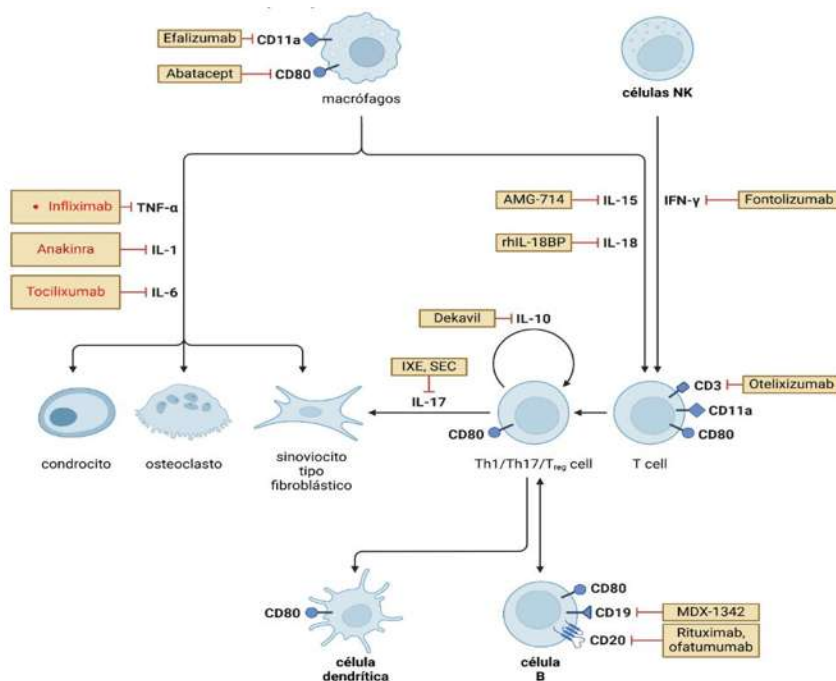


Figura 2. Mecanismo de acción de FARMES biológicos. Tomado y modificado de la Unidad de Inmunidad con el TNF- α soluble y transmembrana, forma complejos inmunes estables que bloquean la interacción de estas moléculas con los receptores. Nick DeRose (2024). Imagen realizada en BioRender software.

Esta inhibición impide la liberación de interleucinas proinflamatorias (IL-1, IL-6) así como reactantes de fase aguda y activación y migración de leucocitos. El costo elevado de estos fármacos dificulta su acceso por medio del sistema de salud. Es importante resaltar que la no mejora del tratamiento, lo que produce que la calidad de vida de la persona disminuya. Los niveles de depresión son más altos en los pacientes con actividad que en los pacientes en remisión. Esto se ha demostrado en la literatura (Sánchez et al., 2022). Bajo esta premisa se comprueba la relación entre los síntomas depresivos, factores sociales y auto-percepción de enfermedad en un paciente. Cuando los tratamientos convencionales no funcionan adecuadamente, las personas con AR utilizan frecuentemente las plantas medicinales para el tratamiento. No obstante, es necesaria una investigación exhaustiva que evalúe objetivamente sus efectos sobre la inflamación, la progresión y la seguridad clínica. La investigación en este campo es esencial para poder determinar si estas intervenciones podrían considerarse coadyuvantes válidos o, por el contrario, constituyen un riesgo para el tratamiento integral de la AR.

2.2.3 Plantas medicinales con efecto antiartrítico

En la etnofarmacobiología, el estudio de las plantas medicinales tiene un apreciado interés, para obtener principios activos que alivien, prevengan o controlen, en base a lo heredado en usos y costumbres. El efecto benéfico que se le atribuyen a los metabolitos secundarios presentes en las plantas medicinales es debido a la inhibición de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6), la modulación del factor nuclear NF-KB, la reducción del estrés oxidativo y la prevención de la degradación del cartilago (Nalla et al., 2022). Las plantas *Tinospora cordifolia*, *Commiphora wightii*, *Curcuma longa* (cúrcuma) y especies de morera han mostrado una gran actividad antiinflamatoria en

experimentos y estudios preclínicos (Emad y colaboradores 2018). Revisiones recientes han identificado compuestos bioactivos relevantes, como los flavonoides, terpenos, alcaloides y lignanos, capaces de modular procesos clave en la fisiopatología de la AR. Se ha demostrado la importancia de la quercetina, catequina y kaempferol en la inhibición de las vías inflamatorias implicadas en la progresión de la enfermedad (Aloke et al., 2022; Gandhi et al., 2022). Estudios realizados por García (2018) sobre plantas de la meseta purépecha en Michoacán, México, han documentado el uso tradicional de *A. citriodora* (cedrón) como recurso terapéutico para el tratamiento de procesos inflamatorios. Este hallazgo respalda su valor etnofarmacológico en el manejo de enfermedades reumáticas. Adicionalmente, extractos de *A. citriodora* han mostrado actividad antiangiogénica, un mecanismo de particular interés en la fisiopatología de la AR, dado que la angiogénesis sinovial contribuye a la formación del pannus y a la progresión del daño articular (Balan, 2006; García et al., 2018).

2.2.4 Cedrón (*Aloysia citriodora* Paláu)

El cedrón (*Aloysia citriodora* Paláu) es una planta de la familia *Verbenaceae*, que fue caracterizada por Antonio Paláu y Verdéra. Su origen se considera que fue en Sudamérica, especialmente en regiones de Chile, Argentina y Perú, y posteriormente distribuida por centro América, así como a Europa (Pereira et al., 2018). En la Tabla 2 se muestran las categorías taxonómicas de *A. citriodora* Paláu. Esta planta puede llegar a crecer de 3 a 6 m, sus hojas pueden medir (30) 45–110 × (7) 9–25 mm, usualmente 3-verticiladas, lanceoladas. En ellas presenta tricomas rígidos, de 0.1–0.2 mm, el cual contiene los aceites esenciales que le dan su característico olor a limón puede tener flores de color morado o blancas (Gattuso et al., 2008). Es ampliamente cultivada de manera ornamental y por sus propiedades benéficas a la salud, de acuerdo con Arajyan et al. (2025) reportaron propiedades benéficas, como analgésico, antiinflamatoria, calmante nervioso, atribuido a sus metabolitos secundarios. El cedrón es abundante en terpenos y polifenoles, se estima que el contenido de ellos en un 0.5 - 1% de aceite esencial y para polifenoles se estima entre 87 y 343 mg GAE/g, dependiendo del método de extracción, temperatura y solvente (Alvarez-Cortes et al.,

2025). En estos compuestos radican su aroma y efectos benéficos. Los terpenos presentes en esta planta incluyen principalmente citral, limoneno, cineol y cariofileno, responsables de su característico aroma cítrico, también se ha detectado piperitona, sabineno y espatulenol. Por otra parte, los polifenoles más abundantes corresponden a los fenilpropanoides y flavonoides, dentro de los cuales destacan los feniletanoides como el verbascósido y el martinósido, considerados marcadores químicos de la planta y responsables de gran parte de sus efectos biológicos (Quirantes-Piné *et al.*, 2010). Se estima que los compuestos fenólicos pueden representar entre 10 y 15% del peso seco del extracto etanólico de sus hojas, lo que explica su alta actividad antioxidante y antiinflamatoria (González-Burgos *et al.*, 2021).

Estudios realizados por Ponce *et al.* (2010), en extractos de *A. citriodora* usando como solvente hexano y evaporándolo, reportó una tendencia a la disminución de la inflamación del edema en un modelo de carragenina, donde se observó que a una dosis de 800 mg/kg del extracto disminuyó el volumen al compararlo con el vehículo, teniendo una diferencia significativa.

Tabla 2. Categorías taxonómicas del cedrón.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Equisetopsida C. Agardh
Subclase	Magnoliidae Novák ex Takht.
Superorder	Asteranae Takht.
Orden	Lamiales Bromhead
Familia	Verbenaceae J. St.-Hil.
Género	<i>Aloysia</i> Palaú
Especie	<i>Aloysia citrodora</i> Palaú

Trópicos, Missouri Botanical Garden. <https://www.tropicos.org/home> (visitado última vez: 3 de septiembre 2025).

2.2.5 Métodos de extracción de fenoles

La extracción de metabolitos secundarios en plantas generalmente se realiza con solventes como agua o etanol. Existen dos tipos principales de extracción: sólido-líquido y líquido-líquido, siendo la extracción sólido-líquida la más utilizada, en usos y costumbres, la cual se conoce como infusión (Jones y Kinghorn, 2012). Basado en este principio existen múltiples métodos de extracción de manera controlada en laboratorios como lo son maceración, rotaevaporación, Soxhlet, en los cuales se puede controlar el tiempo, la temperatura y solvente. Partiendo de estos procedimientos, se crearon métodos más eficientes como lo son la extracción por ultrasonido, microondas, y fluidos super críticos, los cuales ejercen una fuerza como lo son las microondas, y las cavitaciones que se generan el uso ultrasonido; estas fuerzas rompen la membrana de las células vegetales lo cual propicia una mayor extracción (Jones y Kinghorn, 2012). Topete *et al.* (2023), compararon la extracción de compuestos de la flor de *Cannabis* utilizando ultrasonido, microondas y la combinación de ambos, reportando una mayor extracción usando solo el método de ultrasonido. En el estudio compararon su capacidad antioxidante en la inhibición del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH^{*}), reportando una inhibición del 50% del radical para el extracto por ultrasonido, siendo de 1.02 mg/ml y para microondas 1.18 mg/ml. Vázquez *et al.* (2014), extrajeron antraquinonas de *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae), notificando que las condiciones óptimas para obtener el máximo rendimiento con ultrasonido fueron utilizando benceno a 50 °C por 60 min (Vázquez *et al.*, 2023). En un estudio de comparación de extracción de alcaloides del tabaco, se menciona que por ultrasonido y el método de extracción propuesto por ellos (Jones *et al.*, 2023), resultaron ser los más convenientes en cuanto a practicidad y precisión.

En la presente investigación se empleó la extracción asistida por ultrasonido (EAU), técnica basada en la cavitación que genera burbujas por variaciones de presión y temperatura, facilitando la liberación de compuestos como los polifenoles presentes en *A. citriodora*. Este método reduce el tiempo de extracción, aumenta la eficiencia, requiere menos solvente y energía, es seguro, económico y reproducible bajo condiciones ambientales. Estudios reportados por Athanasiadis en el año 2024, en el que optimizaron la extracción de compuestos de *A. citriodora* por EAU, menciona

que al utilizar una mezcla de 50 % v/v de etanol y temperatura de 80 °C por 60 min, mejoró la efectividad de la extracción de compuestos bioactivos (Athanasiadis *et al.*, 2024). Los solventes que se utilizan dependen de las moléculas de interés, ciertas moléculas pueden tener afinidad a solventes polares, y/o apolares, entre los más comunes se encuentran agua, alcoholes y cetonas. En la Tabla 3 se observan estudios diversos, donde se reportan metabolitos secundarios de *A. citriodora* y los solventes usados para su extracción, y las moléculas encontradas (Bahramsoltani *et al.*, 2018).

Otro aspecto importante para la extracción es la reducción de la materia sólida, ya que al disminuir el tamaño de partícula se aumenta el área superficial de contacto con el solvente y es más eficiente para una óptima extracción (Sagili *et al.*, 2023). Las moléculas que se han identificado en *A. citriodora* son muy populares por su función antioxidante. A corto plazo, estas moléculas actúan como eliminadores directos de ERO, interrumpiendo las reacciones iniciales responsables del daño oxidativo en células y tejidos. A largo plazo, su acción tiene lugar a nivel del genoma, donde modulan la expresión de genes de enzimas prooxidantes que disminuyen la producción endógena de ERO. En esta investigación se empleó agua como solvente. La elección resulta adecuada ya que las moléculas de interés presentan una alta solubilidad en este medio, lo que facilita su extracción sin necesidad de utilizar solventes orgánicos tóxicos, siendo una extracción verde.

Tabla 3. Metabolitos secundarios de *A. citriodora*. (Tomado y modificada de Bahramsoltani *et al.*, 2018).

Clasificación	Molécula	Solvente	Referencia
Flavonoides	6-hidroxiluteolina	Metanol	Skaltsa y Shammas, 1988
	Apigenina		
	Cirsiliol		
	Eupatorina		
	Luteolina		
Glucósido iridoide	Hastatósido	Agua	Benelli <i>et al.</i> , 2017
	Tevesida	Metanol	Quirantes-Pine <i>et al.</i> , 2009
Glucósido fenólico	Verbenalina	Agua	Benelli <i>et al.</i> , 2017
	Forsitósido A	Agua	Quirantes-Pine <i>et al.</i> , 2009

Feniletanoide	Isoverbascósido	Etanol	Zhang <i>et al.</i> , 2015
Glicósido	Verbascósido	Metanol	Quirantes-Pine <i>et al.</i> , 2009
Feniletanoide	Eukovósido		Quirantes-Pine <i>et al.</i> , 2009, Zhang <i>et al.</i> , 2015.
	Martinósido		

2.2.6 Secado y encapsulación de compuestos fenólicos

El secado es una operación para eliminar agua de un sólido mediante transferencia de calor y masa, empleando como agente de secado el aire u otros fluidos. Se aplica en alimentos y fármacos, mejorando su conservación y valor comercial. Entre sus métodos destacan microondas, aspersión, liofilización, vacío y criogenización. En este estudio se usó nanosecado por aspersión (Nano Spray Drying B-90), que atomiza la muestra en microgotas, las seca con aire caliente en flujo laminar y colecta las partículas sólidas con alta eficiencia en rendimiento hasta de 90 %, obteniéndose partículas del orden de los micrómetros a los nanómetros y bajo consumo de muestra (Tranquilino *et al.*, 2020; Timilsena *et al.*, 2020). La encapsulación es una tecnología que recubre materiales sólidos, líquidos o gaseosos en cápsulas capaces de liberar su contenido bajo condiciones específicas, actuando como aislante. Según el tamaño, puede ser microencapsulación (5–300 μm) o nanoencapsulación (< 100 nm), útiles para proteger y controlar la liberación de compuestos bioactivos. El material de pared o agente encapsulante protege frente a oxidación y luz, siendo carbohidratos, grasas, proteínas y polímeros los más empleados (Champagne y Fustier, 2007). Entre ellos, la maltodextrina, obtenida por hidrólisis parcial de almidón de maíz, es uno de los encapsulantes más utilizados por su versatilidad.

2.2.7 Materiales para encapsular fenoles

La selección adecuada de los materiales de pared es un factor determinante en la eficiencia de la microencapsulación de compuestos bioactivos, como son los polifenoles, ya que influye directamente en la estabilidad, liberación controlada y conservación de sus propiedades antioxidantes (Wandrey *et al.*, 2010). Entre los compuestos más usados en la industria alimentaria están los carbohidratos, proteínas y lípidos, así como sus derivados (Desai y Park, 2005; Gibbs *et al.*, 1999). Dentro de

los carbohidratos, la maltodextrina es ampliamente empleada debido a su bajo costo, alta solubilidad en agua, buen comportamiento como agente formador de película y su capacidad para proteger contra la oxidación (Wang *et al.*, 2014). Estas propiedades la convierten en un material adecuado para encapsular polifenoles, al actuar como matriz protectora frente a la degradación oxidativa y térmica durante procesos de secado como el spray drying (Madene *et al.*, 2006). Al concluir el proceso de secado por aspersión, las microcápsulas formadas con maltodextrina suelen presentar una morfología esférica, con superficie continua y lisa, lo que favorece la conservación de los compuestos fenólicos encapsulados y mejora la dispersión del polvo final en medios acuosos. Las gomas como la goma arábica son excelentes emulsificantes y formadores de películas fuertes con baja viscosidad en soluciones acuosas (Chranioti y Tzia, 2014). Estas propiedades permiten una emulsificación estable entre la fase oleosa y acuosa en la encapsulación de extractos fenólicos. Asimismo, su capacidad para crear matrices flexibles y permeables las convierte en una opción idónea para combinarse con maltodextrina o proteínas, aumentando la eficiencia de encapsulación y la estabilidad en el almacenamiento. Las microcápsulas obtenidas por secado presentan superficies lisas o ligeramente porosas, dependiendo de la proporción goma/maltodextrina usada, manteniendo la integridad del material fenólico. La carboximetilcelulosa (CMC), un material de pares que es comúnmente utilizado, tiene la solubilidad en agua baja y buena estabilidad estructural (Koupantsis *et al.*, 2014). La CMC solo no logra formar emulsiones y suele usarse junto con maltodextrina o gomas. Esto se hace para aumentar la viscosidad y formar recubrimientos resistentes. En su encapsulación, se ha comprobado que la CMC le otorga propiedades que generan una barrera física contra la humedad y el oxígeno que hace que, tras el secado, se pierda su actividad antioxidante (Gibbs *et al.*, 1999; Desai y Park, 2005).

3. JUSTIFICACIÓN

Los polifenoles han cobrado gran interés en la comunidad científica, como un potencial en el tratamiento de diversas enfermedades, en algunos casos en procesos relacionados con la inflamación como la artritis reumatoide.

No obstante, actualmente existen pocas investigaciones orientadas a evaluar de manera específica los compuestos fenólicos presentes en las hojas de *Aloysia citrodora* Paláu y su posible efecto antiinflamatorio y antiartrítico, así como el impacto del procesamiento ultrasónico y la encapsulación sobre la preservación de su actividad biológica, lo que señala la necesidad de realizar más estudios. Es por ello, que se consideró en este estudio extraer polifenoles de las hojas de *A. citrodora* Paláu evaluando el efecto de la extracción por procesamiento ultrasónico y posteriormente encapsularlos para preservar su capacidad benéfica. La determinación del contenido fenólico, actividad antioxidante, y posible efecto antiinflamatorio y antiartrítico de las hojas *A. citrodora* Palau permitirán obtener información útil para ser aplicada en la prevención de la artritis.

4. HIPÓTESIS

La extracción de compuestos fenólicos a partir de hojas de *A. citrodiora*, por procesamiento ultrasónico y posterior nanoencapsulación, tendrán un efecto antiinflamatorio y antiartrítico, evaluado en un modelo de roedor de artritis reumatoide.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Optimizar los procesos de extracción asistida por ultrasonido y encapsulación de compuestos fenólicos a partir de hojas de *Aloysia citriodora*, y evaluar su efecto antiinflamatorio y antiartrítico en un modelo murino en ratas con artritis reumatoide.

5.1.1. OBJETIVO PARTICULARES

CAPITULO 1

- I) Analizar el efecto de las variables de la extracción de compuestos fenólicos extraídos por procesamiento ultrasónico sobre el rendimiento y actividad antioxidante de las hojas de cedrón *Aloysia citriodora* Palaú.
- II) Realizar una caracterización química exhaustiva del extracto fenólico de *Aloysia citriodora* por cromatografía de líquidos acoplada a masas.

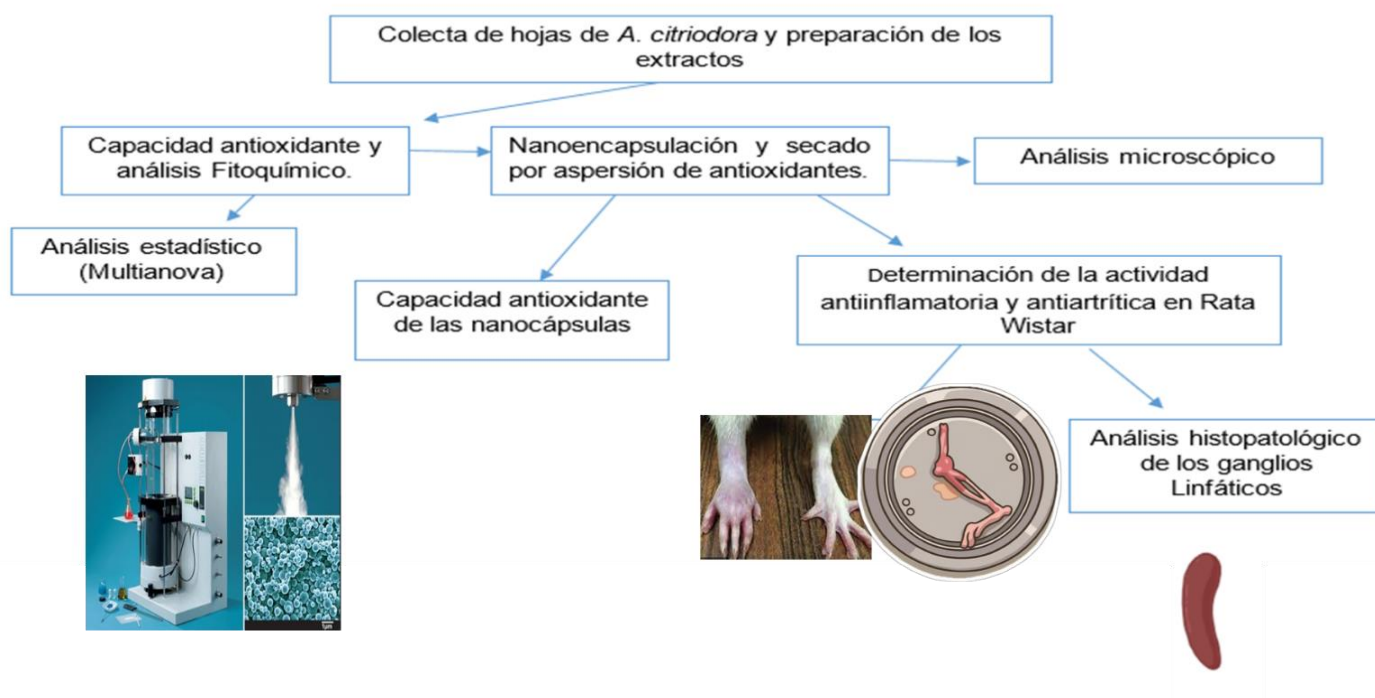
CAPITULO 2

- I) Nanoencapsular el extracto fenólico con mayor actividad antioxidante de las hojas de cedrón basado en un diseño de superficie de respuesta Box-Behnken, que considere la eficiencia de encapsulación, rendimiento, contenido de flavonoides y la capacidad de captura del radical hidroxilo.
- II) Caracterizar morfológica- y químicamente las nanocápsulas conteniendo el extracto fenólico por microscopía electrónica de barrido y espectrofotometría infrarroja.

CAPITULO 3

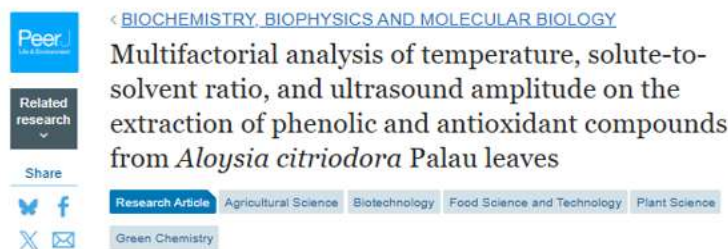
- I) Evaluar el impacto del extracto fenólico encapsulado en administración oral sobre el edema subplantar en ratas.
- II) Evaluar la actividad antiartrítica del extracto de *Aloysia citriodora* en ratas Wistar.

6. Estrategia experimental



El siguiente capítulo se publicó como artículo científico en la revista PeerJ, la cual cuenta con un factor de impacto de 2.7 según JCR y está clasificada en el cuartil Q1. Teniendo la siguiente referencia.

Cortes, O.A., Flores, H.E.M., García-Pérez, M.E., González-Hernández, J.C., Viveros-Sandoval, M.E., Martínez-Vázquez, M., Bartolomé-Camacho, M.C. (2025). Multifactorial analysis of temperature, solute-to-solvent ratio, and ultrasound amplitude on the extraction of phenolic and antioxidant compounds from *Aloysia citriodora* Palau leaves. PeerJ, 13, e19821.



Oswaldo Alvarez Cortes^{*1}, Héctor Eduardo Martínez Flores^{*1}, Martha-Estrella García-Pérez¹, Juan Carlos González-Hernández², Martha Eva Viveros-Sandoval³, Mariano Martínez-Vázquez⁴, Noemí Silva Jiménez⁵, María Carmen Bartolomé-Camacho¹

7. Capítulo 1: Análisis multifactorial de la temperatura, la relación soluto-disolvente y la amplitud del ultrasonido en la extracción de compuestos fenólicos y antioxidantes de hojas de *Aloysia citriodora* Paláu

7.1 Resumen

Se aplicó extracción asistida por ultrasonidos a hojas de *A. citriodora* Paláu. Para ello, se evaluaron parámetros de extracción como fueron temperatura, amplitud y relación soluto-solvente. Se implementó un diseño factorial de 3^3 , generando 27 tratamientos, a partir de los cuales se evaluó el contenido fenólico total, el contenido total de flavonoides y la capacidad antioxidante frente a los radicales 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS^{•+}), 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•]) e hidroxilo (OH[•]). El extracto con mayor capacidad de captación de radicales libres se obtuvo a 75 °C, una relación soluto-solvente de 1:15 y una amplitud de onda del 25 %. Este extracto contenía 87.74 mg de equivalente de ácido gálico (GAE)/g de extracto y 76.82 ± 6.21 mg de equivalente de quercetina (QE)/g de extracto. La capacidad antioxidante se expresó como la mitad de la concentración inhibitoria (CI₅₀, µg/mL), con valores de 9.08 ± 0.08 µg/mL para ABTS^{•+}, 35.58 ± 0.50 µg/mL para DPPH[•] y 0.72 ± 0.007 mg/mL para OH[•]. El extracto de hoja de *A. citriodora* demostró un gran potencial para su uso en el desarrollo de nuevos productos con moléculas bioactivas capaces de prevenir enfermedades degenerativas.

Palabras clave

Ultrasonido; Capacidad antioxidante; Fenólicos totales; Cedrón; ABTS.

7.2 Abstract

Ultrasonic-assisted extraction was applied to *A. citriodora* Palau leaves. To achieve this, a set of extraction parameters—temperature, amplitude, and solute-to-solvent ratio—was evaluated. A 3³ factorial design was implemented, generating 27 treatments, from which total phenolic content, total flavonoid content, and antioxidant capacity against 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{•+}), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]), and hydroxyl (OH[•]) radicals were assessed. The extract showing the highest free radical scavenging capacity was obtained at 75 °C, a solute-to-solvent ratio of 1:15, and a wave amplitude of 25 %. This extract contained 87.74 mg gallic acid equivalent (GAE)/g extract and 76.82 ± 6.21 mg quercetin equivalent (QE)/g extract. Antioxidant capacity was expressed as the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀, µg/mL), with values of 9.08 ± 0.08 µg/mL for ABTS^{•+}, 35.58 ± 0.50 µg/mL for DPPH[•], and 0.72 ± 0.007 mg/mL for OH[•]. The *A. citriodora* leaf extract demonstrated strong potential for use in the development of new products containing bioactive molecules capable of preventing degenerative diseases.

Keywords

Ultrasound; Antioxidant capacity; Total phenolic; Cedron; ABTS.

7.3 Introducción

Es importante el desarrollo de nuevos fármacos multidireccionales con actividad antiinflamatoria, con eficacia para aumentar las opciones para el tratamiento de pacientes que sufren enfermedades relacionadas con la inflamación, como la artritis reumatoide. Es por ello, que los medicamentos herbales de múltiples componentes capaces de interactuar con varios objetivos involucrados en esta condición son una opción prometedora (Azimi *et al.*, 2012; Dewan *et al.*, 2016; Sharma y Kanwar, 2018). El ultrasonido es una tecnología desarrollada que es factible de ser usada para optimizar procesos de extracción, como pueden ser la obtención de metabolitos secundarios de plantas. Esta tecnología presenta un aumento del rendimiento, menor tiempo de extracción y costo operativo bajo, comparados con los métodos tradicionales como la maceración y Soxhlet (Torres *et al.*, 2017; Paucar y Matute, 2018; Dzah *et al.*, 2020). La extracción sólido-líquido es el proceso más usado, y consiste en la separación de una o varias sustancias (solutos) contenidas en una matriz sólida (fase portadora), con el uso de solventes (Ullauri, 2010). Factores como el tamaño de partícula, tipo de solvente, temperatura y agitación del fluido, afectan a la velocidad de extracción y a las moléculas de interés. Las hojas de *A. citriodora* Paláu conocido por su nombre común como cedrón, son abundantes en compuestos fenólicos cuyo componente principal es el verbascósido, al cual se le atribuye actividad antiinflamatoria y además contiene luteolin-7-odiglucorónico, ácido p-cumárico, feniletanoide, eucovósido y martinósido (Pereira *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2020). Tradicionalmente, las plantas con altas concentraciones de verbascósido se han usado en la medicina popular para tratar la inflamación e infecciones microbianas (Georgiev *et al.*, 2012; García *et al.*, 2018). Los glucósidos feniletanoides son compuestos solubles en agua de origen natural que están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. En los últimos años, ha aumentado el interés por los compuestos aromáticos y, en particular, por los glucósidos feniletanoides, debido a lo reportado en la prevención y tratamiento de varias enfermedades (Alipieva *et al.*, 2014). El estudio de los efectos antibacterianos, antiinflamatorios y antiandrógenos del verbascósido puro y de los extractos de plantas con altas concentraciones de verbascósido es prometedora para el desarrollo de tratamientos farmacológicos (Azimi *et al.*, 2012).

Los primeros informes que describen los efectos antiinflamatorios del verbascósido se han centrado en la inhibición de la liberación de histamina y ácido araquidónico de los mastocitos (Lee *et al.*, 2006). Se ha demostrado que el verbascósido a 40 μ M inhibe fuertemente la producción de óxido nítrico (NO), TNF- α e IL-12 (Rao *et al.*, 2009). Este mecanismo anti-iNOS está estrechamente relacionado con la regulación a la baja de dos factores de transcripción como lo son la proteína activadora 1 y factor nuclear kappa B (AP-1 y NF κ B) por parte del verbascósido (Lee *et al.*, 2005). AP-1 es un regulador transcripcional de la expresión de citocinas en los huesos, la piel y las células inmunitarias y un modulador importante de los procesos inflamatorios crónicos, como la artritis reumatoide y psoriásica, la psoriasis y la enfermedad de Crohn (Zenz *et al.*, 2008). AP-1 se ha convertido en uno de los nuevos objetivos para aplicaciones terapéuticas (Alipieva *et al.*, 2014).

La supresión de estos dos factores de transcripción por los feniletanoides resultó en una inhibición más eficaz que la quimiocina proinflamatoria IL-8 en comparación con otros polifenoles como el resveratrol y la quercetina (Pastore *et al.*, 2009; Potapovich *et al.*, 2011; Georgiev *et al.*, 2012; Alipieva *et al.*, 2014).

7.4 Materiales y métodos

7.4.1 Recolección de las hojas de *A. citriodora*

Las hojas se recolectaron en plantas cultivadas en la localidad que se encuentra en las siguientes coordenadas: latitud 19.6912985, longitud -101.2054516 y elevación 1909 m, en Morelia, Michoacán, México. Se caracterizó taxonómicamente el ejemplar con base de datos del Herbario de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Las hojas se secaron bajo la sombra a temperatura ambiente. Se redujeron de tamaño y se tamizaron con una malla de 0.3331 pulgadas de apertura.

7.4.2 Obtención de los extractos fenólicos

Los extractos se obtuvieron utilizando el Ultrasonicator VCX 500, seleccionando los siguientes parámetros de extracción mostrados en la Tabla 4 (basados en Torres, 2017).

Tabla 4. Parámetros para la extracción asistida por ultrasonido.

Parámetros	Variables
Tiempo de extracción (min)	10
Temperatura (°C)	30, 50, 75
Relación (soluto/solvente)	1:5, 1:10, 1:15
Porcentaje de amplitud de onda	20, 25, 35

7.4.3 Determinación de compuestos fenólicos y pruebas antioxidantes

7.4.3.1 Método de fenoles totales Folin-Ciocalteu

El ensayo de Folin-Ciocalteu (FC), se basa en la reacción de los fenoles con el reactivo FC, a un pH básico dando lugar a una coloración azul, que es determinada espectrofotométricamente a 750 nm y se expresa en equivalentes de ácido gálico. El reactivo FC es una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico, obteniendo así el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, el cual al reaccionar con los fenoles presentes en la muestra es reducido, dando lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que se puede medir para evaluar el contenido de fenoles (Taga *et al.*, 1984; Valencia *et al.*, 2018; Alvarez, 2020).

Preparación del NaCO₃ 2%: 1 g de NaCO₃ se disolvió 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. Para la curva de calibración se usó una solución madre de ácido gálico (0.2 mg/ml).

7.4.3.2 Método de flavonoides totales

El ensayo espectrofotométrico basado en la formación de complejos de aluminio es uno de los procedimientos más usados para la determinación de flavonoides totales. Este método, propuesto inicialmente por Christ y Müller (1960) para el análisis de materiales herbales, fue posteriormente modificado varias veces (Dewanto *et al.*, 2002). Se pueden distinguir dos procedimientos aplicados. En el primero, el AlCl₃ se agrega una solución en el rango de concentración de 2 a 10% (m/v) a una muestra y se puede aplicar en presencia de una solución de ácido o acetato; en algunos casos,

solo se agrega metanol o agua. Para la medición en espectrofotometría se usa el rango de longitud de onda entre los 404-430 nm, para la cuantificación se emplean diferentes flavonoides (quercetina, rutina, galangina) los cuales se expresan en mg Equivalentes.

Preparación del AlCl_3 al 2 % (m/v): 0.2 g de AlCl_3 se disolvieron en 10 mL metanol al 50 %, la disolución se sónico por 5 min. Para la curva de calibración se usó una solución madre de quercetina a 0.02 mg/mL (Alvarez, 2020).

7.4.4 Determinación de la actividad antioxidante

7.4.4.1 Método dpph-2,2-difenil-1-picril hidrazilo

El método mide la eliminación de radicales libres de los compuestos antioxidantes con $\text{DPPH}^{\bullet}$, siendo determinada espectrofotométricamente a 515nm. El $\text{DPPH}^{\bullet}$ puede obtenerse directamente, en comparación con el método $\text{ABTS}^{+\bullet}$, que se genera tras una reacción química, enzimática o electroquímica (Brand *et al.*, 1995; Valencia *et al.*, 2018; Camarena *et al.*, 2018).

El reactivo $\text{DPPH}^{\bullet}$ se preparó a una concentración de 6×10^{-5} M usando como diluyente metanol. Una vez preparado el radical, la absorbencia se midió y se ajustó a 0.90 (Alvarez, 2020). Para obtener el porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente formula:

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

$A_0 = \text{Absorbencia del DPPH}$

$A_1 = \text{Absorbencia del Extracto} + \text{DPPH}$

7.4.4.2 Método ABTS (2-2'- azino bis (ácido 3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

Uno de los radicales orgánicos más comúnmente usados para evaluar la eficacia antioxidante de compuestos puros y mezclas complejas es el catión radical derivado del $\text{ABTS}^{+\bullet}$. El radical catiónico $\text{ABTS}^{+\bullet}$ verde-azulado es un cromóforo generado por una reacción de oxidación del $\text{ABTS}^{+\bullet}$ con persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) (Okoh *et al.*, 2015). La máxima absorción de $\text{ABTS}^{+\bullet}$ se produce en metanol a 734 nm, se

fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS^{•+}, al interaccionar con especies donantes de hidrógeno o de electrones. Este ensayo de decoloración mide la capacidad antioxidante total, tanto en sustancias lipofílicas como en sustancias hidrófilas (Camarena *et al.*, 2018; Pérez *et al.*, 2021).

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 absorbencia del radical se midió y se ajustó a 0.90 (Alvarez, 2020). Como estándar se utilizó ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox)

Se determinó la Actividad Equivalente de Trolox (TEAC) con la fórmula:

$$TEAC = \left(\frac{IC\ 50\ Trolox}{IC\ 50\ Muestra} \right) * 100$$

7.4.4.3 Método de radical hidroxilo

La actividad antioxidante de los extractos frente al radical hidroxilo se determinó según lo descrito por Smirnoff y Cumbes (1989). Se añadió 1 mL de la solución del extracto a sulfóxido de dimetilo a diferentes concentraciones (que van de 100 a 2000 µg/mL), 300 µL de FeSO₄ (8 mM) y 250 µL de H₂O₂ (20 mM). La reacción se inició por la adición de 1 mL de solución de ácido salicílico (3 mM), y luego se incubó por 30 min a 30 °C. Posteriormente, se agregaron 450 µL de agua destilada y la mezcla midió la absorbencia a una longitud de onda de 510 nm (Valencia *et al.*, 2018).

7.4.5 Análisis estadístico

Los datos se analizarán utilizando el software John's Macintosh Project (JMP; versión 6.0) mediante un análisis de varianza de una vía y para determinar las diferencias estadísticas de los parámetros, se realizará la prueba de comparación múltiple de Tukey. Los valores de *p≤0.05 se considerarán indicativos de significancia estadística.

7.5 Resultados

7.5.1 Identificación de la planta

A. citriodora es un arbusto 2-6 m, caducifolio, escábrido, con aroma agradable a limón. Hojas con lámina de (30)45-110 × (7)9-25 mm, 3-verticiladas tricomas antrorsos rígidos, tricomas de 0.1-0.2 mm (Figura 3).



Figura 3. Hojas de cedrón (*A. citriodora*).

Para la determinación taxonómica, los caracteres florales son importantes debido a que los caracteres reproductivos están más conservados, son constantes, el cáliz tuvo una medida de 2-3.5 mm, la corola 3.5-5.5 mm, color blanco o liliáceo (Figura 4)



Figura 4. Flor de cedrón (*A. citriodora*).

Fruto oblongo, con mericarpos de 1.3-1.8 × 0.5-0.6 mm, plano-convexos, pelosos en el ápice, color castaño (Figura 5).

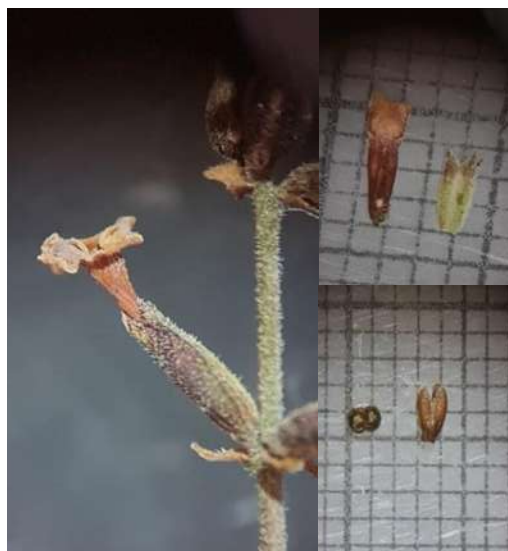


Figura 5. Fruto de cedrón (*A. citriodora*).

Finalmente, se realizó un cotejo con ejemplares de la misma especie depositadas en el herbario EBUM número de folio 27450, 23355 y con imágenes de herbarios digitales como SEINET. El nombre específico para el ejemplar fue *Aloysia citrodora* Palaú. Tiene las siguientes sinonimias: *Aloysia triphylla* Britton, *Lippia triphylla* Royle, *Verbena triphylla* L Her y *Lippia citriodora* kunth.

Según lo informado por Alipieva *et al.* (2014) hasta la fecha, el verbascósido se ha detectado principalmente en el *Verbascum*, aunque también se ha encontrado en más de 200 especies de plantas pertenecientes a 23 familias de plantas entre las que se encuentran entre el orden las Lamiales (Schlauer *et al.*, 2004; Alipieva *et al.*, 2014). Entre las que destaca la familia Verbenaceae, la cual es perteneciente la planta *A. citriodora* Palaú.

7.5.2 Humedad y actividad de agua de las hojas de *A. citriodora*

Las hojas de *A. citriodora* fueron recolectadas en el mes de mayo del año 2022, secadas bajo la sombra a temperatura ambiente. Con un higrómetro marca “Traceable” se midió la humedad del ambiente, la cual osciló entre 57 y 74 %. El tiempo de secado

fue una semana, y posteriormente se molieron las hojas y se tamizaron utilizando una malla de abertura de 0.3331 pulgadas. Se determinó la actividad de agua (A_w) de las hojas secas, la cual fue de 0.42, utilizando el medidor de la actividad de agua marca “Novasina”. Se tomó una muestra de las hojas molidas y se determinó su humedad, en estufa por 3 h a 100 °C, y se obtuvo una humedad de 43.35%.

7.5.3 Obtención de los extractos

Los extractos se obtuvieron utilizando el Ultrasonificador VCX 500, seleccionando los siguientes parámetros de extracción mostrados en la Tabla 5. Se aplicó un diseño factorial de 3^3 , teniendo tres factores y tres niveles, con lo cual se obtuvieron 27 extractos. El tiempo de extracción fue de 10 min (Dzah *et al.*, 2020). Se seleccionó la nomenclatura de cada extracto de acuerdo con la Tabla 5.

Tabla 5. Parámetros para la extracción por ultrasonido.

Niveles	Minutos		
	1	2	3
Temperatura (°C)	30	50	75
Concentración (g/mL)	1/5	1/10	1/15
Amplitud (%)	20	25	35

Donde “T” es la variable temperatura, y tres niveles, los cuales fueron numerados del 1-3, y correspondieron a 1 = 30 °C, 2 = 50 °C y 3 = 75 °C. La variable concentración de hojas y agua está indicada por la letra “R”, y tiene tres niveles los cuales son numerados del 1-3, correspondiente a 1 = 1/5, 2 = 1/10 y 3 = 1/15 (g/ml). La variable amplitud está indicada por la letra “A”, y tiene tres niveles, los cuales son numerados del 1-3, correspondiente a 1 = 20 %, 2 = 25 % y 3 = 35 %. Por ejemplo, T1R1A1, corresponde a temperatura de 30 °C, concentración 1/5 y amplitud del 20 %. La extracción se hizo por orden aleatorizado.

7.5.4 Fenoles totales

Se hizo la medición de fenoles totales con el método de Taga *et al.* (1984). Para la curva de calibración se usó ácido gálico, obteniéndose una $R^2 = 0.9962$. Las absorbancias de los extractos se sustituyeron en la ecuación lineal. Los resultados se muestran en la Tabla 6, en unidades de mg GAE/g de extracto. La muestra con mayor cantidad de mg GAE/g fue “T3R2A2” con 132.84 ± 3.12 , comparado con los extractos acuosos de *A. citriodora*, donde se reportaron 51.85 mg equivalentes de ácido tánico/g material seco (Wernert *et al.*, 2009); Köroğlu *et al.* (2015) obtuvo 483.56 mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto metanólico. Estudios de Al-Qaraleh y Tarawneh (2016) en extractos metanólicos de plantas de *A. triphylla* reportan 62.16 mg GAE/g de extracto de planta. Al comparar los métodos se observa que el método de ultrasonido aumenta el contenido comparado con la extracción metanólica y recuperación por rotaevaporador para la obtención de extractos fenólicos. Se obtuvo una mayor concentración de moléculas GAE que el extracto de corteza de pino (Oligopin®), donde para este fue una concentración de 10.90 ± 0.41 mg GAE/g y se parece a las muestras obtenidas con menor temperatura del presente estudio, siendo semejante a la muestra T1R3A3, en la cual se obtuvo 15.32 ± 1.50 mg GAE/g.

7.5.5 Flavonoides totales

Se hizo la medición de flavonoides por el método de Dewanto (2002). Para la curva de calibración se usó quercetina como estándar, obteniéndose una $R^2 = 0.9992$. Las absorbancias de los extractos se sustituyeron en la ecuación lineal lográndose los resultados mostrados en la Tabla 6, los cuales están en unidades mg equivalentes a quercetina (mg QE/g de Extracto). La muestra que obtuvo mayor cantidad de mg QE/g fue “T2R3A3” con 98.964 ± 31.13 , de la misma manera esta muestra fue la que obtuvo una mayor cantidad de compuestos fenólicos totales, muy superior comparado con estudios realizados en extractos acuosos de *A. citriodora* donde se encontraron 7.01 mg equivalentes de quercetina/g hojas secas (Moeina *et al.*, 2014). Skaltsa y Shammass (1988) aislaron flavonoides del extracto de hoja de *A. citrodora* utilizando cromatografía en columna con gel de sílice. Todos los compuestos purificados tenían estructuras de flavona. En 2009, Quirantes *et al.* detectó el glucósido de las flavonas

previamente aisladas como apigenina-7-diglucurónido y crisoeriol 7-diglucurónido del extracto acuoso de partes aéreas de *A. citrodora* (Bahramsoltani *et al.*, 2018). Estudios recientes también identificaron algunos flavonoides nuevos con estructura de flavona (jaceosidina, nepetina y nepitrina) (Zhang *et al.*, 2015).

Tabla 6. Fenoles y flavonoides totales de extractos de *A. citrodora* obtenidos por extracción ultrasónica.

Muestra	Fenoles totales (mg GAE/g)	Flavonoides totales (mg QE/g)
T3R2A2	132.84 ± 3.12^A	86.63 ± 1.59 ^{BCD}
T3R3A1	92.70 ± 8.81 ^B	94.58 ± 8.33 ^{AB}
T3R3A2	87.74 ± 17.58 ^B	76.82 ± 6.21 ^E
T2R3A3	80.43 ± 13.91^{BC}	98.96 ± 3.11^A
T3R1A3	68.92 ± 4.04 ^{CD}	58.49 ± .712 ^F
T2R3A1	68.07 ± 3.41 ^{CD}	92.95 ± 2.03 ^{ABC}
T2R2A1	67.41 ± 4.67 ^{CD}	83.70 ± 3.50 ^{CDE}
T3R3A3	67.30 ± 7.20 ^{CD}	94.38 ± 2.85 ^{AB}
T2R2A2	66.42 ± 4.07 ^{CD}	9.18 ± 6.06 ^{JK}
T2R1A3	60.66 ± 1.43 ^{DE}	91.23 ± 4.32 ^{ABCD}
T2R1A2	58.64 ± 2.82 ^{DEF}	83.50 ± 1.32 ^{DE}
T2R1A1	56.51 ± 1.79 ^{DEFG}	60.10 ± 1.29 ^F
T1R2A3	55.93 ± 3.92 ^{DEFG}	63.84 ± 1.30 ^F
T1R2A2	53.07 ± 0.69 ^{DEFGH}	37.49 ± 2.26 ^{GH}
T3R2A3	49.08 ± 1.89 ^{EFGH}	62.50 ± 2.52 ^F
T2R3A2	44.77 ± 2.33 ^{EFGH}	75.75 ± 2.59 ^E
T1R1A3	44.73 ± 0.90 ^{EFGH}	13.53 ± 1.08 ^J
T1R1A1	43.51 ± 4.43 ^{FGH}	32.31 ± 1.58 ^{HI}
T3R2A1	41.39 ± 0.55 ^{GH}	26.03 ± 1.62 ^I
T3R1A1	40.64 ± 2.03 ^{GH}	25.23 ± .10 ^I
T2R2A3	40.39 ± 2.90 ^{GH}	44.04 ± 1.76 ^G
T3R1A2	40.29 ± 2.39 ^{GH}	24.35 ± 2.48 ^I
T1R1A2	38.10 ± 1.89 ^H	7.27 ± 1.38 ^{JK}
T1R2A1	20.99 ± 0.98 ^I	11.49 ± 0.80 ^{JK}
T1R3A2	20.71 ± 1.02 ^I	24.77 ± 0.23 ^I
T1R3A3	15.32 ± 1.50 ^{IJ}	11.20 ± 1.02 ^{JK}
Oligopin®	10.90 ± 0.41^{IJ}	25.98 ± 2.09^K
T1R3A1	3.35 ± 2.10 ^J	7.66 ± 0.84 ^{JK}

Letras diferentes (A, B, C, D, etc) en la misma columna son significativamente diferentes a $p < 0.05$ (ANOVA, seguido por la prueba de Tukey). n=3.

7.5.6 Radical DPPH•

Los resultados de la captura del radical DPPH• por los extractos fenólicos se muestran en la Tabla 7. Se utilizaron el ácido gálico y el ácido ascórbico como controles positivo, los cuales obtuvieron el mejor rendimiento entre inhibición y concentración utilizada, siendo los valores de 2.35 ± 0.09 y 8.25 ± 0.18 µg/ml, respectivamente, para inhibir el 50% del radical DPPH•; los extractos acuosos que obtuvieron una concentración menor para la inhibición del radical fueron “T3R3A2”, “T3R2A2 y T3R3A1” con valores de 35.58 ± 0.50 , 47.90 ± 0.39 y 42.64 ± 0.58 µg/ml, respectivamente, para inhibir el 50% del radical DPPH•. La temperatura y la relación/soluto solvente se relacionan con la extracción de moléculas que tienen capacidad para inhibir el radical DPPH•. Estudios realizados por Cheurfa y Allem (2015) en extracto hidroalcohólico de *A. citriodora* muestran contenidos de fenoles y flavonoides totales significativamente superiores a los del extracto acuoso, no obstante, se encontró un valor IC₅₀ más alto (27.40 ± 0.1 mg/ml) para el extracto acuoso en comparación con el extracto hidroalcohólico para la captación del radical libre DPPH•. Al-Qaraleh y Tarawneh (2016) obtuvo una concentración IC₅₀ de 0.8 mg/ ml en extractos de hojas de *A. triphylla* obteniendo una mayor concentración para eliminar el 50% de radical comparado con los extractos obtenidos por ultrasonido, y se correlaciona con la cantidad presente de polifenoles.

7.5.7 Radical ABTS•+

Se realizó una curva de inhibición del radical ABTS•+ usando como estándar al ácido gálico y Trolox, obteniéndose una inhibición del 50% del radical ABTS•+ a una concentración de 0.91 ± 0.02 y 0.12 ± 0.07 µg/ml, respectivamente, para inhibir el 50% del radical ABTS•+; en el extracto acuoso se obtuvo una concentración menor, para la inhibición del radical por el tratamiento “T3R3A2” fue de 9.08 ± 0.08 µg/ml para inhibir el 50% del radical, de la misma manera resalta la temperatura en la extracción de moléculas que tienen capacidad para inhibir el radical ABTS•+. Se obtuvo el valor TEAC mayor en el extracto “T3R3A3” con 393.282 mg. Hernández *et al.* (2015) estudio 20 plantas usadas en la medicina natural en México y obtuvo la mayor capacidad antioxidante en las plantas “gobernadora”, “hierba dulce” y “nogal” con una IC₅₀= 1.67,

2.68 y 2.70 µg/mL, respectivamente y un TEAC igual a 136.72, 85.02 y 84.52 (mg Trolox 100 g Hojas), respectivamente.

7.5.8 Radical hidroxilo

Se realizó una curva de inhibición del radical Hidroxilo utilizando como estándar al Oligopin® (Nutri-Dyn, Maple Plain, MN, EE. UU.), reconocido por su poder antioxidante, procedente de extractos naturales de corteza de pino, obteniéndose una concentración de 1.044 mg para inhibir el 50% del radical OH•. El Oligopin® tuvo el mejor resultado entre inhibición y concentración usada, mientras que para el extracto acuoso que obtuvo una concentración menor fue “T3R3A2” con 0.72 ± 0.007 mg/ml para inhibir el 50 % del radical. Estudios realizados por Valencia *et al.* (2018) en extractos de encino obtuvo una inhibición de radical hidroxilo con 1271 ± 72 µg/mL Oligopin®. En este estudio el valor obtenido de Oligopin® fue de 1.04 ± 0.04 mg/ml estando en valores similares a los extractos T2R3A1, T3R3A1 Y T2R2A2.

De acuerdo con los valores obtenidos de la actividad equivalente a Trolox, mostrados en la Tabla 8, se observa que existió una mayor actividad a temperatura de 75 °C y una relación de 1/15, siendo las menores las de temperatura de 30 °C y relaciones 1/5, la mayor capacidad antioxidante de los extractos la presentaron **T3R3A2 y T2R3A2.**

Tabla 7. Eliminación de radicales libres de extractos de *A. citriodora*.

Muestra	OH [•] IC ₅₀ (mg/ml)	DPPH [•] IC ₅₀ (μg/ml)	ABTS ^{•+} IC ₅₀ (μg/ml)
T1R3A1	12.23 ± 0.29 ^A	1790.58 ± 291.01 ^A	81.57 ± 4.41 ^A
T1R3A3	3.90 ± 0.03 ^B	231.91 ± 7.48 ^{CDE}	42.43 ± 1.63 ^{DE}
T3R1A1	3.46 ± 0.009 ^{BC}	182.24 ± 0.47 ^{CDEFG}	44.16 ± 0.60 ^{CD}
T3R1A2	3.22 ± 0.28 ^C	161.39 ± 5.41 ^{CDEFGH}	37.64 ± 0.40 ^{GH}
T3R1A3	3.19 ± 0.06 ^C	162.52 ± 3.16 ^{CDEFGH}	37.29 ± 0.15 ^H
T1R3A2	2.70 ± 0.02 ^D	459.04 ± 61.52 ^B	37.61 ± 0.77 ^{GH}
T3R2A1	2.66 ± 0.02 ^D	175.43 ± 1.51 ^{CDEFGH}	38.43 ± 0.64 ^{FGH}
T1R2A1	2.58 ± 0.003 ^{DE}	411.94 ± 9.69 ^B	63.04 ± 0.27 ^B
T2R1A1	2.38 ± 0.06 ^{DEF}	123.83 ± 2.41 ^{DEFGH}	40.56 ± 0.15 ^{EFG}
T2R2A3	2.31 ± 0.02 ^{DEFG}	293.22 ± 23.48 ^{BCD}	26.44 ± 0.61 ^J
T1R1A1	2.17 ± 0.08 ^{EFG}	310.16 ± 6.12 ^{BC}	41.01 ± 0.84 ^{DEF}
T2R1A3	2.04 ± 0.62 ^{FGH}	114.99 ± 3.26 ^{EFGH}	37.17 ± 1.49 ^H
T1R2A2	1.98 ± 0.027 ^{FGHI}	108.40 ± 1.13 ^{EFGH}	28.77 ± 0.67 ^{IJ}
T2R2A1	1.97 ± 0.06 ^{FGHI}	117.06 ± 5.11 ^{DEFGH}	11.47 ± 0.51 ^{MNO}
T2R1A2	1.89 ± 0.03 ^{GHI}	102.70 ± 3.42 ^{EFGH}	29.84 ± 0.40 ^I
T1R1A2	1.87 ± 0.02 ^{GHI}	226.40 ± 3.67 ^{CDE}	46.11 ± 0.22 ^C
T3R2A3	1.69 ± 0.01 ^{HIJ}	98.92 ± 3.62 ^{EFGH}	18.95 ± 0.18 ^K
T1R1A3	1.54 ± 0.08 ^{IJK}	198.39 ± 0.62 ^{CDEF}	31.81 ± 0.09 ^I
T3R3A3	1.29 ± 0.005 ^{JKL}	64.90 ± 0.88 ^{EFGH}	13.69 ± 0.05 ^{LM}
T2R3A2	1.23 ± 0.002 ^{JKL}	96.52 ± 4.11 ^{EFGH}	14.65 ± 0.02 ^L
T2R3A3	1.21 ± 0.01 ^{KLM}	97.54 ± 1.92 ^{EFGH}	15.06 ± 0.18 ^L
Oligopin ®	1.04 ± 0.04^{LMN}	-	-
T2R3A1	0.96 ± 0.008 ^{LMN}	105.65 ± 2.14 ^{EFGH}	13.15 ± 0.51 ^{LMN}
T1R2A3	0.90 ± 0.017 ^{LMN}	96.76 ± 11.00 ^{EFGH}	10.91 ± 0.16 ^{MNO}
T2R2A2	0.88 ± 0.017 ^{LMN}	124.35 ± 11.98 ^{DEFGH}	14.93 ± 0.18 ^L
T3R3A1	0.86 ± 0.009 ^{LMN}	42.64 ± 0.58 ^{FGH}	10.64 ± ^{MNO}
T3R2A2	0.75 ± 0.008 ^{MN}	47.90 ± 0.39 ^{FGH}	10.29 ± 0.01 ^{NO}
T3R3A2	0.72 ± 0.007^N	35.58 ± 0.50^{FGH}	9.08 ± 0.08^O
Ácido gálico	-	2.35 ± 0.09^H	0.91 ± 0.02^P
Ácido ascórbico	-	8.25 ± 0.18^{GH}	-
Trolox	-	-	0.12 ± 0.07^P

Letras diferentes (A, B, C, D, etc) en la misma columna son significativamente diferentes a $p < 0.05$ (ANOVA, seguido por la prueba de Tukey). n=3. IC₅₀: la mitad del máximo concentración efectiva.

Tabla 8. TEAC de extractos de *A. citriodora*.

Muestra	TEAC (mg Trolox /100 g hojas)
T3R3A3	393.28 ± 1.59 ^A
T2R3A2	356.15 ± 0.53 ^B
T3R3A1	347.10 ± 5.01 ^{BC}
T3R3A2	343.52 ± 3.09 ^{BC}
T1R3A2	340.05 ± 6.99 ^C
T2R3A1	332.21 ± 12.78 ^C
T2R3A3	315.66 ± 3.93 ^D
T1R3A3	296.34 ± 11.45 ^E
T3R2A2	270.31 ± 0.01 ^F
T3R2A3	269.43 ± 2.63 ^F
T1R3A1	222.68 ± 11.67 ^G
T3R2A1	205.29 ± 3.50 ^H
T2R2A3	198.44 ± 4.69 ^H
T1R2A2	198.44 ± 4.69 ^H
T1R2A3	180.76 ± 2.67 ^I
T3R1A3	174.05 ± 0.71 ^{IJ}
T3R1A2	172.61 ± 1.83 ^{IJ}
T1R2A1	161.97 ± 0.71 ^J
T3R1A1	160.46 ± 2.22 ^{JK}
T2R2A2	145.17 ± 1.79 ^{KL}
T2R1A2	141.55 ± 1.91 ^L
T1R1A1	138.16 ± 2.87 ^{LM}
T1R1A3	134.32 ± 0.40 ^{LMN}
T1R1A3	133.01 ± 5.80 ^{LMN}
T2R1A1	122.77 ± 0.45 ^{MN}
T2R1A3	120.78 ± 4.80 ^N
T1R1A2	92.06 ± 0.45 ^O

Letras diferentes (A, B, C, D, etc) en la misma columna son significativamente diferentes a $p < 0.05$ (ANOVA, seguido por la prueba de Tukey). n=3.

7.5.9 Análisis multifactorial

En el análisis ANOVA multifactorial se plantea si hay relación o no, entre la variable respuesta (Y) y ciertas variables categóricas, los cuales son los factores. Las variables respuesta fueron el contenido de polifenoles (mg GAE/g), flavonoides (mg QE/g), la IC₅₀ de los radicales DPPH•, ABTS•+ e hidroxilo. El software JMP V6.0 se usó para el análisis estadístico. A partir de los datos obtenidos en el 3³ diseño experimental, un ANOVA de tres vías.

7.5.10 Formulación de la Hipótesis

7.5.10.1 Hipótesis biológica

Ho: Las diferentes temperaturas, relación soluto/solvente, amplitud y las interacciones entre ellas, no ejercieron ningún efecto en la extracción de compuestos fenólicos de las hojas de *A. citriodora*.

HA: Al menos alguna temperatura, relación soluto/solvente, amplitud o interacción entre ellas ejerce un efecto en la extracción de los compuestos fenólicos.

7.5.10.2 Hipótesis estadística

Factor 1 (Temperatura)

Ho: $\alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 = 0$ H1: algún $\alpha \neq 0$

Factor 2 (Relación Soluta/ solvente)

Ho: $\beta_1 = \beta_2 = \beta_3 = 0$ H1: algún $\beta \neq 0$

Factor 3 (Amplitud)

Ho: $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = 0$ H1: algún $\gamma \neq 0$

Interacción

Ho: $(\alpha\beta\gamma)_{ijk} = 0$ H1: algún $(\alpha\beta\gamma)_{ijk} \neq 0$

Ho: $(\alpha\beta)_{ij} = 0$ H1: $(\alpha\beta)_{ij} \neq 0$

Ho: $(\alpha\gamma)_{ik} = 0$ H1: $(\alpha\gamma)_{ik} \neq 0$

Ho: $(\beta\gamma)_{jk} = 0$ H1: $(\beta\gamma)_{jk} \neq 0$

El análisis estadístico, mediante ANOVA para la determinación de fenoles, flavonoides, e IC₅₀ de los radicales hidroxilos, ABTS•+ y DPPH• obtuvo como resultado

$p < 0.0001$, resultado menor que $\alpha = 0.05$ nivel de significancia, mostrados en la Tabla 9. Por tanto, se rechazó la hipótesis nula y se aceptó la hipótesis alternativa que sugiere que existe una diferencia significativa ejercida por temperatura, relación planta/solvente y amplitud utilizados para la extracción de flavonoides de *A. citriodora* por el método de extracción de ultrasonido. En la Tabla 10 se muestra que la temperatura ejerció un aumento en la extracción de contenido de mg GAE/g de extracto, siendo la temperatura de 75 °C con la que se obtuvo un mayor rendimiento en la extracción de equivalentes de ácido gálico. Una mayor concentración de equivalentes a quercetina se obtuvo con temperatura de 50 °C, correlacionando esa misma temperatura empleada con la capacidad de inhibir el radical hidroxilo en un 50%, en la cual se obtuvo una concentración estimada de 1.65 mg/ml. De la misma manera están asociados los demás radicales obteniéndose una mejor IC₅₀ a una temperatura de 50 °C. Existió una correlación entre los equivalentes de quercetina y la capacidad para inhibir el radical, entre más mg QE/g tuvo el extracto menor cantidad se ocupó mg/ml del extracto para eliminar el radical hidroxilo. En la Figura 6 se muestran los valores de r (media de mínimos cuadrados) calculados a partir de la ecuación de regresión lineal múltiple. Los valores más grandes de r (92.70 mg GAE/g) fueron obtenidos siempre a temperatura alta (75 °C) y el menor (3.35 mg GAE/g) a temperatura baja (30 °C). La contribución de los tres factores (T, R y A) fue significativo para dar la r más grande (92.70 mg GAE/g).

Tabla 9. Niveles de Valor p del análisis de varianza de tres vías para el efecto del Temperatura (T), concentración soluto/solvente (R) y Amplitud (A).

	T	R	A	(T X R)	(T X A)	(T X R X A)
Fenoles	*	*	*	*	*	*
Flavonoides	*	*	*	*	*	*
Radical OH [•]	*	*	*	*	*	*
Radical DPPH [•]	*	*	*	*	*	*
Radical ABTS ^{•+}	*	*	*	*	*	*

* $p < 0.0001$. NS: No significativo

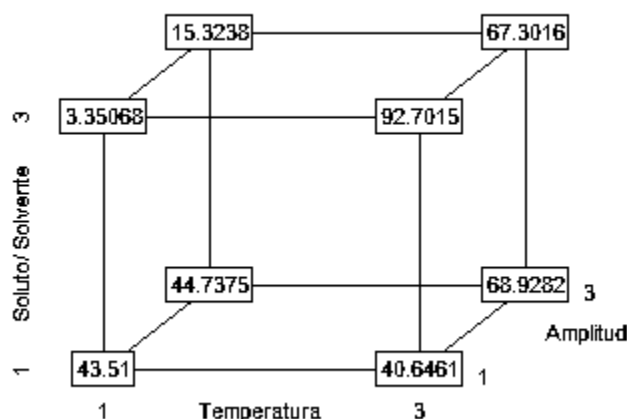


Figura 6. Valores de fenoles r (media de mínimos cuadrados) calculados a partir de la ecuación de regresión lineal múltiple reportada considerando todos posibles combinaciones de los factores de temperatura (T), concentración soluto/solvente (R) y amplitud (A).

Tabla 10. Efecto de la temperatura sobre las variables respuesta.

Nivel	Temperatura	Media de mínimos cuadrados (Pt)	Media de mínimos cuadrados (F)	Media de mínimos cuadrados (OH [•])	Media de mínimos cuadrados (DPPH [•])	Media de mínimos cuadrados (ABTS ^{•+})
3	75 °C	68.99 ^A	61.012 ^B	1.98 ^B	107.95 ^B	24.46 ^B
2	50 °C	60.37 ^B	71.051 ^A	1.65 ^C	130.65 ^B	22.59 ^C
1	30 °C	32.86 ^C	23.288 ^C	3.32 ^A	425.95 ^A	42.58 ^A

Letras diferentes (A, B, C, D, etc) en la misma columna son significativamente diferentes a $p < 0.05$ (ANOVA, seguido por la prueba de Tukey). $n=3$.

En la Tabla 11 se muestra la relación de soluto/solvente que ejerce sobre la extracción de contenido de fenoles y flavonoides totales, siendo la relación 1/10 (g/ml) la que obtuvo un mayor rendimiento en la extracción de equivalentes de ácido gálico, y siendo para un mayor contenido de equivalentes a quercetina a una relación de 1/15. Frente a los radicales la relación 1/10 obtuvo una concentración menor para eliminar el 50 % del radicales. En la Figura 7 se muestran los valores de r calculados de la

ecuación de regresión lineal múltiple, en donde la contribución de los tres factores (T, R y A) fue significativo para dar el r más grande (94.583 mg QE/g). El valor fue obtenido por la temperatura y relación más alta, donde se observa que no influye la amplitud, siendo la de nivel más bajo para llegar a la r .

Tabla 11. Efecto de la relación (soluto/solvente) sobre las variables respuesta.

Nivel	Relación (soluto/ solvente)	Media de mínimos cuadrados (Pt)	Media de mínimos cuadrados (F)	Media de mínimos cuadrados (OH [•])	Media de mínimos cuadrados (DPPH [•])	Media de mínimos cuadrados (ABTS ^{•+})
2	1/10	58.61 ^A	47.221 ^B	1.75 ^C	163.78 ^B	24.80 ^C
3	1/15	53.37 ^B	64.123 ^A	2.79 ^A	324.93 ^A	26.43 ^B
1	1/5	50.22 ^B	44.006 ^C	2.43 ^B	175.85 ^B	38.40 ^A

Letras diferentes (A, B, C, D, etc) en la misma columna son significativamente diferentes a $p < 0.05$ (ANOVA, seguido por la prueba de Tukey). $n=3$.

En la Tabla 12 se muestra la relación que existe entre la amplitud y la extracción de contenido de polifenoles y flavonoides totales, siendo la amplitud más grande 35 % la que obtuvo un mayor rendimiento en la extracción de equivalentes a quercetina, frente a los radicales la relación las amplitudes de 25 % y 35 % no tuvieron diferencia entre ellas, siendo solo diferentes con la amplitud baja (20 %) la cual obtuvo una concentración más alta para eliminar el 50 % del radicales.

Tabla 12. Efecto de la amplitud sobre las variables respuesta.

Nivel	Amplitud	Media de mínimos cuadrados (Pt)	Media de mínimos cuadrados (F)	Media de mínimos cuadrados (OH [•])	Media de mínimos cuadrados (DPPH [•])	Media de mínimos cuadrados (ABTS ^{•+})
2	25	60.29 ^A	47.318 ^B	1.69 ^C	151.36 ^B	25.44 ^B
3	35	53.64 ^B	59.800 ^A	2.01 ^B	151.02 ^B	25.97 ^B
1	20	48.28 ^C	48.233 ^B	3.25 ^A	362.17 ^A	38.23 ^A

Letras diferentes (A, B, C, D, etc) en la misma columna son significativamente diferentes a $p < 0.05$ (ANOVA, seguido por la prueba de Tukey). $n=3$.

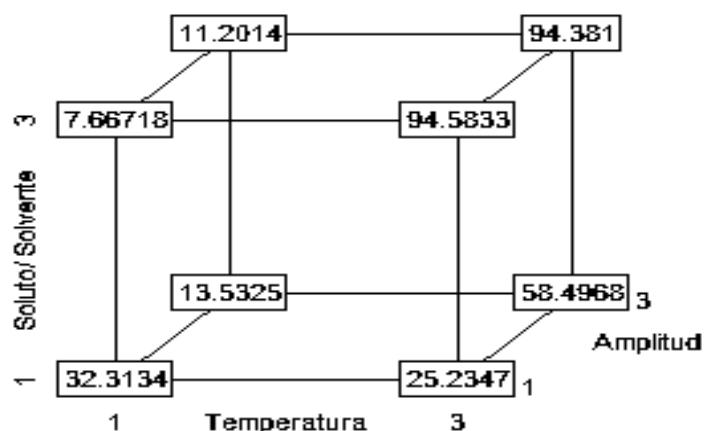


Figura 7. Valores de flavonoides r (media de mínimos cuadrados) calculados de la ecuación de regresión lineal múltiple considerando las posibles combinaciones de los factores de temperatura (T), concentración soluto/solvente (R) y amplitud (A).

En la Figura 8 se muestran los valores r calculados a partir de la ecuación de regresión lineal múltiple. La contribución de los tres factores (T, R y A) fue significativo para dar el valor de r baja (0.86 mg/ml). El valor fue obtenido por la temperatura y relación alta, donde influyó la amplitud, siendo la de nivel más bajo para llegar a la r .

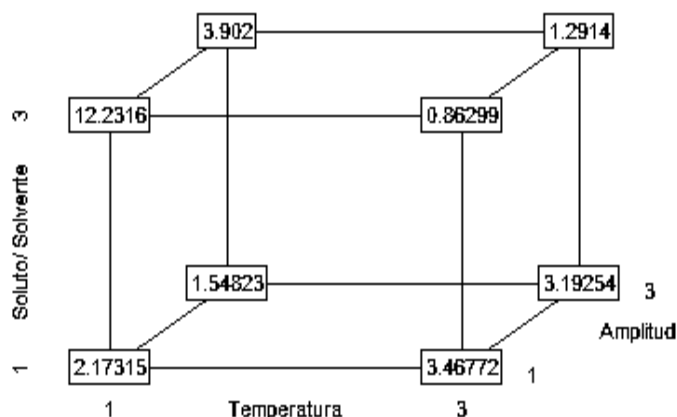


Figura 8. Valores del radical hidroxilo r (media de mínimos cuadrados) calculados de la ecuación de regresión lineal múltiple considerando las posibles combinaciones de los factores de temperatura (T), concentración soluto/solvente (R) y amplitud (A).

7.6 Conclusión

Se rechazó la hipótesis nula y se aceptó la hipótesis alternativa que sugiere que existe una diferencia significativa ejercida por temperatura, relación planta/solvente y amplitud usados para extraer compuestos fenólicos y la determinación de las actividades IC₅₀ de los radicales. Las condiciones relación solvente/materia orgánica y la temperatura fueron factores que influyeron en la extracción de compuestos fenólicos, los cuales se vieron reflejados en su actividad para eliminar los radicales libres, siendo el extracto “**T3R3A2**” y “**T2R3A3**” los cuales tienen todas las características para ser seleccionados como los mejores extractos para ser utilizados en estudios de actividad terapéutica y farmacológica en un sistema *in vivo*. La extracción por ultrasonido es una herramienta útil y repetible para la obtención de compuestos fenólicos en tiempos cortos donde los parámetros como la amplitud con la cual trabaja el sonotrodo influye en la cantidad de compuestos que son extraídos. Comparando resultados obtenidos por métodos tradicionales de extracción en *A. citriodora* existe un incremento utilizando agua y la fuerza de ultrasonido comparado con el uso de metanol y el rotaevaporador.

7.7 Referencias primer capítulo

Al-Qaraleh, S., Tarawneh, K.A. (2016). Antioxidant Activity of Methanolic Extracts of *Aloysia triphylla*, *Ceratonia siliqua*, *Cupressus sempervirens* and *Punica granatum* Selected from Karak Region-Jordan. *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.*, 16 (3), 479-486.

Alipieva, K., Korkina, L., Orhan, I.E., Georgiev, M.I. (2014). Verbascoside A review of its occurrence, (bio) synthesis and pharmacological significance. *Biotechnology Advances*, 32(6), 1065-1076.

Alvarez Cortes, O. (2020) Elaboración de una Biopelícula Comestible Incorporando Nanocápsulas de Aceite Esencial y Extractos Polifenólicos de *Aloysia citriodora* con Actividad Antiinflamatoria Evaluado en un Modelo Biológico. *Master's Thesis*, Facultad de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, México.

Azimi, H., Fallah-Tafti, M., Khakshur, A.A., Abdollahi, M.A. (2012). Review of phytotherapy of acne vulgaris: perspective of new pharmacological treatments. *Fitoterapia*, 83, 1306–17.

Bahramsoltani, R., Rostamiasrabadi, P., Shahpiri, Z., Marques, A.M., Rahimi, R., Farzaei, M.H. (2018). *Aloysia citrodora* Paláu (Lemon verbena): A review of phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 222, 34–51.

Brand W. W., Cuvelier, M.E., Berset, C.L.W.T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol.*, 28(1), 25-30.

Camarena, T.J.C., Martínez, M.H.E., Garnica, R.M., Padilla, R.J.S., Saavedra, M.A., Alvarez, C.O., Bartolomé-Camacho, M.C., Rodiles, L.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(3), 34.

Cheurfa, M., Allem, R. (2015). Évaluation de l'activité anti-oxydante de différents extraits des feuilles d'*Aloysia triphylla* (L'Hérit.) d'Algérie in vitro. *Phytothérapie*, 14(3), 181–187.

Christ B, Müller K.H. (1960) Zur serienmaessigen Bestimmung des Gehaltes an Flavonol-Derivaten in Drogen. *Arch Pharm.* 293: 1033–1042.

- Dewan, N., Dasgupta, D., Pandit, S., Ahmed, P.** (2016). Review on-Herbosomes, A new arena for drug delivery. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(4), 104.
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K.K., Liu, R.H.** (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 3010-3014.
- Dzah, CS, Duan, Y., Zhang, H., Wen, C., Zhang, J., Chen, G., Ma, H.** (2020). The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience*, 35, 100547.
- García, R.E., Calix, E.P., Zarzosa, A.O., Pérez, M.E.G.** (2018). Ethnomedicinal plants used for the treatment of dermatological affections on the Purépecha Plateau, Michoacán, Mexico. *Acta Botánica Mexicana*, (125), 95-132.
- Georgiev, M.I., Pastore, S., Lulli, D., Alipieva, K., Kostyuk, V., Potapovich, A.** (2012). Verbascum xanthophoeniceum-derived phenylethanoid glycosides are potent inhibitors of inflammatory chemokines in dormant and interferon-gamma-stimulated human keratinocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, 144:754–60.
- Hernández, D.G.G., Cárdenas, A.O., Star, M.J.V., Licea, R.Q., Rivas, C.L., González, E.G., Morales, C.R.** (2015). Actividad fungicida, antioxidante e identificación de los compuestos más activos de 20 plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 46(3), 73-79.
- Köroğlu, A., Altanlar, N., Kendir, G., Şimşek, D.** (2015). Piyasada satışa sunulan *Aloysia citriodora* Palau örneklerinin antioksidan kapasite ve mikrobiyolojik kontaminasyon yönünden incelenmesi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 45(3), 136-144.
- Lee, J.H., Lee, J.Y., Kang, H.S., Jeong, C.H., Moon, H., Whang, W.K.** (2006). The effect of acteoside on histamine release and arachidonic acid release in RBL-2H3 mast cells. *Archives of Pharmacol Research*, 29:508–13.
- Lee, J.Y., Woo, E.R., Kang, K.W.** (2005). Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase expression by acteoside through blocking of AP-1 activation. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 561–6.

- Li, Y., Yu, H., Jin, Y., Li, M., Qu, C.** (2018). Verbascoside alleviates atopic dermatitislike symptoms in mice via its potent anti-inflammatory effect. *International Archives of Allergy and Immunology*, 175(4):220-230.
- Moeina, M., Zarshenasc, M.M., Etemadfarda, H.** (2014) essential oil composition and total flavonoid content of *Aloysia citriodora* palau under different cultivation systems. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, (4), 353-358.
- Mosca, M., Ambrosone, L., Semeraro, F., Casamassima, D., Vizzarri, F., Costagliola, C.** (2013). Ocular tissues and fluids oxidative stress in hares fed on verbascoside supplement. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 65(2), 235–240.
- Okoh, S.O., Oyewole, A.O., Ishola, R.O., Odusote, A.D., Okoh, O.O., Igwe, C.C., Elemo, G.N.** (2015). Antioxidant and Free Radical Scavenging Capacity of Crude and Refined Oil Extracted From *Azadirachta indica* A. Juss. *Rev. Intern. Biol.*, 7(2):78-85.
- Pastore, S., Potapovich, A., Kostyuk, V., Mariani, V., Lulli, D., De Luca, C.** (2009). Plant polyphenols effectively protect HaCaT cells from ultraviolet C-triggered necrosis and suppress inflammatory chemokine expression. *Annals of the New York Academic Sciences*, 1171, 305–11.
- Paucar, A., Y Matute, N.L.** (2018). Caracterización físicoquímica de una mezcla de *Cucumis sativus* L. y *Aloysia triphylla* (Cedrón) con propiedades nutraceuticas. *Fac Salud-UNEMI*, 2(2):13-18.
- Pereira, E., Barros, L., Antonio, A. L., Cabo Verde, S., Santos, B. 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, B., Endara, A., Garrido, J., Ramírez,C.L.** (2021). Extraction of anthocyanins from Mortiño (*Vaccinium floribundum*) and determination of their antioxidant capacity. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 74(1), 9453-9460.
- Potapovich, A.I., Lulli, D., Fidanza, P., Kostyuk, V.A., De Luca, C., Pastore, S.** (2011). Plant polyphenols differentially modulate inflammatory responses of human keratinocytes by interfering with activation of transcription factors NFκB and AhR and EGFR-ERK pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 255, 138–49.

- Quirantes, P.R., Funes, L., Micol, V., Segura, C.A., Fernández, G.A.** (2009). High-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a lemon verbena extract. *Journal of Chromatography A*, 1216(28), 5391–5397.
- Rao, Y.K., Fang, S.H., Hsieh, S.C., Yeh, T.H., Tzeng, Y.M.** (2009). The constituents of *Anisomeles indica* and their anti-inflammatory activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 121, 292–6.
- Sharma, T., Kanwar, S.S.** (2018). Phytomolecules for obesity and body weight management. *Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 1(1), 1-8.
- Schlauer, J., Budzianowski, J., Kukulczanka, K., Ratajczak, L.** (2004) Acteoside and related phenylethanoid glycosides in *Byblis liniflora* Salisb. plants propagated in vitro and its systematic significance. *Acta Soc Bot Pol*; 73:9–15.
- Skaltsa, H., Shammash, G.** (1988). Flavonoids from *Lippia citriodora*. *Planta Medica*, 54(05), 465.
- Sun, X., Qi, H., Wu, H., Qu, Y., Wang, K.** (2020). Anti-pruritic and anti-inflammatory effects of natural verbascoside through selective inhibition of temperature-sensitive Ca²⁺-permeable TRPV3 channel. *Journal of Dermatological Science*, 97(3), 229-231.
- Taga, M.S., Miller, E.E., Pratt, D.E.** (1984). Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 61(5):928–931.
- Torres, N.C.M.** (2017). Efecto del ultrasonido en la extracción y nanoencapsulación de polifenoles de limón persa (*Citrus latifolia*). Tesis de Maestría. CIATEJ. Mérida, Yucatán, México.
- Ullauri, P.G.** (2010). Transporte de masa en extracción fase sólido-líquido. *Revista ReCiTeIA*, 10(2):4-13.
- Valencia, A., E., García, P.M.E., Garnica, R.M.G., Figueroa, C.J.D.D., Meléndez, H.E., Salgado, G.R., Martínez, F.H.E.** (2018). Antioxidant properties of polyphenolic extracts from *Quercus laurina*, *Quercus crassifolia*, and *Quercus scytophylla* bark. *Antioxidants*, 7(7), 81.
- 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 Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(4):308-311.

Zenz, R., Eferl, R., Scheinecker, C., Redlich, K., Smolen, J., Schonthaler, H.B. (2008). Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease. *Arthritis Research Therapy*, 10, 201.

Zhang, Y., Chen, Y., Wang, S., Dong, Y., Wang, T., Qu, L., Wang, T. (2015). Bioactive constituents from the aerial parts of *Lippia triphylla*. *Molecules*, 20(12), 21946-21959.

8. Capítulo 2: Análisis de la superficie de respuesta para la encapsulación de extracto acuoso de hojas de *Aloysia citriodora* Paláu

8.1 Resumen

Se evaluó el impacto de la nanoencapsulación sobre compuestos fenólicos obtenidos a partir de hojas de *A. citriodora* (cedrón), extraídos mediante procesamiento ultrasónico, con el fin de preservar su bioactividad. Se utilizó un diseño Box-Behnken para optimizar la encapsulación utilizando maltodextrina, carboximetilcelulosa (CMC) y goma guar como materiales de pared. La muestra con mayor eficiencia de encapsulación (94.93 %) se obtuvo empleando solo CMC, y demostró una buena capacidad antioxidante (IC_{50} de 1.79 mg/ml frente al radical hidroxilo). Las cápsulas obtenidas mostraron morfología esférica, estabilidad estructural y tamaños adecuados (75 % de partículas < 2.59 μ m), conservando compuestos bioactivos como verbascósido, luteolina y martinósido. Los análisis de Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) confirmaron la integridad química de los compuestos fenólicos post-encapsulación. El extracto T3R3A2 se destacó por su capacidad antioxidante, con un contenido de flavonoides de 94.58 mg EQ/g y actividad frente a radicales libres superior a estándares como ácido gálico y Oligopin®. La encapsulación por spray-drying optimizó la protección y liberación de los compuestos, sugiriendo un alto potencial para aplicaciones terapéuticas contra procesos inflamatorios.

Palabras clave: Box-Behnken; Verbascósido; Maltodextrina; Oligopin; HPLC.

8.2 Abstract

The impact of nanoencapsulation on phenolic compounds obtained from *A. citriodora* (Cedrón) leaves, extracted by ultrasonic processing, was evaluated in order to preserve their bioactivity. A Box–Behnken design was used to optimize encapsulation employing maltodextrin, carboxymethylcellulose (CMC), and guar gum as wall materials. The sample with the highest encapsulation efficiency (94.93 %) was obtained using CMC alone, and it demonstrated good antioxidant capacity (IC_{50} of 1.79 mg/mL against the hydroxyl radical). The resulting capsules exhibited spherical morphology, structural stability, and suitable particle sizes (75 % of particles < 2.59 μ m), while retaining bioactive compounds such as verbascoside, luteolin, and martynoside. HPLC and FTIR analyses confirmed the chemical integrity of phenolic compounds after encapsulation. The extract T3R3A2 stood out for its antioxidant capacity, with a flavonoid content of 94.58 mg QE/g and free radical scavenging activity superior to standards such as gallic acid and Oligopin®. Spray-drying encapsulation enhanced the protection and release of the compounds, suggesting high potential for therapeutic applications against inflammatory processes.

Keywords: Box-Behnken; Verbascoside; Maltodextrin; Oligopin; HPLC.

8.3 Introducción

Es importante el desarrollo de nuevos fármacos multidireccionales con actividad antiinflamatoria, con eficacia para aumentar las opciones para el tratamiento de pacientes que sufren enfermedades relacionadas con la inflamación, como la artritis reumatoide. Es por ello, que los medicamentos herbales de múltiples componentes capaces de interactuar con varios objetivos involucrados en esta condición son una opción prometedora (Azimi *et al.*, 2012; Dewan *et al.*, 2016; Sharma y Kanwar, 2018). Las hojas de *A. citriodora* Paláu son abundantes en compuestos fenólicos cuyo componente principal es el verbascósido, al cual se le atribuye actividad antiinflamatoria y además contiene luteolin7-odiglucorónico, ácido p-cumárico, feniletanoide, eucovósido y martinósido (Pereira *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2020). 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; Alvarez, 2020). 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. La estabilidad de los polifenoles podría mejorarse utilizando tecnologías de microencapsulación, como el secado por aspersión (Ersus y Yurdagel, 2007). El equipo nano Spray Dryer B-90 (Büchi® Labortechnik AG, Flawil, Suiza) ha sido utilizado para el secado de extractos y encapsulación, con las siguientes condiciones de operación para la pulverización de extractos de *Psidium guajava*: temperatura de entrada 105 °C, temperatura de salida 38 °C, 90 % de apertura de spray y una malla 7 µm (Camarena *et al.*, 2018). El material de pared protege a las moléculas bioactivas sensibles y controla su liberación. Pueden ser de diferentes materiales, destacando los polisacáridos como el almidón, alginatos, gomas, pectinas y mucílagos. Sus aplicaciones son variadas ya que poseen características deseadas para la elaboración de redes poliméricas. En la encapsulación de extracto de *Opuntia atropes* el material de pared maltodextrina fue un excelente encapsulante (Tranquilino *et al.*, 2020). Las maltodextrinas tienen una alta solubilidad en agua, baja viscosidad

y se utilizan para encapsular antocianinas y polifenoles (Ersus y Yurdagel, 2007, Saénz *et al.*, 2009).

8.4 Materiales y métodos

8.4.1 Obtención de los extractos fenólicos

El extracto acuoso se obtuvo mediante el Ultrasonificador VCX 500, utilizando las condiciones óptimas en relación solvente/materia orgánica, temperatura y amplitud de onda que influyeron en la extracción de compuestos fenólicos del capítulo 1, los cuales se vieron reflejados en su actividad para eliminar los radicales libres, siendo el extracto “T3R3A2” con el mejor efecto antioxidante.

8.4.2 Contenido de sólidos totales

Se determinó el contenido de sólidos totales del extracto acuoso. Para ello, previamente el extracto acuoso se filtró utilizando papel Whatman de 25 hasta 2.5 micras, utilizando el método de Tranquilino *et al.* (2020). En una cápsula se llevó a peso constante y posteriormente se pesó 1 ml de muestra, la cual se le eliminó el contenido de agua en una estufa de secado (Felisa®) a 100 °C durante 2 h, y en una balanza se determinó el contenido de sólidos.

8.4.3 Método Box-Behnken

El diseño de Box-Behnken es un diseño de superficie de respuesta que no tiene un diseño factorial. Tienen combinaciones de tratamiento que están en los puntos medios de los bordes del espacio experimental. Este método se eligió para determinar la mejor materia de pared para encapsular extractos fenólicos de las hojas de *A. citriodora* (cedrón).

Se realizó la elección de los siguientes materiales de pared (maltodextrina/CMC /goma guar), dada su estabilidad y formación de nano y micro cápsulas, con la metodología reportada por Tranquilino *et al.* (2020), en la cual se ejecutó el método de superficie de respuesta Box-Behnken, utilizando el software Stathraphics Centurion XVII. Para ello, se eligieron los siguientes valores constantes, las cuales fueron relación material de pared/sólidos totales del extracto 1:1, el porcentaje de spray al 60 %, temperatura de operación de 100 °C, donde se evaluó la eficiencia de

encapsulación, rendimiento, flavonoides totales y radical hidroxilo de las cápsulas obtenidas.

En la Tabla 13 se observan los 15 tratamientos propuestos por el software, en los cuales se varió la relación de los tres materiales de pared con el contenido de sólidos de la muestra, teniendo un punto central con tres repeticiones.

Tabla 13. Diseño Box-Behnken.

Maltodextrina	Carboximetilcelulosa	Goma Guar	Muestra
0	100	50	1
50	100	0	2
100	50	0	3
50	0	100	4
0	50	100	5
50	100	100	6
100	0	50	7
100	100	50	8
0	0	50	9
50	0	0	10
0	50	0	11
100	50	100	12
50	50	50	13
50	50	50	14
50	50	50	15

8.4.4 Preparación del extracto y el material de pared

Para la homogenización de material de pared con el extracto se utilizó la fuerza del Ultrasonicador VCX 500, donde se sónico la muestra por 30 min y amplitud de 30 %.

8.4.5 Nanoencapsulación

La nanoencapsulación se efectuó con el equipo nano spray Dryer B 90 (Figura 9). Se corroboró la viscosidad de la muestra con el reómetro DV3T (Brookfield,) con las

siguientes condiciones: aguja: ULA (0) con una velocidad de 50 RPM antes de introducir la muestra al equipo de secado por aspersión. Se utilizaron 50 mL de muestra, las condiciones de secado fueron las siguientes: Spray 60 %, Temperatura 100 °C, Presión 32 mbar.



Figura 9. Secado del extracto acuoso en Nano spray dryer B 90. (Tomado de Alvarez, 2020).

8.4.6 Análisis Espectrofotométricos (uv-vis)

8.4.6.1 Método de fenoles totales Folin-Ciocalteu

El ensayo de Folin-Ciocalteu (FC), se basa en la reacción de los fenoles con el reactivo FC, a un pH básico dando lugar a una coloración azul, que es determinada espectrofotométricamente a 750 nm y se expresa en equivalentes de ácido gálico. El reactivo FC es una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico, obteniendo así el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, el cual al reaccionar con los fenoles presentes en la muestra es reducido, dando lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que se puede medir para evaluar el contenido de fenoles (Taga *et al.*, 1984; Valencia *et al.*, 2018; Alvarez, 2020).

8.4.6.2 Método de flavonoides totales

Para la medición de flavonoides totales se realizó la metodología descrita por Afrasiabian *et al.* (2018). Se preparó AlCl_3 al 2% (m/v): 0.2 g de AlCl_3 se disolvieron en 10 mL metanol al 50 %, la disolución se sónico por 5 min. Para la curva de calibración se usó una solución madre de quercetina a 0.02 mg/mL (Alvarez, 2020).

8.4.6.3 Método de radical hidroxilo

La actividad antioxidante de los extractos frente al radical hidroxilo se determinó según lo descrito por Smirnov y Cumbes (1989). Se añadió 1 mL de la solución del extracto a sulfóxido de dimetilo a diferentes concentraciones (que van de 100 a 2000 $\mu\text{g/mL}$), 300 μL de FeSO_4 (8 mM) y 250 μL de H_2O_2 (20 mM). La reacción se inició por la adición de 1 mL de solución de ácido salicílico (3 mM), y luego se incubó por 30 min a 30 °C. Posteriormente, se agregaron 450 μL de agua destilada y la mezcla midió la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm (Valencia *et al.*, 2018).

8.4.7 Análisis de cápsulas en polvo

8.4.7.1 Compuestos fenólicos encapsulados

Se realizó la metodología de Robert *et al.* (2010), en la cual describe el método de destrucción de las cápsulas, donde se pesaron 0.005 g/mL de cápsulas y se le añadió metanol: ácido acético: agua (50:8:42 v/v/v). Esta mezcla se llevó a agitación en un Vortex por 1 min.

8.4.7.2 Compuestos fenólicos en de superficie de las cápsulas (CFS)

Para la determinación de los compuestos fenólicos en la superficie de la cápsula se realizó la metodología descrita por Robert *et al.* (2010), donde 0.005 g de cápsulas fueron mezclados con 1 mL de etanol y metanol (1:1). Esta dispersión se mezcló en un Vortex durante 1 min, posteriormente, la dispersión se sometió a 40 min de mezclado en el equipo sonicador (BRANSONIC® CPXH 3800, Estados Unidos). Al terminar el ciclo de sonicación se llevó a centrifugar a 3000 rpm por 10 min. Los compuestos fenólicos se cuantificaron como se describió anteriormente. Para el cálculo de la eficiencia de encapsulación (E.E) se emplearon las siguientes ecuaciones.

$$CFS (\%) = \frac{\text{Compuestos fenólicos de la superficie}}{\text{Compuestos fenólicos encapsulados}} * 100$$

$$E.E \% = 100 - CFS$$

8.4.7.3 Tamaño de partícula en una suspensión acuosa

Se realizó un análisis de tamaño de partícula en una disolución acuosa conteniendo las cápsulas. Para cada tratamiento se preparó una solución de 0.005 g de cápsulas en 1 mL de agua destilada. La medición se evaluó en un analizador de nanopartículas (Horiba® SZ-100, Ltd., Japón). El tamaño de partícula se expresó en nm.

8.4.7.4 Morfología y tamaño de partícula de las cápsulas en polvo

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. El tamaño de partícula se expresó en nm (Alvarez, 2020).

8.4.7.5 Análisis HPLC del extracto pulverizado y las cápsulas óptimas

Se realizó un análisis HPLC en la muestra óptima del extracto acuoso, la cual solo se secó a 45 °C por 24 h; así como extracto pulverizado por el equipo nano spray drayer y las cápsulas optimizadas, utilizando un sistema HPLC Agilent 1200 Infinity Series acoplado a un espectrómetro Q-TOF LC/MS, modelo G6530B Dual AJS ESI (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE. UU.). La columna utilizada fue una Poroshell 120 Ec-C18 de 2.7 µm, 4.6 mm x 50 mm. Los eluyentes fueron H₂O (A) y acetonitrilo (B). Se aplicó el siguiente gradiente lineal multi-etapa: de 80 % A y 20 % B en 5 min, a 10 % A y 90 % B en 20 min, y 0 % A y 100 % B a los 25 min. El tiempo total de análisis fue de 28 min, la tasa de flujo fue de 0.500 ml/min, y la temperatura del horno fue de 26 °C. Además, se analizó un estándar de verbascósido de calidad HPLC de Sigma-Aldrich para identificar la presencia de verbascósido en las muestras analizadas.

8.4.7.6 Espectrometría infrarroja del extracto acuoso y las cápsulas óptimas

El extracto pulverizado, las cápsulas del extracto óptimas y el estándar de verbascósido de calidad HPLC de Sigma-Aldrich se analizaron mediante Espectrofotometría de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR), para la identificación de grupos funcionales presentes. Se utilizó un equipo FTIR (Vertex 70), empleando una longitud de onda $600 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ en el cual se colocaron pequeñas muestras de los extractos secos obtenidos (Alvarez, 2020).

8.4.8 Análisis estadístico

Los datos se sometieron análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey utilizando el software JMP 6 Los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos.

8.5 Resultados

8.5.1 Contenido de sólidos totales

Se obtuvieron 1.5 L de extracto de cedrón con las condiciones: temperatura de 75°C , con una relación de material de pared y solvente (1/15) y una amplitud de 25 %, el cual presento la siguiente capacidad de eliminar los radicales $\text{ABTS}^{\bullet+}$, $\text{DPPH}^\bullet$ e hidroxilo, mostrado en la Tabla 14. Se determinó el contenido de sólidos totales después de haber filtrado el extracto con papel Whatman de 2.5 micras, el cual fue de $0.00673 \pm 0.0001 \text{ g}$.

Tabla 14. Capacidad antioxidante del extracto de cedrón (T3R3A2).

Muestra	$\text{OH}^\bullet \text{ IC}_{50} \text{ (mg/mL)}$	$\text{DPPH}^\bullet \text{ IC}_{50} \text{ (}\mu\text{g/mL)}$	$\text{ABTS}^{\bullet+} \text{ IC}_{50} \text{ (}\mu\text{g/mL)}$	F.T. (mg GAE/g)	F. (mg QE/g)
T3R3A2	0.72 ± 0.007	35.58 ± 0.50	9.08 ± 0.08	92.70 ± 8.81	94.58 ± 8.33
Ac. gálico	-	2.35 ± 0.09	0.91 ± 0.02		
Ac. ascórbico	-	8.25 ± 0.18	-		
Trolox	-	-	0.12 ± 0.07		

F.T: Fenoles totales. F.: Flavonoides

8.5.2 Método Box-Behnken

Se corrieron 15 tratamientos, dónde se ajustó el contenido de sólidos de extracto con el material de pared a una relación 1:1, dando como resultado una viscosidad que va de 2.75 -3.00 cP. A continuación, se muestran los resultados obtenidos del análisis de las cápsulas de extracto de cedrón. En la Tabla 15 se observa que el rendimiento de recuperación de las cápsulas se encuentra en un rango de 70.66 - 59.52 %, el rendimiento de secado por aspersión en el equipo nano spray dryer se estima que es de un 70 %, comparando los resultados reportados por Tranquilino *et al.* (2020), en el cual demuestra que una relación 1:1 con material de pared se obtiene un 21–67 % de rendimiento de cápsulas de *Opuntia atropes* utilizando como material de pared caseinato de sodio y maltodextrina, obteniendo un mayor rendimiento incrementando el material de pared. Se considera que la encapsulación obtenida fue favorable ya que se recuperaron alrededor de la mitad del material de pared procesado, tomando en cuenta los resultados obtenidos por Tranquilino *et al.* (2020) en la que la relación de material de pared determina el rendimiento, así como el material de pared mismo. Se obtuvo un valor de $R^2 = 89.22$ %, el software propone los valores óptimos de material de pared siendo maltodextrina/ CMC/ goma guar en una proporción de (100/ 7/ 0.06). Se calculó el valor óptimo teórico proporcionado por el software, el cual fue de 72.46 en rendimiento. Por lo cual da un indicativo que la maltodextrina debe de estar en una mayor proporción que la CMC y la goma guar.

Tabla 15. Análisis de microcápsulas.

Muestra	E.E. (%)	Rendimiento (%)	Flavonoides (mg Eq. Quercetina/ g cápsulas)	IC ₅₀ del radical hidroxilo (mg/mL)
1	76.45	62.22	20.76	2.06
2	81.10	65.59	20.02	1.93
3	83.87	70.66	20.51	2.04
4	91.28	63.79	22.13	2.38
5	65.29	62.46	21.94	1.86
6	84.45	61.64	20.05	2.09

7	87.84	65.91	18.70	2.94
8	91.33	65.45	18.32	2.20
9	75.73	59.52	21.30	2.62
10	92.75	69.90	17.40	2.69
11	94.93	62.30	21.15	1.79
12	71.16	63.98	15.41	2.57
13	87.50	63.46	20.26	1.96
14	87.02	65.35	20.01	2.00
15	90.09	63.80	18.58	2.19

Los resultados de la eficiencia de encapsulación mostrada resaltan que la mejor combinación hasta el momento fue la muestra número 11, la cual está constituida por maltodextrina/CMC/goma guar en una proporción de (0/50/0) obteniéndose 94.93 % muy superior al valor obtenido por la muestra 5 la cual está constituida por maltodextrina /CMC/ goma guar en una relación (0/50/100). Comparado los resultados obtenidos por Tranquilino *et al.* (2020) en que demuestra que la mejor eficiencia de encapsulación de compuestos fenólicos utilizando el equipo nano spray dryer fue de 94.30% utilizando una relación 4/1 de material de pared/sólidos totales, eficiencia similar a la obtenida en el presente trabajo, donde se demuestra que el tipo de material de pared puede aumentar significativamente la eficiencia de encapsulación de los compuestos fenólicos. En la Figura 10 se observan los efectos principales para la eficiencia de encapsulación, en el que el incremento de la goma guar disminuyó la eficiencia de encapsulación, siendo más estable la carboximetilcelulosa. Se obtuvo un valor de $R^2 = 56.40\%$, mientras que el software propone los valores óptimos de material de pared siendo maltodextrina/CMC/goma guar, en una proporción de (42.09/0.002/0). Se calculo el valor óptimo teórico proporcionado por el software, siendo de 95.62 % en eficiencia de encapsulación.

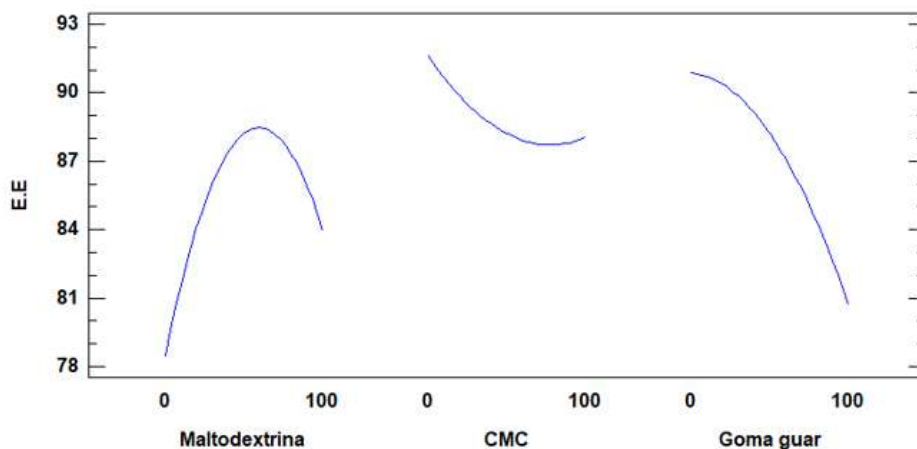


Figura 10. Grafica de efectos principales para E.E.

La actividad antioxidante sigue presente en las cápsulas después de someterlas a un filtrado hasta 2.5 micras y a un secado por aspersión. Se analizó el contenido de fenoles y flavonoides totales, tal como se muestra en la Tabla 15. Los flavonoides se reportaron en unidades mg equivalentes a quercetina (mg QE/g de cápsula). La muestra que obtuvo mayor cantidad de mg QE /g fueron la “4 y 5” con 22.13 y 21.94, respectivamente. Recordando que el extracto de cedrón con un mejor contenido fue “T3R3A2” con 94.58 ± 8.33 mg QE /g. Comparado con estudios realizados en extractos acuosos de *A. citriodora* donde se encontraron 7.01 mg equivalentes de quercetina /g hojas secas (Moeina *et al.*, 2014), se obtuvo un mayor contenido de equivalentes a quercetina en las cápsulas de cedrón. Con respecto al contenido de polifenoles (mg de Eq. de ácido gálico /g de cápsulas) la muestra “4” es la que obtuvo un mayor contenido con un 49.79 ± 5.51 y ccomparado con estudios realizados en extractos acuosos de *A. citriodora* donde se reportaron 51.85 mg equivalentes de ácido tánico/g material seco (Wernert *et al.*, 2009); Se obtuvo también una mayor concentración de moléculas GAE que el extracto de corteza de pino (Oligopin ®), donde para este fue una concentración de 10.90 ± 0.41 mg GAE/g. En la Figura 11 se observan los efectos principales para la eficiencia de encapsulación

donde se muestra que el incremento de la de la maltodextrina disminuye el contenido de flavonoides, siendo más estable la carboximetilcelulosa y goma guar.

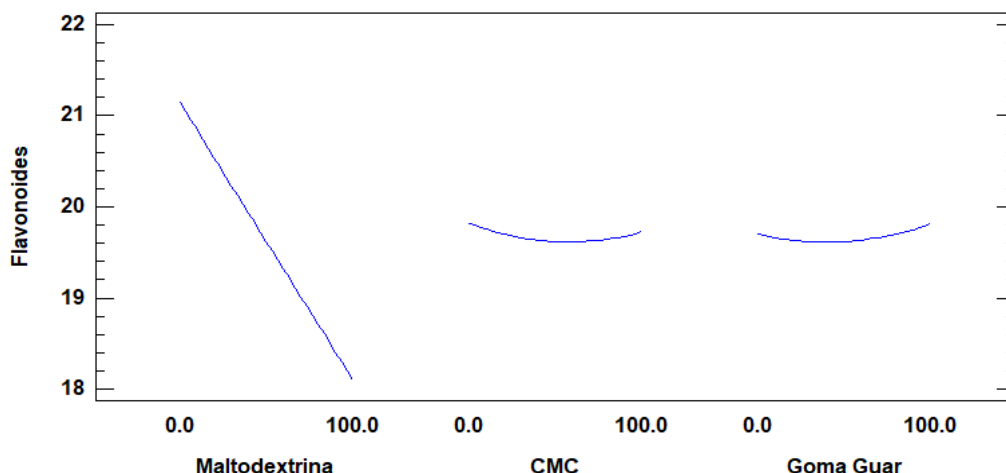


Figura 11. Grafica de efectos principales para flavonoides.

Se obtuvo un valor de $R^2 = 72.09 \%$, el software propone los valores óptimos de material de pared siendo maltodextrina/CMC/goma guar, en una proporción de (3.96/0.00004/100). Se calculó el valor óptimo teórico proporcionado por el software, siendo de 23.98 mg QE/g.

Se realizó una curva de inhibición del radical hidroxilo utilizando como estándar al Oligopin® (Nutri-Dyn, Maple Plain, MN, EE. UU.), procedente de extractos naturales de corteza de pino, obteniéndose una inhibición del 50% del radical OH a una concentración de 1.044 mg/ml. El Oligopin obtuvo el mejor rendimiento entre inhibición y concentración usada, mientras que para las muestras de cápsulas se tuvo un valor entre 1.79 – 2.94 mg/ml, siendo la muestra “11” la que obtuvo la IC_{50} con una menor cantidad de cápsulas siendo de 1.79 mg /ml. Estudios realizados por Valencia *et al.* (2018) en extractos de encino obtuvo una inhibición de radical hidroxilo con $1271 \pm 72 \mu\text{g/mL}$ Oligopin. En la Figura 12 se observan los efectos principales para la eficiencia de encapsulación donde se muestra que el incremento de la de la CMC disminuye el contenido del radical hidroxilo.

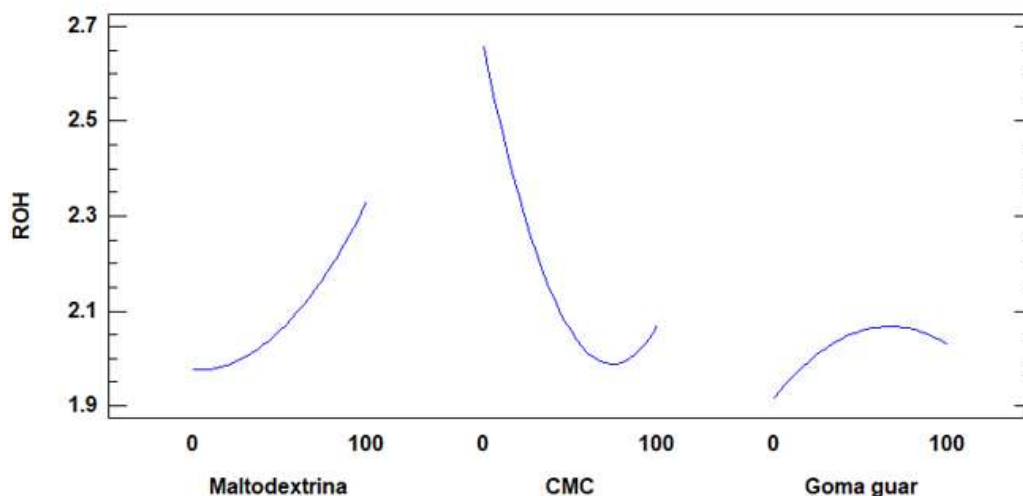


Figura 12. Gráfica de efectos principales para IC₅₀ radical hidroxilo.

Se obtuvo un valor de $R^2 = 91.59 \%$, el software propone los valores óptimos de material de pared siendo maltodextrina/CMC/goma guar, en una proporción de (41.47/83.14/0). Se calculó el valor óptimo teórico IC₅₀ proporcionado por el software, siendo de 1.77 mg/mL. De acuerdo a los resultados obtenidos, y por los valores más cercanos a 100 en R^2 se decidió optimizar por dos variables siendo rendimiento y capacidad de inhibir el radical hidroxilo. El análisis se realizó con el software Stathraphics Centurion XVII obteniéndose un valor de deseabilidad de 0.92. El software propone los valores óptimos de material de pared siendo maltodextrina/CMC/goma guar, en una proporción de (99.68/70.93/0). Se calculó el valor óptimo teórico proporcionado por el software para el rendimiento de 70.23 % e IC₅₀ 1.93 mg/mL. El rendimiento de las cápsulas óptimas fue de $71.49 \pm 0.52\%$ y para el radical hidroxilo 2.08 ± 0.07 mg/ml, valores muy cercanos a los predichos por el software, siendo mayor al esperado en el rendimiento. En la Figura 13 se observa que disminuyó la deseabilidad agregando goma guar, también se observó que debe de estar una relación mayor de maltodextrina que de CMC. Por lo cual se estima que en la encapsulación el material de pared con el extracto reacciona formando uniones de puentes de hidrógeno.

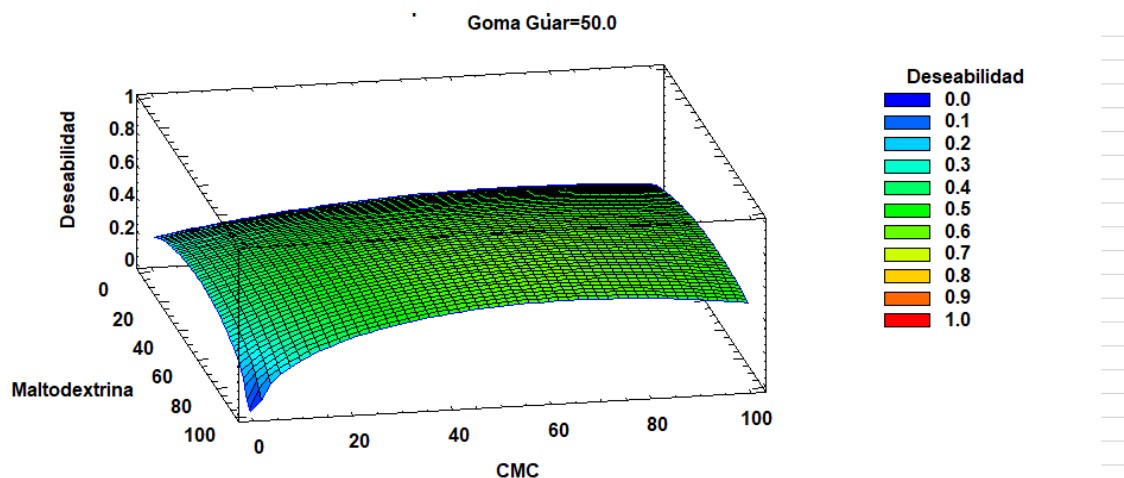


Figura 13. Gráfica de superficie de respuesta estimada.

8.5.3 Análisis HPLC del extracto pulverizado y las cápsulas óptimas

El análisis del extracto acuoso optimizado, pulverizado y encapsulado se llevó a cabo para identificar las principales moléculas presentes en el extracto a través del equipo HPLC-MS, en el cual se identificó cada compuesto fenólico de acuerdo con sus iones fragmentarios característicos, a través de la interpretación de sus patrones de fragmentación y la interpretación de los espectros de masas obtenidos. Estos datos se compararon con bases de datos como Phenol-Explorer y MassBank, detectándose para el extracto acuoso las moléculas que se muestran en la Tabla 16. Adicionalmente, se agregó la referencia de trabajos de otros autores donde detectaron las mismas moléculas en extractos acuosos y metanólicos de *A. citriodora*. Las moléculas descritas tienen capacidad antioxidante y propiedades sedantes, por ejemplo, la luteolina presente en el extracto acuoso fue identificado por Leyva (2020), al cual se le atribuye actividad antiinflamatoria. La molécula de luteolina en extracto acuoso tiene un tiempo de retención (R.T.) de 16.7 con un porcentaje de área de 0.84. La luteolina fue aislada e identificada a partir de las hojas de *Lippia graveolens*, miembro de la familia Verbenaceae, a la cual también pertenece *A. citriodora*. Cuando se analizó el estándar de verbascósido, se detectó un pico en el mismo tiempo de retención tanto en el extracto como en las cápsulas óptimas, la cual se muestra en la Figura 14, teniendo ambos un R.T de 6 min, lo que indica que el extracto óptimo como las cápsulas contiene verbascósido.

Se han realizado varios estudios sobre el verbascósido, una molécula obtenida del extracto óptimo, que tiene propiedades antiinflamatorias y fotoprotectoras. Estudios recientes han demostrado que es un agente neuroprotector, probado en células PC12 (Sheng et al., 2002). En el ámbito de la investigación biomédica, los flavonoides, feniletanoides, glicósidos y ácidos hidroxicinámicos han capturado la atención por sus relevantes propiedades terapéuticas. Moléculas como la luteolina, apigenina, eupatorina, kaempferol y cirsiol destacan por sus reconocidos efectos antiinflamatorios y anticancerígenos. Estudios recientes confirman que flavonoides como hesperetina y naringenina presentan una bioactividad dependiente de la concentración, con propiedades antibacterianas frente a especies como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, además de efectos antiinflamatorios mediados por la inhibición de genes proinflamatorios como TNF- α e IL-1 β (Shen et al., 2025). El kaempferol es un flavonoide ampliamente estudiado con propiedades antiinflamatorias y antioxidantes demostradas en modelos *in vitro* e *in vivo*, el cual se encuentra presente en el extracto acuoso de hojas de *A. citriodora* con un tiempo de retención de 15.1 min y un porcentaje de área de 9.16, siendo este una de las moléculas más abundantes en este trabajo.

Un avance destacado es el desarrollo de formulaciones innovadoras como el hidrogel liposomal de kaempferol, que mejora significativamente su absorción dérmica y estabilidad, mostrando efectos clínicos notables en el tratamiento de eczema agudo, reduciendo inflamación, eritema y prurito (Fang et al., 2025). Además, en otros modelos animales, kaempferol ha demostrado su capacidad para inhibir mediadores proinflamatorios y superar la eficacia de antiinflamatorios clásicos como la dexametasona en algunos parámetros (Nwankwo et al., 2025). Por otro lado, el martinósido presente en el extracto acuoso con un tiempo de retención de 5.8 min y un porcentaje de área 2.37, es un feniletanoide menos estudiado pero relevante, ha sido identificado como un potente antioxidante y antiinflamatorio en plantas medicinales como *A. citriodora*. Estudios realizados por Abbas (2016) mostraron la capacidad del martinósido y el acetósido en la eliminación de radicales, obteniendo una actividad superior a la del dl- α -tocoferol como antioxidante natural. Sus valores de IC₅₀ fueron los siguientes: martinósido 3.6×10^{-4} M; acetósido 2.4×10^{-4} M; y dl- α -

tocoferol 4.8×10^{-4} M (Abbas, 2016). Aunque la literatura directa sobre ensayos clínicos específicos con martinósido es limitada, estudios fitoquímicos y bioensayos *in vitro* sugieren que esta molécula contribuye significativamente al perfil bioactivo de las plantas donde se encuentra, con actividad antioxidante comparable a otros compuestos fenólicos conocidos. Wu *et al.* (2020) comparó la actividad de feniletanoides glucósidos, donde el verbascósido mostró una actividad antiinflamatoria considerablemente mayor con un IC_{50} de 12.8 μ M, mientras que el martinósido presentó una actividad mucho menor, con un IC_{50} superior a 100.0 μ M. Esto indica que el verbascósido es significativamente más eficaz que el martinósido en la inhibición de la producción de óxido nítrico (NO) (Wu *et al.*, 2020). En un estudio realizado por Lu en el año 2025 demostró que eupatorin no afectó el crecimiento de macrófagos murinos de ratón (RAW 264.7), aunque sí redujo los niveles de NO, TNF- α e IL-6 en células estimuladas con lipopolisacárido (LPS). Además, en un modelo murino inducido con ovoalbúmina (OVA), la eupatorina disminuyó las citocinas Th2 y el número de células inflamatorias.

Tabla 16. Moléculas presentes en el extracto de hojas de cedrón.

Nombre	T/R (min)	Area %	M/Z+H	Molécula	Referencias
6-hidroxilada flavonas	0.4	1.25	239.96924	Flavonoide	(Skaltsa y Shammass, 1988)
Luteolina	16.7	0.84	287.31757	Flavonoide	(Skaltsa y Shammass, 1988)
Apigenina	9.9	0.34	271.22974	Flavonoide	(Skaltsa y Shammass, 1988)
Crisoeriol-7- diglucurónido	7	0.23	653.1425	Flavonoide	(Quirantes-Pine <i>et al.</i> , 2009)
Cirsiliol	8.4	2.5	331.19053	Flavonoide	(Skaltsa y Shammass, 1988)
Eupatorin	10.4	5.49	345.10065	Flavonoide	(Skaltsa y Shammass, 1988)
Salvigenin	5	3.86	329.16285	Flavonoide	(Skaltsa y Shammass, 1988)
Gardoside	10.9	3.60	375.1123	Glicósido	(Quirantes-Pine <i>et al.</i> , 2009)
Ixoside	3.9	1.98	389.221	Iridoid glicósido	(Quirantes-Pine <i>et al.</i> , 2009)

Martinósido	5.8	2.37	653.12	Feniletanoide	(Bahramsoltani <i>et al.</i> , 2018)
Verbascósido	6.0	9.10	625.13	Feniletanoide	(Marchetti <i>et al.</i> , 2019)
Theveside	22.2	2.82	391.28896	Glucósido iridoide	(Quirantes-Pine <i>et al.</i> , 2010)
Acacetin-7-	7.5	0.81	637.14524		(Quirantes-Pine <i>et al.</i> , 2010)
diglucurónido				Flavona glucuronida	
5,7-Dihydroxy-2'-	0.7	2.63	285.10418	Flavona	(Rashid <i>et al.</i> , 2022)
Methoxyflavone					
apigenin-7-	5.4	4.33	623.13023	Flavona glucuronida	(Cadenillas <i>et al.</i> , 2023)
diglucuronide					
Kaempferol	15.1	9.16	287.3176	Flavonol	(Gkalpinos <i>et al.</i> , 2023)
Ácido p-cumárico	2.5	1.50	165.0925	ácido hidroxicinámico	(Athanasiadis <i>et al.</i> , 2024)
Ácido ferúlico	1.3	0.84	195.12366	ácido hidroxicinámico	(Athanasiadis <i>et al.</i> , 2024)
Durantoside I	13.8	12.29	553.43078	Fenilpropanoide	(Leyva <i>et al.</i> , 2020)
				glicosilado	
Eukovoside	7.2	0.70	667.14519	Fenilpropanoide	(Leyva <i>et al.</i> , 2020)
				glicosilado	

En la figura 15 se muestra el cromatograma del extracto pulverizado sin material de pared, en el que se observa que se redujeron los picos detectados en el cromatograma, desapareciendo nuestra molécula de interés. Comparando los cromatogramas de las muestras, se observa que el material de pared le confiere una estabilidad al verbascósido, ya que se detectó el mismo pico del estándar de verbascósido presente tanto en las cápsulas como en el extracto acuoso. En la Tabla 17 al comparar los perfiles de compuestos en el extracto sin encapsular y las cápsulas obtenidas por spray dryer, se observó que la encapsulación con una matriz de maltodextrina y CMC favoreció la preservación de varias moléculas antioxidantes, aunque con diferencias en su eficiencia de retención. Este comportamiento puede explicarse por la capacidad de la combinación maltodextrina-CMC para formar una barrera física que protege a las moléculas sensibles frente a la degradación térmica y oxidativa durante el proceso de secado, lo cual ha sido ampliamente documentado por estudios que reportan eficiencias de encapsulación superiores al 90 % para sistemas similares (Amalia *et al.*, 2024; Mandura Jarić *et al.*, 2024; Soruco *et al.*, 2025).

Las diferencias en la retención de compuestos individuales también están asociadas a sus propiedades estructurales; por ejemplo, flavonoides de bajo peso molecular, como la luteolina, tienden a migrar más fácilmente hacia la superficie de las partículas durante la atomización, aumentando su susceptibilidad a la degradación, mientras que compuestos más grandes y glicosilados como el verbascósido presentan mayor afinidad con la matriz y mejor estabilidad. Este comportamiento ha sido reportado en extractos de *Cosmos caudatus* Kunth, donde los flavonoides encapsulados mostraron una liberación controlada y una mayor preservación de su actividad antioxidante cuando fueron protegidos con matrices adecuadas como goma arábica (Zahara *et al.*, 2024). Dependiendo de su polaridad (por ejemplo, si son moléculas lipofílicas o hidrofílicas), se pueden obtener ventajas frente a otros métodos de preservación (Huang *et al.*, 2025; Čulina *et al.*, 2025). Además, estudios recientes con extractos de boldo (*Peumus boldus* M.) han mostrado que compuestos como epigallocatequina y pirogalol presentan alta estabilidad y retención cuando son microencapsulados mediante spray drying con maltodextrina como agente de pared, lo que confirma la capacidad diferencial de las matrices polisacáridicas para proteger moléculas específicas en función de su tamaño, y conformación estructural (Polanco *et al.*, 2024).

Tabla 17. Caracterización de los compuestos presentes en el extracto de hojas de cedrón (*A. citriodora*) encapsulado y no encapsulado.

Molécula	T/R (min)	Peso molecular (g/mol)	Pico	Area %	M/z+H	Tipo de molécula	Muestra
6-hidroxylado	0.4	238.24	1	5.44	239.96	Flavonoide	Extracto sin encapsular
Flavonas							
Luteolina	0.8	286.24	3	2.07	287.98	Flavonoide	Extracto sin encapsular
Martinósido	12	652.64	6	1.20	653.14	Feniletanoide	Extracto sin encapsular
Eupatorin	10.4	344.32	7	0.02	345.10	Flavonoide	Extracto sin encapsular
Salvigenin	5.8	328.3	5	7.26	329.16	Flavonoide	Extracto sin encapsular

Kaempferol	15.1	286.23	10	25.13	287.31	Flavonoide	Extracto sin encapsular
Verbascósido	5	624.59	4	2.71	625.57	Phenylethanoide	Extracto sin encapsular
6-hidroxlado	2.8	238.24	4	0.86	239.16	Flavonoide	Cápsulas
Flavonas							
Verbascósido	6	624.59	12	6.52	625.34	Feniletanoide	Cápsulas
Cirsiliol	24.5	330.29	24	5.27	331.26	Flavonoide	Cápsulas
Eupatorin	4	344.32	6	2.46	345.24	Flavonoide	Cápsulas
Ixoside	4.4	388.32	7	3.17	389.27	Glicósido iridoide	Cápsulas
Martinósido	6.2	652.64	13	5.56	653.44	Feniletanoide	Cápsulas
Ácido ferúlico	2.1	194.18	3	0.72	195.13	Ácido hidroxicinámico	Cápsulas
Durantósido I	12.6	552.529	19	1.31	553.36	Fenilpropanoide glicosilado	Cápsulas

El durantósido I es un glucósido iridoide presente en plantas comunes de Tailandia, como *Duranta erecta*, *Duranta repens* L. y *Citharexylum spinosum* L. pertenecientes a la familia Verbenaceae. Los extractos de *C. spinosum* tienen propiedades antiulcerosas, antihipertensivas y hepatoprotectoras. Estudios realizado por Apisornopas en el año 2018, trabajo con durantósido I, el cual fue aislado de las flores y hojas secas de *Citharexylum spinosum* L. Su estructura molecular se modificó mediante reacciones químicas como sililación, acetilación y desaminación para obtener nuevos análogos de glucósidos iridoides, donde el compuesto 6 semisintético el cual presentó una acetilación del grupo hidroxilo del azúcar, mostró una mayor actividad citotóxica que el durantósido I en las líneas celulares MCF-7 y A549. Por lo que surge un interés ya que en el presente trabajo fue el durantósido I, una de las moléculas encontradas en el extracto acuoso de hojas de *A. citriodora* con un tiempo de retención de 12.6 min y un porcentaje de área de 1.31.

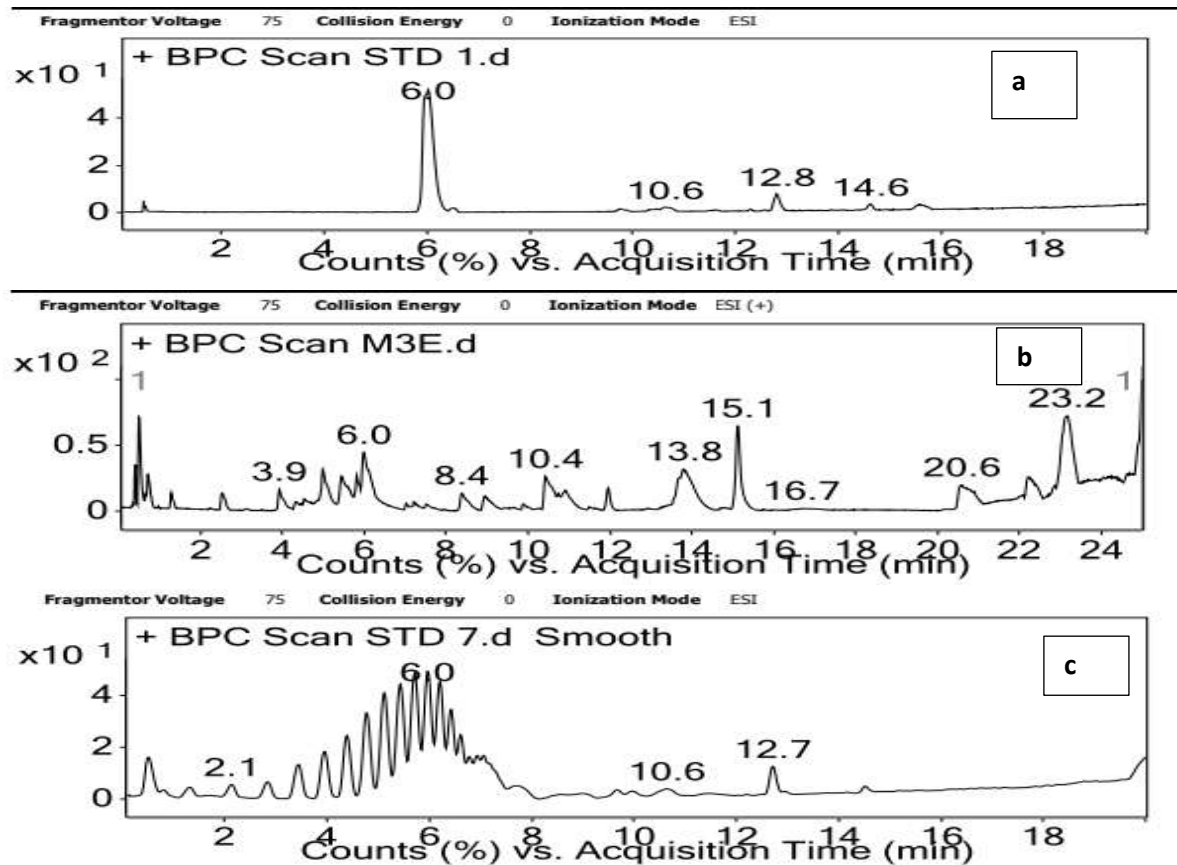


Figura 14. Cromatogramas a) verbascósido, b) extractó acuoso, c) cápsulas óptimas.

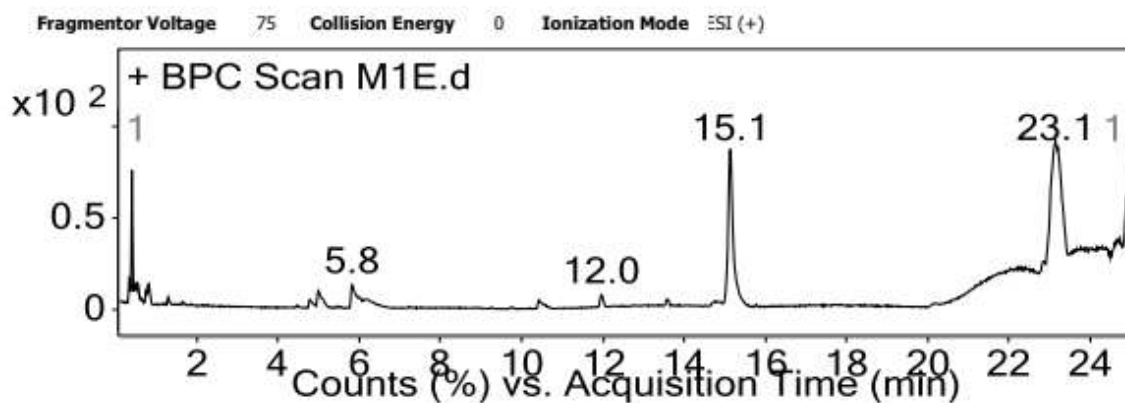


Figura 15. Cromatograma del extracto pulverizado.

8.5.4 Morfología y tamaño de partícula de las cápsulas en polvo

Se analizaron las micrográficas mostradas en la Figura 16, pertenecientes a las muestras de cápsulas etiquetadas con los números 5, 10 y 15 mostradas en la Tabla 18 y las cápsulas optimizadas. Se utilizó el programa Image J, donde se midió el tamaño de partícula para elaborar un histograma, con un número de $n = 100$ por cada micrografía. En la tabla 18 se observa que ninguna de las muestras tendió a tener una distribución normal debido a que en la prueba de confiabilidad de Shapiro–Wilk se obtuvieron valores de $p < 0.05$, lo cual indica que se rechaza la hipótesis nula (H_0), la al provenir los datos de una distribución normal. De acuerdo a los datos recabados en cada una de las micrográficas se observa que en la muestra óptima el 75 % de las cápsulas se encuentran por debajo de $2.59\ \mu\text{m}$, siendo contrastadas con la muestra 5 la cual en el mismo porcentaje tiene partículas por debajo de los $5.97\ \mu\text{m}$, recordando la composición de esta muestra por CMC y goma guar en la Tabla 18. La composición que tuvo de manera equitativa los tres materiales de pared obtuvo un similar tamaño de partículas comparado con la muestra óptima. En la Figura 16 se observan las cápsulas óptimas con una morfología uniforme y esférica. La composición mayoritaria es de maltodextrina, lo que puede contribuir a la formación de cápsulas uniformes. Las cápsulas número 5 tienen algunos tamaños más grandes y su composición incluye goma guar, lo cual puede estar relacionado con la mayor variabilidad en los tamaños de las cápsulas y una menor eficiencia de encapsulación, tal como se muestra en la Tabla 18. Las cápsulas 10 y 15 mostraron una mezcla de morfologías, con algunas cápsulas deformadas o más pequeñas, lo cual podría deberse a la combinación de maltodextrina con CMC o goma guar. Las morfologías presentes en las micrográficas son variables, predominando partículas sólidas esféricas, partículas pequeñas adheridas a una partícula más grande y partículas desintegradas. El ANOVA indica que la muestra que contiene goma guar y CMC es estadísticamente diferente que las otras correspondiente a un tamaño mayor de partícula.

Tabla 18. Tamaño de cápsulas.

Muestra	Shapiro-Wilk W test	Prob<W:	Tamaño de cápsula (µm)	Quartil 75 % (µm)	Composición de material de pared		
					Maltodextrina	CMC	Goma guar
Optima	0.740	< 0.0001	2.27± 2.07 ^b	2.59	99.68	70.93	0
5	0.823	< 0.0001	3.66 ± 3. 54 ^a	5.97	0	50	100
10	0.757	< 0.0001	2.68 ± 2.39 ^b	3.45	50	0	0
15	0.790	< 0.0001	2.18 ± 1.81 ^b	2.69	50	50	50

Letras diferentes (a, b, c, d, etc.) en la misma columna indican diferencias significativas a $p < 0.05$ (ANOVA, seguido de la prueba de Tukey). n=100.

Por lo tanto, algunas de las cápsulas formadas están a escala nanométrica, ya que los tamaños de las partículas formadas mediante nano-encapsulación en aerosol se clasifican como macro (>5 µm), micro (1 µm a 5 µm) y nano (<1 µm). Para la muestra óptima, el porcentaje de partículas que están en escala nanométrica oscila entre el 15 – 10 %. Según los resultados observados, el material más apropiado para llevar a cabo la nanoencapsulación del extracto acuoso fue maltodextrina y después CMC. Cilek *et al.* (2012) notificaron que la maltodextrina puede liberar fácilmente sus materiales encapsulados bajo condiciones similares a las del tracto digestivo. Tranquilino *et al.* (2020) reportaron una mejor eficiencia de la nanoencapsulación de compuestos fenólicos usando maltodextrina. Estudios de Saleh *et al.* (2022) mostraron la adición de aceite esencial de *A. citriodora* en niosomas. Estos son nuevos sistemas de preservación, similares a los mostrados por Saleh, o cápsulas como las utilizadas en este estudio, que tienen un potencial para su aplicación en la industria alimentaria, farmacéutica o de perfumería. Un tamaño de partícula pequeño asegura una mayor

superficie de contacto al momento de ser ingeridas. Sin embargo, el tamaño de estas partículas es un factor crítico que delinea su comportamiento y su capacidad para atravesar barreras biológicas como la hematoencefálica y la placentaria.

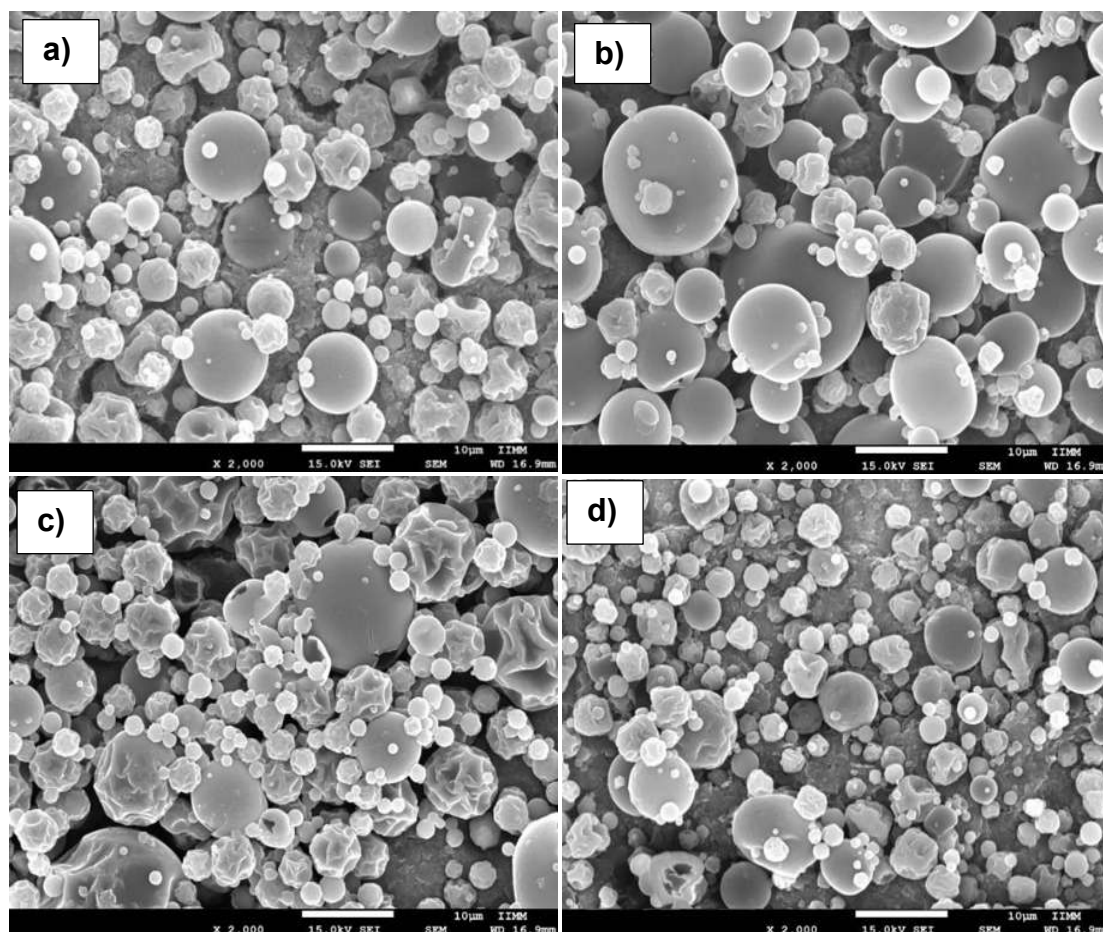


Figura 16. Micrografías de las diferentes cápsulas a) cápsulas optimas, b) cápsulas #5, c) cápsulas #10 d) cápsulas # 15.

Comparando las micrografías de la Figura 16 con la micrografía de la Figura 17 se observa que el material de pared le confiere al extracto una forma esférica, la cual esta disminuida en la micrografía correspondiente al extracto solo pulverizado y un tamaño de partícula más pequeño. En la micrografía del extracto pulverizado se observan una gran cantidad de partículas amorfas.

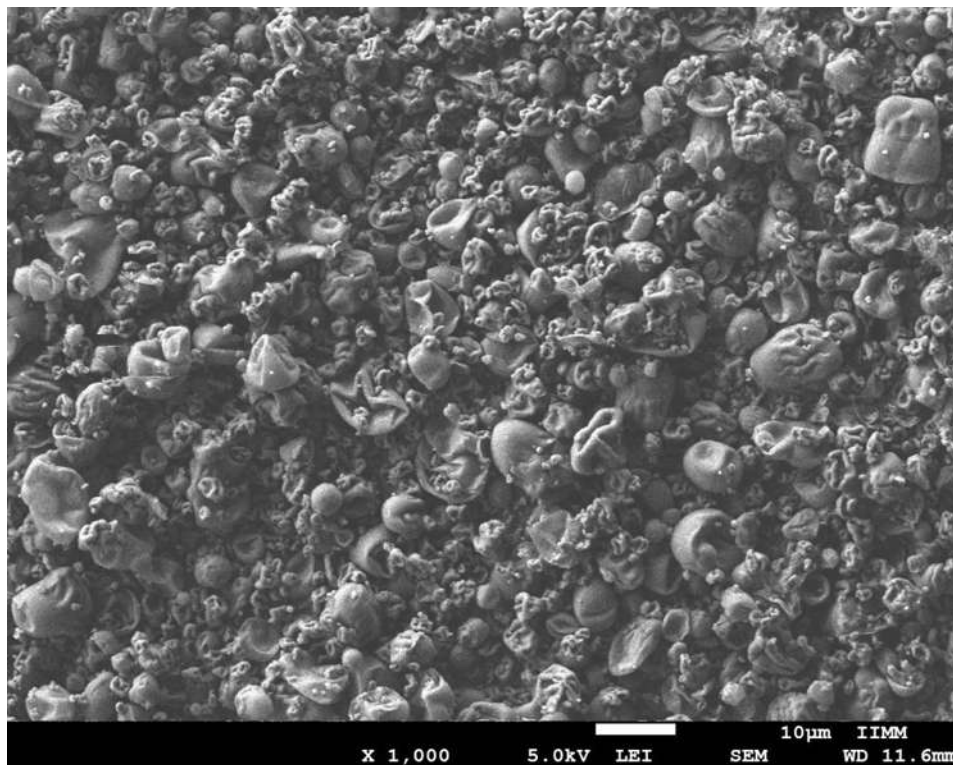


Figura 17. Micrografías del extracto óptimo pulverizado.

8.5.5 Espectrometría infrarroja del extracto acuoso pulverizado y las cápsulas óptimas

En las señales de transmitancia, mostradas en los FTIR de la Figura 18 se observó la posibilidad de poseer núcleo fenólico en las tres muestras, debido a la tensión que presentan en la región $1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ de grupos aromáticos, con presencia de una banda asociada a grupos hidroxilo. Si se compara el espectro obtenido del verbascósido coincide en el pico 1596 cm^{-1} . En los espectros de las cápsulas y el extracto pulverizado existe una mayor área de transmitancia en la combinación de material de pared y extracto, resaltando el pico de 1596 cm^{-1} asociado a anillos aromáticos, el cual se puede ver con mayor intensidad en las cápsulas que en el extracto, lo cual puede indicar que adquiere una resistencia al encapsularse con un material de pared y someterse al equipo de spray dryer.

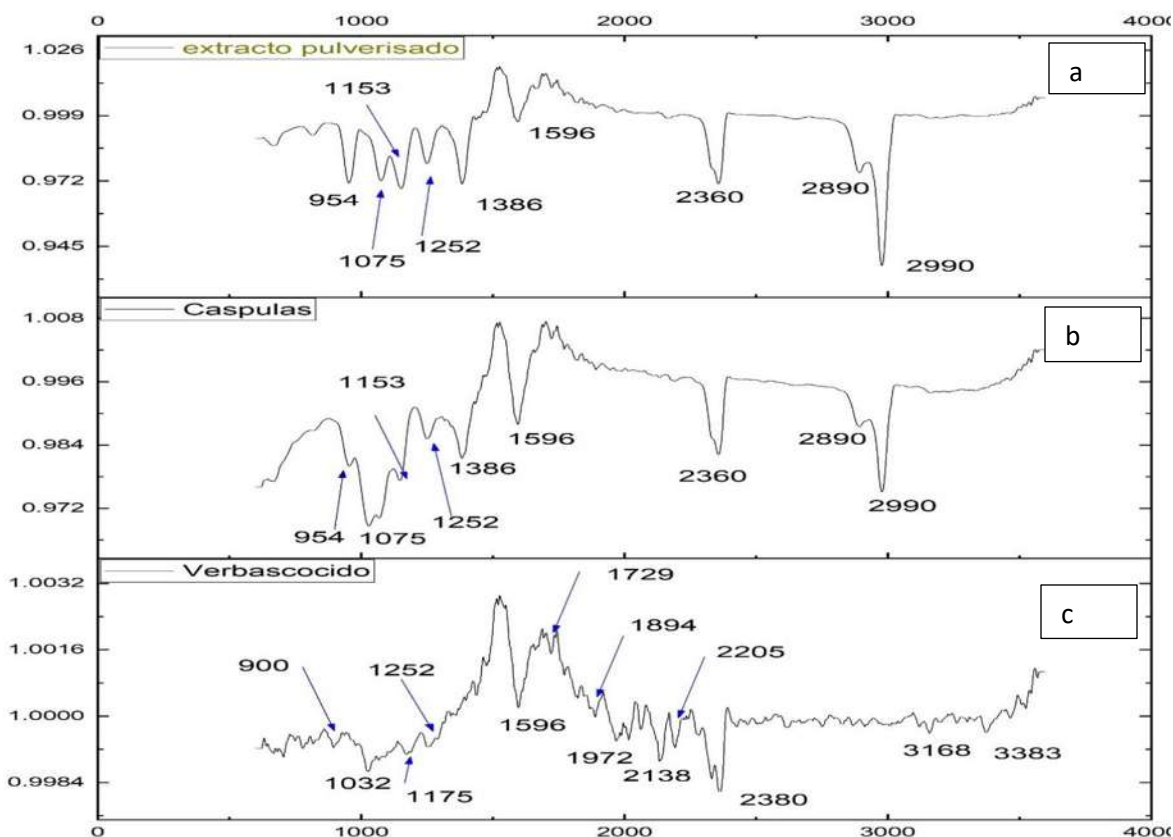


Figura 18. Espectros de FTIR a) extracto pulverizado, b) cápsulas óptimas, c) verbascósido.

Las bandas en 1386 cm^{-1} 1596 cm^{-1} pueden corresponder a las vibraciones de estiramiento de enlaces C-H y C=C de compuestos aromáticos, los cuales están presentes en las cápsulas y extracto pulverizado (Manimara *et al.*, 2018). Adicionalmente, coinciden en las siguientes bandas, 2360 cm^{-1} , 2890 cm^{-1} y 2990 cm^{-1} , estas bandas suelen asociarse con estiramientos C-H en grupos metilo y metileno, y en la región de 954 cm^{-1} , 1075 cm^{-1} , 1153 cm^{-1} , 1252 cm^{-1} , las cuales pueden estar asociadas con estiramientos C-O y vibraciones de deformación en varios grupos funcionales, como ésteres y éteres.

8.6 Conclusión del capítulo II

Las condiciones relación solvente/materia orgánica y la temperatura fueron factores que influyeron en la extracción de compuestos fenólicos, los cuales se vieron reflejados en su actividad para eliminar los radicales libres, siendo el extracto **“T3R3A2”** el cual posee todas las características para ser seleccionados como los mejores extractos para ser utilizado en estudios de actividad terapéutica y farmacológica en un sistema *in vivo*. Las microcápsulas de fenoles de cedrón descritas en este estudio representan un importante desarrollo en la formulación de nuevos fármacos, debido a sus numerosas propiedades benéficas descritas, en el cual se observa que el método de secado por aspersión en el equipo Nano spray dryer tiene una eficiencia de encapsulación de 65.29 - 94.93, donde el tratamiento “11” es el que tuvo mayor eficiencia de encapsulación, el cual está constituido solo por CMC. Al optimizar el rendimiento con la capacidad de inhibir el radical hidroxilo se encontró una relación casi de 1:2 en relación de CMC con maltodextrina, por lo cual se considera que agregar goma guar disminuye la capacidad de eliminar radical y al momento de recolectar la muestra esta tiende a no poder recuperarse y quedar pegada en el equipo nano spray dryer. El disminuir el tamaño de partícula aumenta la permeabilidad y el área de contacto para que estas moléculas bioactivas puedan llegar a su sitio de acción. Además, la microencapsulación puede convertir líquidos en polvos, que son fáciles de manipular. Siendo estos los principales factores para el uso de secado por aspersión para la preservación de compuestos antioxidantes.

8.7 Referencias segundo capítulo

- Abbas, F.A.A.** (2016). Phenylpropanoid and phenylethanoid glycosides from *Scrophularia xanthoglossa* and their antioxidative and antiinflammatory activities. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 7(1), 57-64.
- Afrasiabian, F., Mirabzadeh Ardakani, M., Rahmani, K., Azadi, N.A., Alemohammad, Z.B., Bidaki, R., Hashempur, M.H.** (2018). *Aloysia citriodora* Palau (lemon verbena) for insomnia patients: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of efficacy and safety. *Phytotherapy Research*, 33(2), 350-359.
- Al-Qaraleh, S., Tarawneh, K.A.** (2016). Antioxidant Activity of Methanolic Extracts of *Aloysia triphylla*, *Ceratonia siliqua*, *Cupressus sempervirens* and *Punica granatum* Selected from Karak Region-Jordan American. *Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*.16(3):479–486.
- Alvarez Cortes, O.** (2020) Elaboración de una Biopelícula Comestible Incorporando Nanocápsulas de Aceite Esencial y Extractos Polifenólicos de *Aloysia citriodora* con Actividad Antiinflamatoria Evaluado en un Modelo Biológico. Master's Thesis, Facultad de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, México.
- Amalia, R., Yulianto, M.E., Agustina, A.** (2024). Optimization of Spray Drying Process Parameter Condition for Theaflavin Extract from Black Tea (*Camellia sinensis*) Using Response Surface Methodology (RSM). *Indonesian Food Science and Technology Journal*, 8(1), 138–148.
- Apisornopas, J., Silalai, P., Kasemsuk, T., Athipornchai, A., Sirion, U., Suksen, K., Saeeng, R.** (2018). Synthetic analogues of durantoside I from *Citharexylum spinosum* L. and their cytotoxic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 28(9), 1558–1561.
- Athanasiadis, V., Chatzimitakos, T., Makrygiannis, I., Kalompatsios, D., Bozinou, E., Lalas, S.I.** (2024). Antioxidant-Rich Extracts from Lemon Verbena (*Aloysia citrodora* L.) Leaves through Response Surface Methodology. *Oxygen*, 4(1), 1-19.

Azimi, H., Fallah-Tafti, M., Khakshur, A.A., Abdollahi, M.A. (2012). A review of phytotherapy of acne vulgaris: perspective of new pharmacological treatments. *Fitoterapia*, 83: 1306–1317.

Bahramsoltani, R., Rostamiasrabadi, P., Shahpiri, Z., Marques, A.M., Rahimi, R., Farzaei, M.H. (2018). *Aloysia citrodora* Paláu (Lemon verbena): A review of phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 222, 34–51.

Cadenillas, L. F., Hernandez, C., Bailly, S., Billerach, G., Durrieu, V., Bailly, J.D. (2023). Role of Polyphenols from the Aqueous Extract of *Aloysia citrodora* in the Inhibition of Aflatoxin B1 Synthesis in *Aspergillus flavus*. *Molecules*, 28(13), 5123.

Camarena, T.J.C., Martínez, M.H.E., Garnica, R.M., Padilla, R.J.S., Saavedra, M.A., Alvarez, C.O., Bartolome-Camacho, M.C., Rodiles, L.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(3), 34.

Cilek, B., Luca, A., Hasirci, V., Sahin, S., Sumnu, G. (2012). Microencapsulation of phenolic compounds extracted from sour cherry pomace: effect of formulation, ultrasonication time and core to coating ratio. *European Food Research and Technology*, 235, 587-596.

Čulina, P., Balbino, S., Čepo, D. V., Golub, N., Elez Garofulić, I., Dragović-Uzelac, V., You, L., Pedišić, S. (2025). Stability of Fatty Acids, Tocopherols, and Carotenoids of Sea Buckthorn Oil Encapsulated by Spray Drying Using Different Carrier Materials. *Applied Sciences*, 15(3), 1194.

Dewan, N., Dasgupta, D., Pandit, S., Ahmed, P. (2016). Review on-Herbosomes, A new arena for drug delivery. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(4), 104.

Ding, S., Khan, A. I., Cai, X., Song, Y., Lyu, Z., Du, D., ... Lin, Y. (2020). Overcoming blood–brain barrier transport: Advances in nanoparticle-based drug delivery strategies. *Materials Today*, 37, 112-125.

Drago-Serrano, M.E., López-López, M., Sainz-Espuñes. (2006). Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, (37):58-68.

Ersus, S., Yurdagel, U. (2007). Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering*. 80, 805–812.

- Fang, Y., Liu, Y., Cao, K., Wang, S., Wang, L., Sun, B., Zhang, Y., Zhang, Q., Xia, H.** (2025). Investigation of the Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant Activities of a Novel Kaempferol-Liposome-Loaded Hydrogel for the Treatment of Acute Eczema. *Gels*, 11(2), 83.
- Gkalpinos, V. K., Anagnostou, V. A., Mitropoulou, G., Kompoura, V., Karapantzou, I., Fasoulis, C.K., Tzakos, A.G.** (2023). *Aloysia citrodora* Extracts Cultivated in Greece as Antioxidants and Potent Regulators of Food Microbiota. *Applied Sciences*, 13(6), 3663.
- Huang, Q., Mills, T., Zhang, Z.** (2025). The effect of core oil on the encapsulation efficiency and mechanical properties of microcapsules prepared using complex coacervation followed by spray drying/coating. *International Journal of Food Science and Technology*, 60(1).
- Köroğlu, A., Altanlar, N., Kendir, G., Şimşek, D.** (2015). Piyasada satışa sunulan *Aloysia citriodora* Palau örneklerinin antioksidan kapasite ve mikrobiyolojik kontaminasyon yönünden incelenmesi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 45(3), 136-144.
- Leyva-Jiménez, F.J., Lozano-Sánchez, J., Cadiz-Gurrea, M.D.L.L., Fernández-Ochoa, Á., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A.** (2020). Spray-drying microencapsulation of bioactive compounds from lemon verbena green extract. *Foods*, 9(11), 1547.
- Li, Y., Yu, H., Jin, Y., Li, M., Qu, C.** (2018). Verbascoside alleviates atopic dermatitislike symptoms in mice via its potent anti-inflammatory effect. *International Archives of Allergy and Immunology*, 175(4):220-230.
- Lu, J., Alarifi, S., Ahamed, A., Wang, R.** (2025). Eupatorin Mitigates Airway Inflammation in Ovalbumin-Induced Allergic Asthma in Mice by Regulating Th2 Cytokines and Oxidative Stress. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 39(4), e70219.
- Mandura Jarić, A., Haramustek, L., Nižić Nodilo, L., Vrsaljko, D., Petrović, P., Kuzmić, S., Komes, D.** (2024). A Novel Approach to Serving Plant-Based Confectionery—The Employment of Spray Drying in the Production of Carboxymethyl

Cellulose-Based Delivery Systems Enriched with *Teucrium montanum* L. Extract. *Foods*, 13(3), 372.

Manimaran, S., SambathKumar, K., Gayathri, R., Raja, K., Rajkamal, N., Venkatachalapathy, M., Lourdu EdisonRaj, C. (2018). Medicinal plant using ground state stabilization of natural antioxidant curcumin by keto-enol tautomerisation. *Natural products and bioprospecting*, 8, 369-390.

Marchetti, L., Pellati, F., Graziosi, R., Brighenti, V., Pinetti, D., Bertelli, D. (2019). Identification and determination of bioactive phenylpropanoid glycosides of *Aloysia polystachya* (Griseb. et Moldenke) by HPLC-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 166, 364-370.

Moeina, M., Zarshenasc, M. M., Etemadfarda, H. (2014) essential oil composition and total flavonoid content of *Aloysia citriodora* palau under different cultivation systems. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, (4), 353-358.

Nwankwo, V.E., Muoegbunam, J., Abba, C., Okoye, F.B.C., Ugwu, C.C., Ngwoke, K.G. (2025). Preliminary Metabolomics and Determination of a Potent Anti-inflammatory Fraction of Freshwater Brown Algae. *Asian Plant Research Journal*, 13(1), 56–68.

Pereira, E., Barros, L., Antonio, A. L., Cabo Verde, S., Santos, B.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.

Polanco, V., Cerdá-Bernad, D., Quispe-Fuentes, I., Bernal, C., López, J. (2024). Bioactive Content and Antioxidant Properties of Spray-Dried Microencapsulates of *Peumus boldus* M. Leaf Extracts. *Antioxidants*, 13(12), 1568.

Quirantes-Pine, R., Funes, L., MicoL, V., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. (2009). Highperformance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a lemon verbena extract. *Journal of Chromatography A*, 1216, 5391-5397.

- Rashid, H.M., Mahmod, A.I., Afifi, F.U., Talib, W.H.** (2022). Antioxidant and Antiproliferation Activities of Lemon Verbena (*Aloysia citrodora*): An in vitro and in vivo study. *Plants*, 11(6), 785.
- Rita, I., Pereira, C., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R.** (2018). Exploring reserve lots of *Cymbopogon citratus*, *Aloysia citrodora* and *Thymus × citriodorus* as improved sources of phenolic compounds. *Food Chemistry*, 257, 83–89.
- Robert, P., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J., Saenz, C.** (2010). Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(7), 1386-1394.
- Saénz, C., Tapia, S., Chávez, J., Robert, P.** (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, 114, 616–622
- Saleh, A., Pirouzifard, M., Almasi, H.** (2022). Optimization and Characterization of *Lippia citriodora* Essential Oil Loaded Niosomes: A Novel Plant-based Food Nano Preservative. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 650, 129480.
- Sharma, T., Y Kanwar, S.S.** (2018). Phytomolecules for obesity and body weight management. *Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 1(1), 1-8.
- Shen, C., Ma, F., Gao, S., Zhou, J., Huang, D., Huang, R., Li, H., Tang, B.** (2025). Concentration-Dependent Bioactivity Profiles of Hesperetin and Naringenin: Insights into Antibacterial, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Effects. *ACS Food Science & Technology*, 5(2), 492-501
- Sheng, G.Q., Zhang, J.R., Pu, X.P., Ma, J., Li, C.L.** (2002). Protective effect of verbascoside on 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity in PC12 cells. *European journal of Pharmacology*, 451(2), 119-124.
- Skaltsa, H., Shammias, G.** (1988). Flavonoids from *Lippia citriodora*. *Planta Medica*, 54(05), 465–465.
- Smirnoff, N., Cumbes, Q.J.** (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28(4), 1057-1060.

- Soruco, J., Burgos, L., Guzmán-Maldonado, S.H.** (2025). Microcapsules of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) extracts obtained by spray dryer. *Latin American Applied Research*, 55(1), 65–74.
- Sun, X., Qi, H., Wu, H., Qu, Y., Wang, K.** (2020). Anti-pruritic and anti-inflammatory effects of natural verbascoside through selective inhibition of temperature-sensitive Ca²⁺-permeable TRPV3 channel. *Journal of Dermatological Science*, 97(3), 229-231.
- Taga, M.S., Miller, E.E., Pratt, D.E.** (1984). Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 61(5):928–931.
- Tranquilino-Rodríguez, E., Martínez-Flores, H.E., Rodiles-López, J.O., Avila, G. C.** (2020). Nanoencapsulation and identification of phenolic compounds by UPLC-Q/TOF-MS of an antioxidant extract from *Opuntia atropes*. *Functional Foods in Health & Disease*, 10(12).
- Valencia, A., E., García, P.M.E., Garnica, R.M.G., Figueroa, C.J.D.D., Meléndez, H.E., Salgado, G.R., Martínez, F.H.E.** (2018). Antioxidant properties of polyphenolic extracts from *Quercus laurina*, *Quercus crassifolia*, and *Quercus scytophylla* bark. *Antioxidants*, 7(7), 81.
- 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 Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(4):308-311.
- Wu, L., Georgiev, M.I., Cao, H., Nahar, L., El-Seedi, H. R., Sarker, S.D., Lu, B.** (2020). Therapeutic potential of phenylethanoid glycosides: A systematic review. *Medicinal Research Reviews*, 40(6), 2605-2649.
- Zahara, I. A., Sutrisno, S., Ulfa, S. M., Safitri, A.** (2024). Microencapsulation by Spray drying of *Cosmos caudatus* Kunth. Extracts Using Gum Arabic: Influencing Factors and Controlled Release. *Indonesian Food Science and Technology Journal*, 8(1), 27–35.

9. Capítulo 3: Actividad antiinflamatoria y antiartrítica evaluada en un modelo in vivo.

9.1 Resumen

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria autoinmune, poliarticular y simétrica, que afecta principalmente el tejido sinovial. Su etiología es multifactorial e involucra factores genéticos entre ellos HLA-DR4, Traf1 y Stat4 así como desencadenantes ambientales. La persistencia de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-1, IL-23, TNF- α y especies reactivas de oxígeno (ERO) contribuye al daño articular progresivo, la destrucción ósea y la formación del pannus. El diagnóstico temprano y el inicio oportuno del tratamiento son esenciales, empleando principalmente FARME convencionales, como metotrexato (MTX), y biológicos, como inhibidores de TNF- α e IL-6. Dado que los tratamientos disponibles no siempre ofrecen una respuesta completa y pueden causar efectos adversos, existe un creciente interés en alternativas naturales. *A. citriodora* (cedrón) es una planta rica en metabolitos fenólicos, especialmente verbascósido, con propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y moduladoras de la actividad osteoclástica y osteoblástica. Estudios previos han demostrado su capacidad para inhibir enzimas proinflamatorias como iNOS y ciclooxigenasa-2 (COX-2), disminuir la producción de ERO e incluso regular canales iónicos relacionados con inflamación. En el modelo experimental evaluado, las cápsulas de extracto de *A. citriodora* administradas a una dosis de 400 mg/kg/día demostraron una marcada actividad antiartrítica y antiinflamatoria en ratas con artritis inducida por colágeno tipo II y adyuvante incompleto de Freund. Esta dosis retrasó la aparición de los signos clínicos durante los primeros siete días, mejoró la actividad motora y disminuyó significativamente las alteraciones histopatológicas típicas de la AR, incluyendo infiltrado inflamatorio y degeneración del cartílago en la articulación femorotibial. Además, se preservó la estructura esplénica normal, lo que sugiere un adecuado control de la inflamación sistémica. En el riñón, los daños observados correspondieron al efecto de la inmunización con colágeno y no a los tratamientos, ya que ni el extracto ni el MTX ocasionaron lesiones renales adicionales, reforzando así su perfil de seguridad. En contraste, la dosis de 200 mg/kg/día no generó un efecto

terapéutico evidente. Notablemente, el tratamiento con 400 mg/kg/día mostró una eficacia superior incluso al MTX, destacando su potencial como estrategia terapéutica natural contra la artritis. Estos hallazgos sugieren que los compuestos bioactivos presentes en el extracto como verbascósido, martinósido, luteolina y kaempferol podrían actuar de forma individual o sinérgica para modular la inflamación y el daño articular. Se recomienda dar continuidad a estudios preclínicos y clínicos que validen su eficacia y seguridad, explorando además los mecanismos moleculares involucrados.

Palabras clave: Adyuvante; Metotrexato; Inflamación crónica; verbascósido; kaempferol.

9.2 Abstract

The autoimmune inflammatory disease rheumatoid arthritis (RA) is a symmetric, polyarticular condition that primarily affects synovial tissue. Its etiology is multifactorial and involves genetic factors among them HLA-DR4, Traf1, and Stat4 as well as environmental triggers. Persistent production of pro-inflammatory cytokines such as IL-6, IL-1, IL-23, TNF- α , and reactive oxygen species (ROS) contributes to progressive joint damage, bone destruction, and pannus formation. Early diagnosis and timely initiation of treatment are essential, mainly using conventional DMARDs, such as methotrexate (MTX), and biological agents, including TNF- α and IL-6 inhibitors. Given that current treatments do not always provide complete remission and may cause adverse effects, there is growing interest in natural therapeutic alternatives. *A. citriodora* (cedrón) is a plant rich in phenolic metabolites particularly verbascoside with anti-inflammatory, antioxidant, and osteomodulatory properties. Previous studies have demonstrated its ability to inhibit pro-inflammatory enzymes (iNOS, COX-2), reduce ROS production, and modulate ion channels related to inflammation. In the experimental model evaluated, capsules containing *A. citriodora* extract administered at a dose of 400 mg/kg/day exhibited marked anti-arthritis and anti-inflammatory activity in rats with collagen type II and incomplete Freund's adjuvant-induced arthritis. This dose delayed the onset of clinical signs during the first seven days, improved motor activity, and significantly reduced histopathological alterations typical of RA, including inflammatory infiltrate and cartilage degeneration in the femorotibial joint. In addition, preservation of normal splenic architecture suggested adequate control of systemic inflammation. Regarding the kidney, the observed glomerular and tubular damage corresponded to the effect of collagen immunization rather than the treatments, since neither the extract nor MTX caused additional renal injury, supporting their safety profile. In contrast, the 200 mg/kg/day dose did not produce an evident therapeutic effect. Notably, the 400 mg/kg/day treatment demonstrated superior efficacy even compared to MTX, highlighting its potential as a natural therapeutic strategy against arthritis. These findings suggest that the bioactive compounds present in the extract such as verbascoside, martinosiol, luteolin, and kaempferol may act individually or synergistically to modulate inflammation and joint damage. Further

preclinical and clinical studies are recommended to validate and strengthen these results, while also exploring the underlying molecular mechanisms.

Keywords: Adjuvant; Methotrexate; Chronic inflammation; verbascoside; kaempferol.

9.3 Introducción

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad poliarticular simétrica, clasificada como conectivopatía, ya que afecta el tejido sinovial de las articulaciones. Aunque la inflamación articular es característica de la AR, también puede ser causada por otras patologías, como la artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, o el lupus eritematoso sistémico (McGonagle *et al.*, 1998; Firestein, 2003). La AR afecta aproximadamente al 0.2 al 2 % de los adultos y es casi tres veces más frecuente en mujeres que en hombres. La etiología de la AR es multifactorial y aún no completamente comprendida, entre las causas principales se incluyen factores genéticos y ambientales, el alelo HLA-DR4 es uno de los genes más asociados a la enfermedad, aunque no es el único. Otros genes, como Traf1 y Stat4, también incrementan el riesgo de desarrollar AR (Holoshitz, 2010; Mohannad *et al.*, 2016; Anderson *et al.*, 2021). La AR causa un desequilibrio entre el crecimiento y la resorción ósea, donde se ven afectados osteocitos, osteoclastos, y osteoblastos (Akyer *et al.*, 2023). En los tejidos afectados se identifican mediadores inflamatorios, como interleucinas IL-6, IL-1 e IL-23, el TNF- α , y ERO, que son cruciales en la inflamación y en el daño articular característicos de la AR (Barik y Bhatt, 2021; Ahsan *et al.*, 2023). La AR es lentamente progresiva con evolución a daño articular, se caracteriza por afectación simétrica de pequeñas articulaciones de manos y pies, posteriormente avanza a grandes articulaciones. La “American College of Rheumatology y European League Against Rheumatism” (EULAR) ha establecido criterios de clasificación para la AR para poder diferenciar de otras enfermedades reumáticas, que incluyen el interrogatorio clínico, la exploración física, estudios de laboratorio, pruebas de imagen como radiografías, y la detección de autoanticuerpos, como el anti-CCP y el FR (Aletaha *et al.*, 2023). El manejo de AR comienza con un diagnóstico temprano y el inicio oportuno de la terapia. Esta se basa en el uso de FARME, AINE y corticoides. Los FARME se clasifican en convencionales y biológicos, los convencionales son los más usados por su costo accesible, siendo el metotrexato (MTX) el tratamiento de primera línea. En ocasiones, se combina con otros FARME como la hidroxicloroquina o la sulfasalazina.

En un estudio observacional transversal realizado por Kabara y Mohan (2020), a 117 pacientes diagnosticados con AR tratados con MTX o cambiando con otro

FARME, se observó que 47 % de los pacientes reportaron efectos secundarios, siendo más comunes, fatiga (17 %), náuseas (16 %), úlceras orales (10 %). Los autores consideran seguro el tratamiento con metotrexato, aunque requiere monitoreo constante (Kabara y Mohan, 2020). MTX se elimina por vía renal, con excreción y reabsorción tubular. Las dosis altas ($\geq 500 \text{ mg/m}^2$) pueden ser más efectivas, no obstante, aumentan el riesgo de nefrotoxicidad y hepatotoxicidad, y también puede ocurrir supresión medular y daño pulmonar. Criterios de exclusión para el uso de MTX son la hepatitis, la disfunción renal y la hiperglucemia (Bottomley y Goodfield, 1995; Hamed *et al.*, 2022). Por otro lado, los FARME biológicos son más selectivos en su mecanismo de acción y son más costosos. Algunos ejemplos incluyen el infliximab, un anticuerpo dirigido contra el TNF- α , y el tocilizumab, que bloquea el receptor de IL-6. La combinación de un inhibidor de TNF- α con MTX, ha demostrado ofrecer mejores resultados en el control de la enfermedad (Saag *et al.*, 2008; Bullock *et al.*, 2019). En AR el tejido sinovial prolifera de manera descontrolada, causando distensión de tendones y ligamentos, así como destrucción ósea. Una característica clínica relevante en AR es la presencia del pannus, la cual se trata de un tejido inflamatorio anormal que crece dentro de la articulación y actúa de forma agresiva, invadiendo cartílago y hueso, lo que provoca daño articular irreversible; su desarrollo ocurre principalmente cuando la enfermedad no se trata a tiempo o el tratamiento no es efectivo (Papadogianni y Lambrou, 2023). Esto lleva a deformidades y discapacidad progresiva lo que ocasiona problemas laborales y afectaciones psicológicas. Sánchez *et al.* (2022) reportaron en México un estudio transversal en pacientes con AR observando que los pacientes con la enfermedad presentaron puntuaciones más altas de depresión en comparación con los pacientes en remisión, destacando una relación entre los síntomas depresivos, factores sociales, percepción de la enfermedad y la sinovitis en ecografía.

Ante la falta de una solución completamente satisfactoria con los medicamentos disponibles, algunos pacientes recurren a alternativas medicinales, incluyendo el uso de plantas medicinales, cuyo interés ha ido en aumento (Shalini *et al.*, 2023). *A. citriodora* ha sido estudiada en diversos países para conocer su composición en metabolitos secundarios y las diferentes propiedades que ejercen en los sistemas

biológicos. La infusión de las hojas es usada en México y en países sudamericanos para calmar dolores, afecciones nerviosas y gastrointestinales, como son, cólicos, diarrea, indigestión, flatulencias, náuseas, vómito, inflamaciones, úlceras y dolores menstruales (Maia *et al.*, 2011; El-Hawary *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2015; García *et al.*, 2018). Las hojas de *A. citriodora* son abundantes en compuestos fenólicos cuyo componente principal es el verbascósido, al cual se le atribuye actividad antiinflamatoria y además contiene luteolina 7-O-diglucurónico, ácido p-cumárico, feniletanoide, eucovósido, y martinósido (Pereira *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2020). El verbascósido ejerce efectos antioxidantes mediante la eliminación ERO a corto plazo, previniendo reacciones iniciales que generan daño oxidativo; a largo plazo interactúa a nivel de genes que codifican enzimas prooxidantes, reduciendo la producción de ERO (Alipieva *et al.*, 2014). Akyer *et al.* (2023) trabajo con células MLO-Y4 derivadas de los osteocitos murinos, y menciona que el verbascósido puede regular positivamente la osteogénesis *in vitro* y prevenir la resorción ósea inducida por la inflamación. Por otro lado, Sun (2020) demostró que feniletanoide verbascósido inhibe específicamente el canal TRPV3, aliviando el prurito y la inflamación. López (2007) mostró inhibición de la expresión de las enzimas iNOS y COX-2 en la línea celular de macrófagos murinos Raw 264.7, usando los flavonoides luteolina y diosmetina. Dichas enzimas participan en la síntesis de las prostaglandinas (PG), a través de la oxidación del ácido araquidónico. Las PG realizan tanto funciones relacionadas con la homeostasis de diversos órganos como con el dolor, la inflamación y el desarrollo de neoplasias. La enzima COX-2 aparece rápidamente tras la exposición de la célula a agentes como lipopolisacáridos o citocinas proinflamatorias como la IL-2 y IL-6; siendo estas moléculas un grupo de proteínas y glucoproteínas producidas por diversos tipos celulares que actúan esencialmente como reguladores de las respuestas inmune e inflamatoria (Crofford *et al.*, 1994; Filella *et al.*, 2002). El-Hawary *et al.* (2012), realizaron pruebas de edema subplantar con λ -carragenina en ratones albinos macho, encontrando una actividad antiinflamatoria similar al utilizar indometacina, el cual es un fármaco indicado en el tratamiento de la osteoartritis y en AR, así como de los extractos acuosos/metanólicos de *L. Citriodora*, probados en su estudio. En una investigación de Buchwald *et al.* (2018) mostró que la ingesta de 400

mg/día de extracto *A. citriodora* (Recoverben®) redujo significativamente la pérdida de fuerza muscular en adultos sanos moderadamente activos.

9.4 Materiales y métodos

9.4.1 Inhibición de los ensayos de desnaturalización de proteínas

En el ensayo de desnaturalización de albúmina de huevo (AH), se utilizó una mezcla de reacción de 6.8 mL que contenía 2 mL de AH (Haycel) a una concentración de 4.5 mg/ml; solución salina tamponada con fosfato 2,8 mL (PBS) de pH 6,4; y 2 mL de extracto óptimo (20 mg/mL), y cápsulas óptimas (50 mg/mL), mientras que los mismos volúmenes de solución de diclofenaco sódico (5mg/ml) y agua destilada se utilizaron como soluciones estándar y de control, respectivamente, en lugar de soluciones de extracto y cápsulas. Posteriormente, estas mezclas se incubaron durante 15 min a 37 ± 2 °C. Más tarde, se calentaron durante 5 min a 70 °C. La absorbancia de la mezcla se midió a 660 nm (Khtar et al.2021).

9.4.2 Determinación de la actividad antiinflamatoria

Se utilizaron 30 ratas macho Wistar, con un peso de entre 200-250 g, las cuales se obtuvieron del bioterio del Centro de Biociencias de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Los roedores se manejaron de acuerdo a los estándares que maneja la NOM-062-ZOO-1999, los animales estuvieron en el bioterio de la Facultad de Químico-Farmacobiología de la UMSNH, en cajas de acrílico de 6 mm de espesor con dimensiones de 32 X 47 X 20 cm, con rejillas de acero para permitir la ventilación. La temperatura y la humedad fueron controladas a $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ y humedad 30-70%, con ciclo de luz artificial de 12 h, el alimento fue *Ad libitum*. Las ratas se dividieron en cinco grupos, en los cuales se suministraron vía oral canular, el extracto óptimo a 50 mg/kg (G5), las cápsulas óptimas del extracto acuoso a 200 mg/kg (G3) y 400 mg/kg (G4), como control positivo se utilizó indometacina 5 mg/kg (G2), como control negativo se suministró a un grupo solo agua (G1) (El-Hawary et al., 2012; Rojas et al., 2015). Se usó el método del edema subplantar 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 λ -carragenina al 1 % en SSN, en la superficie plantar izquierda de cada grupo de ratas Wistar y la superficie derecha, utilizada como control, recibió el vehículo. La medición de la inflamación se realizó mediante el uso de un micrómetro digital durante un periodo de 9 h; cada hora se realizó la medición del edema. Posteriormente, se midió a las 24, 48 y 72 h después de la inducción del edema (Winter et al., 1962; Brand et al., 2002; Winyard y Willoughby, 2003). El porcentaje de inhibición del edema se calculó utilizando la siguiente formula:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{(D_{cpv} - D_{tpv})}{D_{cpv}} \right) * 100$$

Donde:

D_{cpv}: incremento del volumen de la pata en animales control.

D_{tpv}: incremento del volumen de la pata en animales tratados con el extracto

9.4.3 Determinación de la actividad antiartrítica

La actividad antiartrítica se evaluó con el método descrito por Winyard y Willoughby (2003) en el que se disolvió colágeno tipo II bovino grado inmunitario (CHONDREX) por 12 h a 4 mg/mL en 0.01 M ácido acético en un mezclador a 4 °C. Se completó con un volumen similar del adyuvante incompleto de Freund (CHONDREX). Para el modelo se usaron 30 ratas macho Wistar de 5 meses de edad y peso aproximado entre 270 a 300 g. Los roedores se manejaron de acuerdo a los estándares que maneja la NOM-062-ZOO-1999, los animales estuvieron en el bioterio de la Facultad de Químico-Farmacobiología de la UMSNH, en cajas de acrílico de 6 mm de espesor con dimensiones de 32 X 47 X 20 cm, con rejillas de acero para permitir la ventilación. La temperatura y la humedad fueron controladas a 22°C $\pm$ 3°C y humedad 30-70%, con ciclo de luz artificial de 12 h, el alimento fue *Ad libitum*. Los síntomas de la artritis

se desarrollaron aproximadamente 14 días después de la sensibilización. Las ratas se dividieron en 5 grupos, a los cuales se les suministraron los tratamientos diariamente vía oral durante 28 días. Finalmente, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital vía peritoneal a una dosis de 30mg/kg. Se aplicaron dos inyecciones intradérmicas de 100 μ L, separadas 1.5 cm, en la base de la cola. Los resultados del estudio se muestran en la Tabla 19.

Este modelo reproduce diversas características clínicas y patológicas de la AR humana, como edema, anquilosis y erosiones articulares, que se observan en la artritis inducida mediante colágeno tipo II y el adyuvante de Freund.

Tabla 19. Plan de Tratamiento.

Grupo	Tratamiento
α	Grupo con AR + cápsulas del extracto acuoso a 200 mg/kg/día
β	Grupo con AR + cápsulas del extracto acuoso a 400 mg/kg/día
δ	Grupo control sin Artritis
γ	Grupo con AR + MTX a 1 mg/kg/día
ε	Con AR + H ₂ O

Al realizarse las cápsulas a una relación 1: 1 (extracto y material de pared).

* Corresponde a 100 mg de extracto y 100 mg de material de pared).

** Corresponde a 200 mg de extracto y 200 mg de material de pared).

9.4.4 Puntuación de artritis

Dos pares a ciegas evaluaron la gravedad de la artritis de las ratas cada 2 días después de inyectarles una dosis de refuerzo. En la Tabla 20 se observa la escala de 5 puntos para medir la artritis, en donde la puntuación máxima de artritis se fijó en 16 por rata (4 puntos $\times$ 4 patas) (Brand *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2014).

Tabla 20. Criterios para el índice artrítico.

Puntuación	Criterio de observación
0	Pata normal
1	Inflamación menor y signos que afectan al tobillo/muñeca
2	Inflamación y signos que afectan al tobillo y tarso de la pata trasera o/y muñeca
3	Inflamación grave y signos artríticos que se extienden a metatarsianos y metacarpianos
4	Enfermedad grave que afecta a toda la pata trasera y delantera o/y nódulos artríticos subcutáneos

9.4.5 Hinchazón de las patas traseras

La inflamación se midió con el incremento del volumen de la extremidad tratada, con un micrómetro digital los días 1, 7, 14, 21 y 28 del estudio (Sharma *et al.*, 2004). El porcentaje de inhibición del edema se calculó según la fórmula antes referida. Se consideró como actividad antiinflamatoria moderada la inhibición del edema del 35 al 65 % y como buen efecto antiinflamatorio un valor mayor de 65 % (Serenó, 2020).

9.4.6 Radiología de la pata de rata

Al día 29 las ratas fueron sedadas con pentobarbital sódico (30 mg/kg). La rata se colocó sobre un casete radiográfico que contenía una película de rayos X estándar. Las patas traseras se mantuvieron a una distancia de 90 cm de la fuente de rayos X durante un tiempo de exposición de 0.1 s para obtener una vista axial.

9.4.7 Medición del índice esplénico y tímico

Al concluir el experimento, se sacrificaron las ratas usando pentobarbital sódico a una dosis de 80 mg/kg. Posteriormente, se extrajeron los bazo, timos y riñones, los cuales fueron lavados con solución fisiológica, pesados inmediatamente y conservados en solución de formalina. El cálculo del índice esplénico se realizó aplicando la fórmula

abajo referida. De manera similar, se utilizó el peso del timo en la ecuación para obtener el índice tímico.

$$\text{Índice esplenico} = \frac{\text{peso total (g)}}{\text{peso del bazo (g)}} \times 100$$

9.4.8 Procesamiento histológico del tejido óseo

Se trabajó con las articulaciones femorotibiales, a las que se les retiró el exceso de músculo, como se muestra en la Figura 19. Enseguida, las muestras se conservaron en solución de formalina tamponada neutra al 10 % por un mes. Las articulaciones se seccionaron y se colocaron en solución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 10 % durante tres meses a 4 °C, realizando tres cambios de solución. Luego, se efectuó un lavado y se sometieron nuevamente a fijación en formaldehído por cuatro días y se transfirieron a una solución de EDTA al 10 % durante un día a temperatura ambiente con agitación, como preparación para el proceso de deshidratación. Finalmente, se siguió el esquema mostrado en la Tabla 21 para completar el proceso de deshidratación e inclusión en parafina de las articulaciones (Suvarna *et al.*, 2018).

Los cortes histológicos se realizaron con un micrótopo de bajo perfil (Leica), obteniendo secciones con un grosor de 3 µm. Posteriormente, las secciones fueron sometidas a tinción con hematoxilina y eosina (H&E), así como a una tinción diferencial con safranina O.

Tabla 21. Esquema de procesamiento histológico para tejido óseo.

Proceso	Procedimiento	Tiempo
Lavado	Agua destilada	30 min
	PBS (solución salina tamponada)	30 min
Deshidratación	Etanol 70 %	9 h
	Etanol 70 %	9 h
	Etanol 80 %	1 h
	Etanol 90 %	1 h

	Etanol 96 %	1h
	Etanol 96 %	Hasta el día siguiente
	Etanol 96 %	Hasta el día siguiente
	Etanol absoluto	1 h
	Etanol absoluto	1 h
	Etanol Abs / Xilol 1:1	1 h
	Xilol I	1 h
	Xilol II	1 h
	Parafina I 60 °C	2 h
	Parafina II 56 °C	Sacar, solidificar y dejar ese día
Filtración	Parafina III 56 °C	Hasta el día siguiente
	Parafina IV 60 °C	2 h
Inclusión	Incluir en bloque	

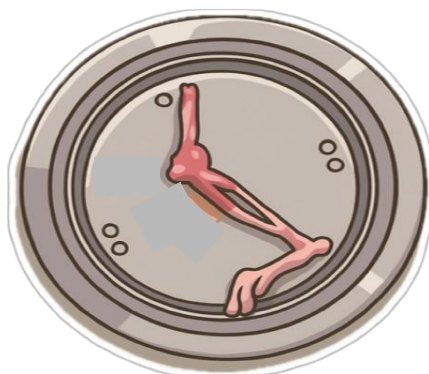


Figura 19. Esquema de articulación femorotibiales.

9.4.9 Procesamiento histológico de riñones y bazo

Los órganos se lavaron con solución fisiológica y guardados en solución de formalina al 10 % por 4 semanas; luego, el riñón y bazo se fijaron en formaldehído al 4 % por 7 días, seguido de deshidrataciones progresivas en etanol al 70, 80, 90 y 96 %, cada una por 45 min para eliminar agua y preservar la estructura tisular, preparándolo para los pasos de aclaramiento en xilol por 90 min e inclusión en parafina. Los cortes de tejido se hicieron con un micrótopo de bajo perfil, obteniendo secciones con un grosor de 3 μ m. Luego, las secciones obtenidas fueron sometidas a tinción convencional con

H&E y tinción diferencial Tricrómica de Masson.

9.4.10 Tinciones

Se realizó el proceso de tinción en los cortes histológicos empleando la tinción de H&E, la cual permite una diferenciación clara de los componentes celulares: los núcleos se tiñen de color púrpura intenso debido a la afinidad de la hematoxilina por los ácidos nucleicos, mientras que el citoplasma y otros componentes extracelulares adquieren una tonalidad rosada por acción de la eosina.

Adicionalmente, se aplicaron tinciones para resaltar estructuras particulares en distintos tejidos. En las secciones de articulaciones, se usó la tinción con safranina O, para diferenciar el cartílago y el hueso: el cartílago se tiñe de rojo por la alta presencia de proteoglucanos en la matriz extracelular, y el tejido óseo aparece teñido de verde. Esta tinción es especialmente útil para evaluar la integridad del cartílago y detectar posibles procesos degenerativos. En los cortes de riñón se empleó la tinción tricrómica de Masson, para determinar el grado de fibrosis en las estructuras renales como la membrana basal y tejido conectivo. El colágeno se tiñe de azul, para identificar áreas de daño estructural o de remodelación tisular asociada a procesos inflamatorios o crónicos. Se siguió el esquema de H&E reportado por Hurtado *et al.* (2022) para los tejidos de riñón y bazo, y el protocolo descrito por Lillie (1976) para las articulaciones y se aplicó el procedimiento del kit de tinción tricrómica de Masson (HYCEL), conforme a lo descrito en la Tabla 22.

Tabla 22. Esquema de tinción para tejido óseo, riñón y bazo.

Tinción Hematoxilina- Eosina			Tinción Safranina O		Tinción Masson	
Órganos	Articulación	Riñón- Bazo	Órgano	Articulación	Órgano	Riñón
Reactivos	Tiempo (min)	Tiempo (min)	Reactivos	Tiempo (min)	Reactivos	Tiempo (min)
Xilol I	10	10	Xilol I	15	Xilol I	10
Xilol II	10	10	Xilol II	15	Xilol II	10

Etanol absoluto	10	10	Etanol absoluto	10	Etanol absoluto	10
Etanol 96 %	5	5	Etanol 96 %	5	Etanol 96 %	10
H ₂ O	5	5	H ₂ O	5	H ₂ O	10
Hematoxilina	13	10	Hematoxilina	7	Bouin	12 h
H ₂ O	3 Inm.	3 Inm.	H ₂ O	10	H ₂ O	6 Inm.
Etanol 90 %	5	5	Verde rápido	3	Hematoxilina	10
Etanol 96 %	5	5	Ácido acético 1%	12 s	H ₂ O	10
Eosina	1	30 s	Safranina 0. 1 %	5	H ₂ O	6 Inm.
Etanol 96 %	3 Inm.	3 Inm.	Etanol 96 %	30 s	Fucsina ae	15
Etanol absoluto I	30 s	30 s	Etanol absoluto	30 s	H ₂ O	6 Inm.
Etanol absoluto II	30 s	30 s	Xilol	10	Ácido fos.	12.5
Xilol	10	10	-	10	Azul an.	12.5
-	-	-	-	-	H ₂ O	6 Inm.
-	-	-	-	-	Ácido acético 1%	4
-	-	-	-	-	Etanol absoluto	1
-	-	-	-	-	Xilol	10

Inm. = inmersiones, s= segundos, ae. = ácida- escarlata, an.= anilina, fos.= fosfomolibdicofostungstico.

9.4.11 Evaluación histológica

Se efectuó el cegado de las laminillas y tres evaluadores externos independientes hicieron la evaluación histológica de los órganos, usando los parámetros detallados

en la **Tabla de anexos 1 y 2**. En los riñones se analizaron los daños estructurales en los glomérulos y túbulos de la región de la corteza y médula renal. Y en las articulaciones, se evaluaron las epífisis del fémur y la tibia, seguido del cartílago subcondral. El sistema de puntuación histopatológico renal y articular se construyó a partir de lo establecido por Meles *et al.* (2018) con ponderaciones de 1-4 con modificaciones (Meles *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2020; Toprak *et al.*, 2020).

9.4.12 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar. Se consideró estadísticamente significativo un valor $p < 0.05$ mediante de ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparación de medias post hoc de Tukey.

9.5 Resultados y discusión

9.5.1 Inhibición de los ensayos de desnaturalización de proteínas

El efecto inhibitorio de diferentes concentraciones de extractos y cápsulas de *Aloysia citriodora* sobre la desnaturalización de proteínas se muestra en la Tabla 23 dónde se observa que a una concentración de 2.5 mg/ml de las cápsulas tienen un 33.68 ± 4.06 % el cual es un mayor efecto inhibitorio comparado con la misma concentración de extracto óptimo el cual fue de 16.24 ± 1.36 %. La actividad antiinflamatoria se comparó con diclofenaco sódico, un fármaco de referencia el cual tuvo un mayor efecto inhibitorio siendo 68.24 ± 0.45 %. Los resultados obtenidos son similares a los obtenidos por Matshimba *et al.*, 2024 en extracto de *Vigna radiata* a una concentración 3 mg/ml inhibiendo la desnaturalización de la albúmina de huevo en un 22.72 ± 2.4 %. En el estudio se puede observar que las cápsulas incrementan el efecto de la inhibición de la desnaturalización de las proteínas en comparación con el extracto óptimo.

Tabla 23. Inhibición de la Desnaturalización de la albumina de huevo.

Tratamiento	Concentración (mg/ml)	Inhibición de la desnaturalización de la proteína (%)
Extracto optimo de hojas de	1.25	10.61 ± 1.81
<i>Aloysia citriodora</i>	2.5	16.24 ± 1.36
Cápsulas optimas de hojas de	1.25	17.88 ± 2.56
<i>Aloysia citriodora</i>	2.5	33.68 ± 4.06
Diclofenaco sódico	1.25	35.07 ± 0.61
	2.5	68.24 ± 0.45

9.5.2 Actividad antiinflamatoria: Edema subplantar inducido por carragenina

La Tabla 24 muestra los resultados de la medición del edema subplantar, donde se observó un aumento significativo en el tamaño de la pata inyectada con λ -carragenina en comparación con la inyectada con el vehículo de solución salina, al comparar la pata izquierda inyectada con carragenina y los diferentes tratamientos, se observó un mayor edema a las 9 horas, por lo cual se calculó el % de inhibición a ese tiempo determinado, donde se evidencia una tendencia a la desinflamación al utilizar las cápsulas y el extracto acuoso. Este resultado fue distinto al grupo que solo recibió agua, el cual presentó un diámetro de edema de 7.76 mm, significativamente mayor al grupo tratado con el antiinflamatorio, que registró un diámetro de 6.86 mm. A través de la fórmula previamente mencionada, se calculó el porcentaje de inhibición del edema. La indometacina obtuvo un 84.88% de inhibición, mientras que el control negativo alcanzó un 72.23%. Por su parte, las cápsulas y el extracto acuoso mostraron valores de inhibición entre 80% - 82%. Comparando estos resultados con el estudio de El-Hawary, quien trabajó con extractos alcohólicos y acuosos de *Lippia citriodora* Kunth, se encontró que ambos extractos poseían actividades antiinflamatorias similares a las de la indometacina en términos de porcentaje de edema. Esto concuerda con la tendencia observada en el presente estudio. Por otro lado, investigaciones realizadas por Meckes et al.

(2004) en México, donde se evaluaron 14 extractos de plantas medicinales para la reducción del edema subplantar en ratas inducido por carragenina, reportaron resultados similares. En dicho estudio, a las 3 horas de administración intraperitoneal de extractos de alta polaridad, se obtuvo un porcentaje de inhibición del edema de 77.9% para el extracto acuoso de *Chamaedorea tepejilote* a una dosis de 400 mg/kg.

Tabla 24. Efecto de las cápsulas de *Aloysia citriodora* en el edema subplantar inducido por carragenina.

Tratamiento	Diámetro de la pata izquier da base (mm)	Diámetro de la pata derec ha base (mm)	Diámetro de la pata izquierda 9h (mm)	Diámetro de la pata derec ha 9h (mm)
G1 control negativo (Agua)	5.80 ± 0.30 ^A	5.76 ± 0.47 ^A	7.76 ± 0.25 ^A	5.61 ± 0.74 ^A
G2 control positivo (indometacina 5 mg/kg)	5.93 ± 0.22 ^A	6.16 ± 0.37 ^A	6.86 ± 0.58 ^B	5.70 ± 0.34 ^A
G3 Cápsulas (200 mg/kg)	5.95 ± 0.13 ^A	5.81 ± 0.24 ^A	7.10 ± 0.50 ^{AB}	5.80 ± 0.39 ^A
G4 Cápsulas (400 mg/kg)	6.10 ± 0.35 ^A	5.86 ± 0.17 ^A	7.15 ± 0.30 ^{AB}	5.76 ± 0.30 ^A
G5 Extracto (50 mg/kg)	6.13 ± 0.52 ^A	6.06 ± 0.60 ^A	7.41 ± 0.48 ^{AB}	5.93 ± 0.41 ^A

Letras diferentes (a, b, c, d, etc.) en la misma columna indican diferencias significativas a $p < 0.05$ (ANOVA, seguido de la prueba de Tukey). n=6.

9.5.3 Determinación de la actividad antiartrítica: peso corporal

Se encontró que un incremento en el peso corporal de los grupos de ratas tratados con cápsula en los primeros 7 días. En la Figura 20b se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con cápsulas (grupo α) 308.16 ± 29.2^{AB} g y (grupo β) 318.33 ± 44.7^{AB} g y los controles del tratamiento. Sin embargo, después de 7 días se observó una pérdida en el peso corporal en los tratamientos con cápsulas similar al control artrítico. La anemia es el rasgo característico de la AR, como se observó en ratas inducidas con artritis las cuales disminuyeron. Ratas artríticas tratadas con cápsulas de *A. citriodora* y MTX desde el día 7 al 28 disminuyeron en peso corporal en comparación con el grupo sin enfermedad, fueron significativamente diferentes evaluadas con un ANOVA con un $p = 0.05$.

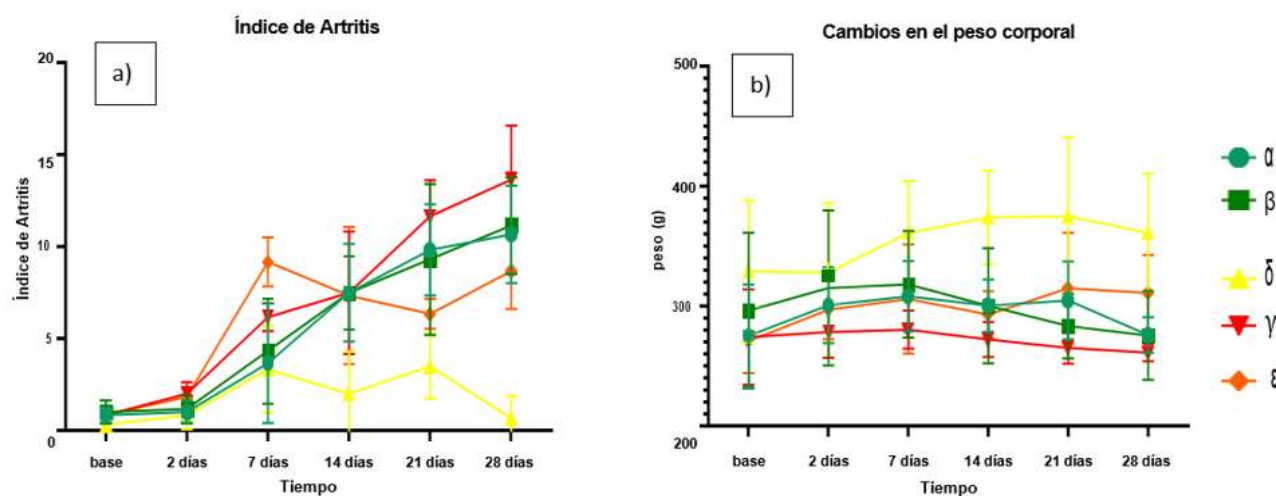


Figura 20. Efecto de las cápsulas de *A. citriodora* de en peso corporal e índice artrítico. Grupo con AR + cápsulas del extracto acuoso a 200 mg/kg/día *; β Grupo con AR + cápsulas del extracto acuoso a 400 mg/kg/día**; δ Grupo control sin Artritis.; γ Grupo con AR + MTX a 1 mg/kg/día; ϵ con AR + H₂O).

En la Tabla 25 se observa que el peso corporal de las ratas de control artríticas tratadas con MTX 1mg/ kg (grupo γ) disminuyó significativamente desde el día 1 (278

± 21.30 g) al 28 (261 ± 6.96 g) en comparación con el peso corporal de su contraparte de control normal (grupo δ) el cual fue de día 1 (328 ± 58.25 g) al 28 (357 ± 43.64 g). Las ratas artríticas tratadas con cápsulas de *A. citriodora* a 400 mg/kg (grupo β) mostraron una disminución en su peso corporal desde el día 1 (315 ± 64.98 g) hasta el día 28 (275 ± 37.19 g) en comparación con *A. citriodora* a 200 mg/kg (grupo α) el día 1 (300 ± 31.68 g) hasta el día 28 (275 ± 14.82 g). En estudios realizados por Gupta y Singh (2013) se mostró que las ratas tratadas con MTX (0.3 mg/kg) tuvieron un aumento significativo en su peso corporal a los días 25 (153.33 ± 2.60 g), al 45 (162.0 ± 1.03 g) en comparación con el peso corporal de sus contrapartes de control artríticas. Estudios realizados por Koyama *et al.* (2017) dónde se evaluaron dosis bajas de MTX, reportaron que la artritis no se desarrolló en el grupo administrado con 1 mg/kg de MTX diariamente por 21 días a partir del día siguiente a la primera sensibilización, comparado con el presente estudio, dónde la dosificación comenzó el día 14, lo que pudo no tener un efecto similar a lo demostrado por Koyama con la misma dosis.

Tabla 25. Peso corporal de ratas artríticas tratadas con cápsulas de *A. citriodora*.

Tratamiento	Peso (g) base	Peso (g) día 2	Peso (g) día 7	Peso (g) día 14	Peso (g) día 21	Peso (g) día 28
Cápsulas A. citriodora a 200 mg/kg (grupo α)	275.16 ± 42.8^A	300.66 ± 31.6^A	308.16 ± 29.2^{AB}	300.33 ± 21.7^B	304.66 ± 32.4^B	275.83 ± 14.8^B
Cápsulas A. citriodora a 400 mg/kg (grupo β)	296.16 ± 65.2^A	315.00 ± 64.9^A	318.33 ± 44.7^{AB}	300.50 ± 48.2^B	283.16 ± 27.1^B	275.83 ± 37.1^B
Control sin AR (grupo δ)	329.00 ± 59.4^A	328.83 ± 58.2^A	361.83 ± 43.6^A	374.33 ± 39.2^A	375.66 ± 66.0^A	361.16 ± 49.3^A
MTX 1 mg/kg (grupo γ)	274.83 ± 39.7^A	278.00 ± 21.3^A	280.16 ± 15.8^B	272.33 ± 14.4^B	265.00 ± 13.1^B	261.16 ± 6.9^B
Ratas artríticas (grupo ϵ)	275.33 ± 24.5^A	297.33 ± 21.3^A	306.33 ± 45.5^{AB}	293.16 ± 19.5^B	315.16 ± 46.3^{AB}	311.00 ± 31.8^{AB}

Letras diferentes (a, b, c, d, etc.) en la misma columna indican diferencias significativas a $p < 0.05$ (ANOVA, seguido de la prueba de Tukey). $n=6$.

Al realizarse las cápsulas a una relación 1: 1 (extracto y material de pared).

* Corresponde a 100 mg de extracto y 100 mg de material de pared).

** Corresponde a 200 mg de extracto y 200 mg de material de pared).

En la Figura 20a se observa que las ratas sin AR (grupo δ) no mostraron cambios en sus extremidades en los 28 días del estudio. En contraste, la enfermedad se desarrolló en todos los grupos de ratas inducidas, como se evidencia en el índice artrítico (ver Tabla 26). Hubo cambios significativos a partir del día 7 de la administración de los tratamientos, alcanzando un índice artrítico de 9.16 en el grupo de ratas artríticas tratadas con 2 mL de agua (grupo ϵ), valor significativamente mayor en comparación con los demás grupos tratados. Los grupos tratados con cápsulas de *A. citriodora* a dosis de 200 mg/kg y 400 mg/kg presentaron índices artríticos de 3.66 y 4.33, respectivamente, valores similares al grupo no inmunizado (δ), que registró un índice de 3.33 y el grupo MTX. Lo cual concuerda con el peso corporal que se fue reduciendo a partir del día 7 del suministro de los tratamientos. El índice artrítico máximo se observó en el tratamiento con MTX teniendo un valor de 13.66 ± 2.94 en el día 28. Las cápsulas de *A. citriodora* ejerció una tendencia al día 28 de disminución de índice artrítico comparado con el tratamiento con el FARME y una prolongación en la aparición de la enfermedad en los primeros 7 días de haberse suministrado.

Tabla 26. Índice artrítico en ratas tratadas con cápsulas de *A. citriodora*.

Tratamiento	Índice artrítico					
	Base	Día 2	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
Cápsulas <i>A. citriodora</i> a 200 mg/kg (grupo α)	0.83 ± 0.40^{AB}	1.00 ± 0.63^{AB}	3.66 ± 3.26^B	7.50 ± 2.66^A	9.83 ± 2.48^{AB}	10.66 ± 2.65^{AB}
Cápsulas <i>A. citriodora</i> a 400 mg/kg (grupo β)	1.33 ± 0.81^A	1.16 ± 0.75^{AB}	4.33 ± 2.87^B	7.50 ± 1.97^A	9.33 ± 4.13^{AB}	11.16 ± 2.63^{AB}
control sin AR (grupo δ)	0.33 ± 0.51^B	0.83 ± 0.75^B	3.33 ± 2.33^B	2.00 ± 2.28^B	3.50 ± 1.76^C	0.66 ± 1.21^C
MTX 1 mg/kg (grupo γ)	0.83 ± 0.40^{AB}	2.00 ± 0.63^A	6.16 ± 0.75^{AB}	7.50 ± 3.33^A	11.66 ± 1.96^A	13.66 ± 2.94^A
Ratas artríticas (grupo ϵ)	0.83 ± 0.40^{AB}	1.83 ± 0.40^{AB}	9.16 ± 1.32^A	7.33 ± 3.72^A	6.33 ± 0.81^{BC}	8.66 ± 2.08^B

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas a $p < 0.05$ (ANOVA, seguido

de la prueba de Tukey). n=6.

Al realizarse las cápsulas a una relación 1: 1 (extracto y material de pared).

* Corresponde a 100 mg de extracto y 100 mg de material de pared).

** Corresponde a 200 mg de extracto y 200 mg de material de pared).

9.5.4 Actividad antiinflamatoria: inducidas por colágeno tipo II bovino y adyuvante incompleto de Freund

Se evaluó el efecto de la desinflamación en un modelo antiartrítico utilizado cápsulas de *A. citriodora* frente a la artritis inducida por el modelo de colágeno tipo II bovino de grado inmunitario en ratas Wistar. En la Tabla 27 se observa que al día 7 se registró una tendencia al aumento en el diámetro de la pata en todas las ratas artríticas en comparación con el grupo sin enfermedad (δ), sin ser significativamente ($p < 0.05$) en cada uno de los tratamientos. La Figura 21 muestra que para el día 14 hubo cambio significativo ($p < 0.05$) en el aumento del tobillo en todas las ratas inducidas con artritis, llegando a valores significativamente diferentes con respecto al control sin enfermedad (δ), teniendo un valor de 6.50 ± 0.50^B mm, siendo significativamente igual para el grupo tratado con 200 (8.83 ± 1.51^A mm) y 400 (8.71 ± 1.45^A mm) mg/kg/día de cápsulas de *A. citriodora* con el tratamiento con MTX (9.43 ± 1.15 mm), observándose un incremento similar en el volumen de la pata de la rata

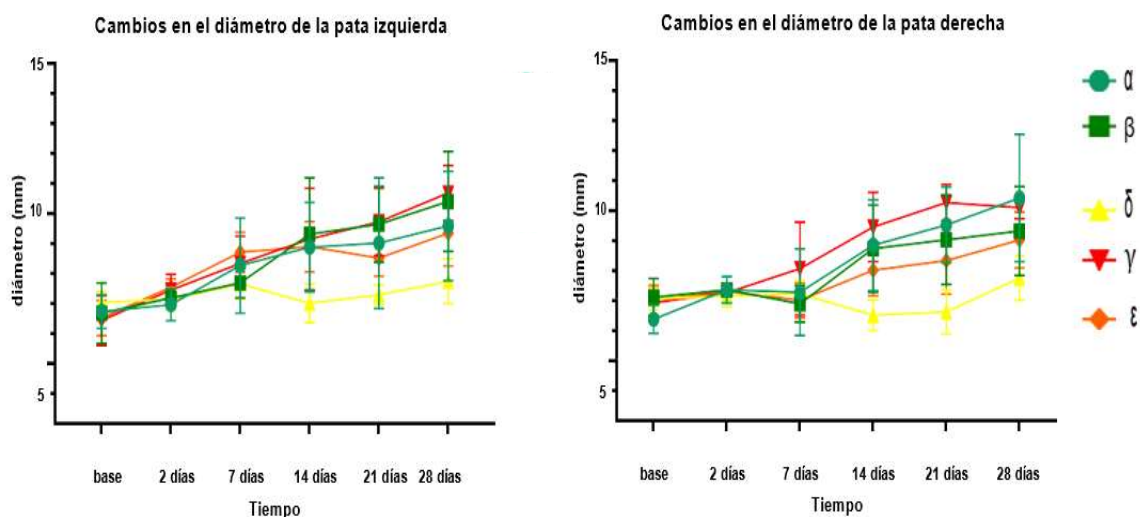


Figura 21. Efecto de las cápsulas de *A. citriodora* de en el edema subplantar inducido por carragenina. (α Grupo con AR + cápsulas del extracto acuoso a 200 mg/kg/día *; β Grupo con AR cápsulas del extracto acuoso a 400 mg/kg/día**; δ Grupo control sin artritis.; γ Grupo con AR + MTX a mg/kg/día; ε Con AR + H₂O).

Resultados de Saleem (2023), mostró que la dosis de 600 mg/kg del extracto metanólico de *Quercus leucotrichophora* redujo significativamente el edema en las patas (4.05 ± 0.07 mm), de manera similar a las ratas tratadas con MTX (3.92 ± 0.16 mm), entre los días 16 y 28. En nuestro estudio cápsulas de *A. citrodora* en el día 7 generaron una tendencia a retrasar la inflamación, no observada en el día 28 de la misma manera que el grupo tratadas con MTX los cuales no mostraron una reducción de la inflamación mostradas por Saleem utilizando una dosis de 1 mg/kg/semana.

Tabla 27. Cambios del diámetro de la pata en ratas tratadas con cápsulas de *A. citrodora*.

Tratamiento	Diámetro del edema					
	Izquierdo base	Derecho base	Izquierdo día 7	Derecho día 7	Izquierdo día 28	Derecho día 28
Cápsulas <i>A. citrodora</i> a 200 mg/kg (grupo α)	6.70 ± 0.56^A	6.36 ± 0.47^A	8.25 ± 1.59^A	7.26 ± 1.43^A	9.58 ± 1.83^{AB}	10.40 ± 2.11^A
Cápsulas <i>A. citrodora</i> a 400 mg/kg (grupo β)	6.65 ± 1.01^A	7.10 ± 0.62^A	7.66 ± 0.50^A	6.88 ± 0.61^A	10.40 ± 1.67^A	9.30 ± 1.48^{AB}
Control sin AR (grupo δ)	7.01 ± 0.34^A	7.05 ± 0.36^A	7.63 ± 0.50^A	7.21 ± 0.43^A	7.71 ± 0.75^B	7.73 ± 0.73^B
MTX 1 mg/kg (grupo γ)	6.40 ± 0.83^A	6.91 ± 0.49^A	8.31 ± 0.91^A	8.05 ± 1.54^A	10.68 ± 0.93^A	10.08 ± 0.36^A
Ratas artríticas (grupo ε)	6.48 ± 0.58^A	7.00 ± 0.50^A	8.700 ± 0.66^A	7.00 ± 0.57^A	9.33 ± 1.10^{AB}	9.00 ± 0.93^{AB}

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas a $p < 0.05$ (ANOVA, seguido de la prueba de Tukey). n=6.

Al realizarse las cápsulas a una relación 1: 1 (extracto y material de pared).

* Corresponde a 100 mg de extracto y 100 mg de material de pared).

** Corresponde a 200 mg de extracto y 200 mg de material de pared).

El metotrexato (MTX) es el fármaco de primera línea en la AR, y su eficacia clínica depende de administración crónica, dosis acumulativas y tiempo prolongado para inducir efectos inmunomoduladores sostenidos (Lopez-Olivo *et al.*, 2014). Se ha observado que el tratamiento temprano o de corta duración no contrarresta completamente la inflamación establecida, lo que puede generar resultados

paradójicos o daño tisular por efectos citotóxicos sobre sinoviocitos y condrocitos.

Estudios realizados por Pinheiro *et al.* (1993) demuestran que la eficacia clínica de MTX se consolida tras semanas o meses de administración continua, mientras que a corto plazo sólo se evidencian mejoras modestas en la sintomatología sin efecto significativo sobre la angiogénesis o la hiperplasia sinovial. Asimismo, investigaciones posteriores confirman que MTX requiere una exposición prolongada para ejercer efectos sobre los mecanismos de progresión estructural y radiográfica de la enfermedad, más allá de la simple supresión inflamatoria inicial (Weinblatt, 1995).

9.5.5 Efecto sobre el índice esplénico, el tímico y renal en rata

El índice esplénico aumentó en ratas inducidas con el adyuvante incompleto de Freund con colágeno bovino tipo II de grado inmunitario, siendo significativamente diferente ($p < 0.05$) con el grupo sin inmunización (δ) (Tabla 28). Un índice esplénico normal de 0.2 fue reportado por Alfaro (2013), valor similar a los encontrados en el grupo de ratas sanas de este estudio. Comparado los resultados reportados por Kimariyo *et al.* (2024) donde indujo artritis en ratas Wistar, encontró un índice esplénico de 3.08 ± 0.55 en ratas sin artritis, y lo que se observó fue un incremento en la masa de los bazo, con severidad de la inflamación sistémica inducida por activación de células inmunitarias, como linfocitos T y B. En la Figura 22b, el índice tímico en los grupos tratados con MTX y las cápsulas de *A. citriodora* a 200 y 400 mg/kg/día, que se mostró un comportamiento similar con valores de 0.069 ± 0.008 , 0.071 ± 0.015 y 0.062 ± 0.005 , respectivamente, siendo el caso opuesto para el grupo (ϵ) que se inmunizó sin recibir tratamiento 0.052 ± 0.011 , el cual tuvo una tendencia a la involución tímica siendo significativamente diferente al grupo sano (δ) 0.077 ± 0.018 .

Se muestran resultados similares a los de Amin *et al.* (2022), al mostrar tendencia en reducción del peso del timo en ratas inducidas con artritis con tratamiento de 12.5 y 25 mg/kg /día de pterostilbeno, el cual es una fitoalexina, y teniendo un aumento a una concentración 50 mg/kg/día, y al usar MTX a dosis de 3 mg/kg/semana una tendencia al aumento, pero no resultó en una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) en el peso del bazo y timo comparado con el grupo control de la enfermedad, aunque existió una tendencia similar (Tabla 28), donde hubo una

diferencia significativa ($p < 0.05$) entre en grupo control sano (δ) teniendo un índice tímico de 0.077 ± 0.018 y el grupo control de la enfermedad 0.052 ± 0.011 . El presente estudio muestra alteraciones de los órganos linfáticos, que se vieron afectados en la inducción de la enfermedad presentando un aumentó en bazo y reducción en timo, concordando con Saleem (2023) que menciona que el hiperfuncionamiento del sistema inmunológico se puede reconocer por la esplenomegalia y la linfadenopatía, en la que muestra datos del restablecimiento significativo ($p < 0.05$) del peso del bazo y del timo tratados con extractos metanólicos de *Quercus leucotrichophora* (bazo: 0.45 ± 0.03 g; timo: 0.23 ± 0.02 g) a 600 mg/kg, con MTX 1mg/kg/semana (bazo: 0.42 ± 0.01 g; timo: 0.20 ± 0.02 g) y grupo artrítico mayor con un valor aproximado de bazo 0.6-0.7 g y timo 0.35. Comparado los resultados de la Tabla 28 se observa el peso del timo en el grupo tratadas con cápsulas a 200 y 400 mg/kg/día, presentándose valores de 0.19 ± 0.02 y 0.17 ± 0.02 , respectivamente, siendo similares a los encontrados por Saleem (2023) en ratas Wistar. El grupo MTX 0.15 ± 0.01 no tuvo diferencia con los grupos tratados con cápsulas (α y β), teniendo ambos una tendencia similar con el grupo sin tratamiento (ε). Realizando el cálculo de índice tímico existió una tendencia a la disminución con el grupo control de la enfermedad. En la Figura 22c,d se observa que existió un aumento del índice renal de las ratas inducidas a la artritis, siendo significativamente ($p < 0.05$) diferente con el grupo sin enfermedad (δ).

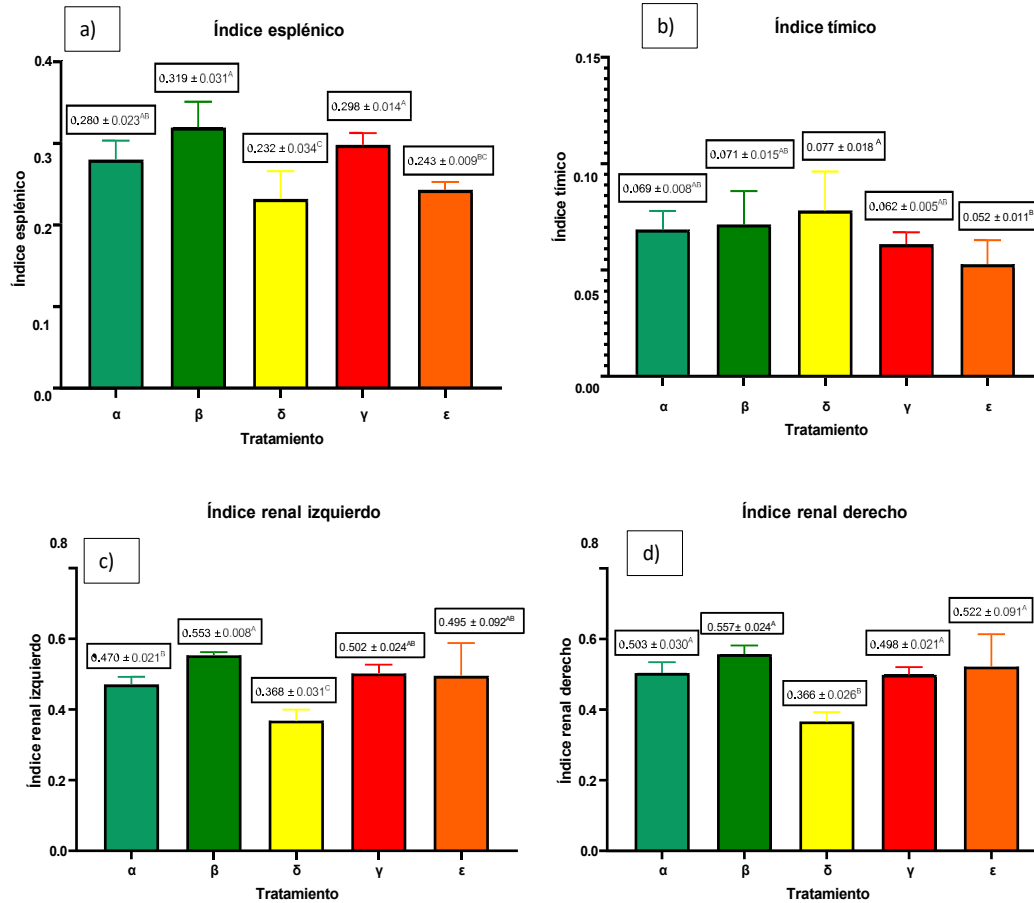


Figura 22. Efecto de las cápsulas de *A. citriodora* en órganos de ratas Wistar. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0.05$ (ANOVA, seguido de la prueba de Tukey). N = 6. (α Grupo con AR + cápsulas del extracto acuoso a 200 mg/kg/día *; β Grupo con AR + cápsulas del extracto acuoso a 400 mg/kg/día**; δ Grupo control sin Artritis.; γ Grupo con AR + MTX a 1 mg/kg/día; ε con AR + H₂O).

Tabla 28. Efecto de los tratamientos con cápsulas de *A. citriondora* y metotrexato sobre los índices esplénico, tímico y renal en ratas con artritis.

Tratamiento	Peso del bazo (g)	Índice esplénico	Peso del timo (g)	Índice tímico	Índice Renal izquierdo	Índice Renal derecho
Cápsulas <i>A. citriondora</i> a 200 mg/kg (grupo α)	0.77 $\pm$ 0.08 ^A	0.28 $\pm$ 0.02 ^{AB}	0.19 $\pm$ 0.02 ^B	0.069 $\pm$ 0.01 ^{AB}	0.47 $\pm$ 0.02 ^B	0.50 $\pm$ 0.03 ^A
Cápsulas <i>A. citriondora</i> a 400 mg/kg (grupo β)	0.79 $\pm$ 0.10 ^A	0.31 $\pm$ 0.03 ^A	0.17 $\pm$ 0.02 ^B	0.071 $\pm$ 0.015 ^{AB}	0.55 $\pm$ 0.08 ^A	0.55 $\pm$ 0.02 ^A
control sin AR (grupo δ)	0.82 $\pm$ 0.13 ^A	0.23 $\pm$ 0.03 ^C	0.27 $\pm$ 0.05 ^A	0.077 $\pm$ 0.018 ^A	0.36 $\pm$ 0.03 ^C	0.36 $\pm$ 0.02 ^B
MTX 1mg/ kg (grupo γ)	0.76 $\pm$ 0.03 ^A	0.29 $\pm$ 0.01 ^A	0.15 $\pm$ 0.01 ^B	0.062 $\pm$ 0.005 ^{AB}	0.50 $\pm$ 0.02 ^{AB}	0.49 $\pm$ 0.02 ^A
Ratas artríticas (grupo ϵ)	0.74 $\pm$ 0.04 ^A	0.24 $\pm$ 0.09 ^{BC}	0.16 $\pm$ 0.03 ^B	0.052 $\pm$ 0.011 ^B	0.49 $\pm$ 0.02 ^{AB}	0.52 $\pm$ 0.09 ^A

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas a $p < 0.05$ (ANOVA, seguido de la prueba de Tukey). n=6.

Al realizarse las cápsulas a una relación 1: 1 (extracto y material de pared).

* Corresponde a 100 mg de extracto y 100 mg de material de pared).

** Corresponde a 200 mg de extracto y 200 mg de material de pared).

9.5.6 Análisis Radiográfico

Las radiografías del grupo control (δ) mostraron tobillos con articulaciones normales y un volumen óseo superior al observado en el grupo control de la artritis (ϵ) (Figura 23).

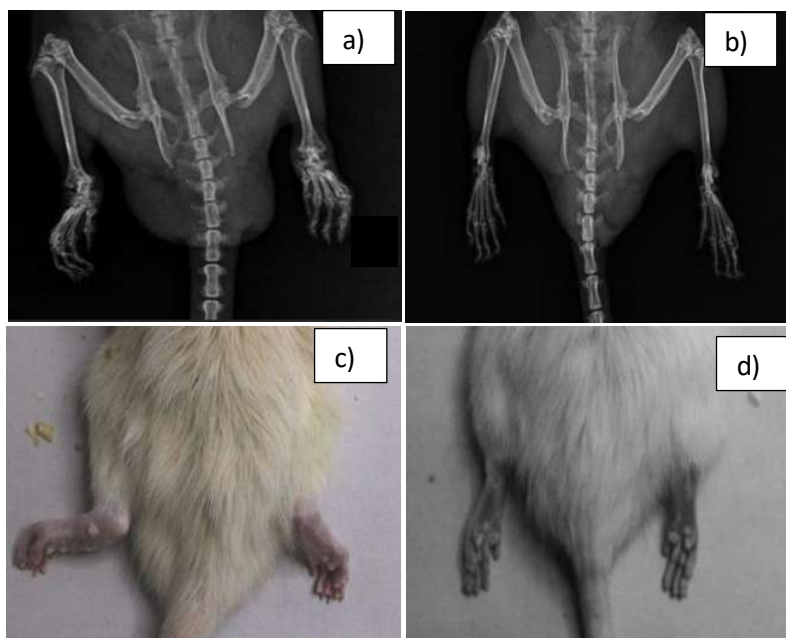


Figura 23. Radiografía de grupos control: donde a) y c) pertenecen al control positivo de la enfermedad; b) y d) al control sano.

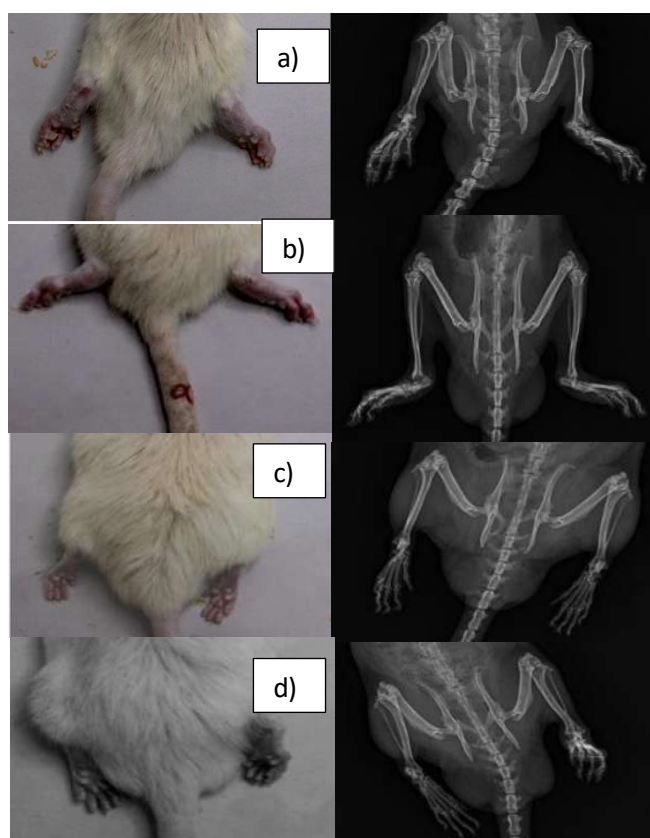


Figura 24. Radiografía de grupos control donde a) y b) pertenecen al grupo metotrexato (γ), c) a las cápsulas 200 mg (α) y d) cápsulas a 400 mg (β).

La evaluación radiológica de la AR se realizó analizando la forma y el volumen del hueso. Se observó mayor deformación en las ratas tratadas con MTX. Y se observó hinchazón de los tejidos blandos, hallazgo común en AR, ante la hiperplasia de tejidos sinoviales, lo que a su vez genera la distensión de tendones y ligamentos, así como la destrucción ósea, provocando deformidades y la discapacidad del movimiento. En el grupo tratado con MTX estas alteraciones se apreciaron en mayor grado.

9.5.7 Índice histopatológico articular

Al evaluar el daño articular se observó diferencia significativa entre los grupos (Tabla 29). El grupo (β) tratado con 400 mg/kg de cápsulas de *A. citriondora* presentó un daño del 14.80 %, en comparación con el grupo control positivo de la enfermedad (ϵ), que mostró un daño del 29.20 %. Como se aprecia en la Figura 25, en la región de las epífisis, se evidencian las lesiones articulares características de AR, observándose una mejora notable en el grupo tratado con 400 mg/kg de cápsulas, al presentar poca inflamación con una ponderación de 0.96 ± 0.04 , así como una prevención en la degradación de cartílago, en la cual se observa una estructura más definida, y la disminución de pannus. También, se observó un efecto dependiente de la dosis ya que el grupo tratado con 200 mg/kg presentó un daño intermedio del 22.94 %, con un aumento tanto en el infiltrado celular como en el pannus. Por otro lado, el grupo tratado con MTX mostró el mayor porcentaje de daño, con un 33.37%, en el que se observó un aumento en el pannus y presentó angiogénesis y un aumento en la degradación de cartílago, así como se puede observar la hiperplasia sinovial marcada. En la Tabla 29 correspondiente se detallan los daños con una ponderación de 0–4 como se detallan en anexo 2 índice histopatológico de artritis.

Los daños histopatológicos se muestran en el esquema de la Figura 25. Las figuras marcadas de la (a1–a5) muestran la región de la epífisis articular en secciones teñidas con Safranina O y las figuras (b1-b5) se enfocan en el cartílago subcondral. En el grupo δ (a1), el cartílago articular y el hueso de las epífisis se observaron sin alteraciones estructurales ni presencia de inflamación, al igual que el cartílago subcondral (b1) y el hueso de las diáfisis.

En la Figura 25 (a2), correspondiente al grupo ϵ , se observó una pérdida moderada de la tinción con Safranina O en la región superficial del cartílago tibial y en más del 50% del cartílago articular femoral, junto con una pérdida multifocal de condrocitos en la zona media del cartílago. Se observó infiltración moderada de linfocitos con formación de pannus a $\frac{1}{4}$ en ambas estructuras de tibia y fémur. La membrana sinovial tuvo hiperplasia, infiltrado linfocitario y edema. El cartílago subcondral (b2) mostró erosión, con pérdida de proteoglicanos y mucopolisacáridos de la matriz cartilaginosa, y pérdida de trabéculas medulares óseas, siendo visibles únicamente espículas.

Con la administración del extracto a 200 mg/kg/día (grupo α) se identificó infiltración marcada con edema en la cápsula articular. Formación de pannus con infiltración marcada aproximadamente a $\frac{1}{2}$ del hueso de la epífisis con necrosis, edema y pérdida de hueso medular. En el cartílago articular se observaron fisuras y erosión, calcificación del cartílago, pérdida de la tinción en la superficie y ausencia de condroblastos y condrocitos isógenos, además de fusión (anquilosis) de las articulaciones y ruptura del menisco. La hiperplasia, edema y fibrosis en la membrana sinovial se apreció evidente. En la Figura 25 (b3) se observó pérdida de $\frac{1}{4}$ del área del cartílago subcondral, con pérdida de la tinción y disminución multifocal de condrocitos y matriz cartilaginosa.

En el grupo tratado con el extracto a una dosis de 400 mg/kg/día (grupo β), Figura 25 (a4) reveló una mejora en la inflamación y hallazgos patológicos característicos de la AR. El infiltrado inflamatorio se observó leve, tanto en la membrana sinovial como en regiones del fibrocartílago articular. Aunque se observó anquilosis y pérdida tintorial en el cartílago del fémur y cartílago subcondral con regiones focales de cartílago calcificado, estos hallazgos fueron leves Figura 25 (b4).

El tratamiento con MTX Figura 25 (a5), se observó con exacerbado infiltrado de linfocitos, en epífisis dañando cartílago y hueso con formación de pannus grave, fibrosis, leve necrosis y edema tanto de tibia como de fémur que se extiende hasta el hueso trabecular, e invasión en la membrana sinovial acompañado de hiperplasia. El cartílago de las epífisis mostró disminución moderada de la tinción de Safranina O en la zona superficial con pérdida de condroblastos y condrocitos, además de erosión y

fisuras en el mismo. El cartílago subcondral se apreció con pérdida e incremento de hipertrofia en los condrocitos, con poca presencia de trabéculas medulares, Figura 25 (b5).

Tabla 29. Índice histopatológico del daño articular.

Tratamiento	Daño total en articulación (%)	Daño en cartílago (0-4)	Formación de pannus (0-4)	Hiperplasia de la membrana sinovial (0-4)	Inflamación (0-4)	Angiogénesis en el pannus (0-4)
Cápsulas <i>A. citriodora</i> a 200 mg/kg (grupo α)	22.94 $\pm$ 4.28 ^{AB}	2.68 $\pm$ 0.13 ^B	1.36 $\pm$ 0.01 ^B	2.77 $\pm$ 0.48 ^A	1.40 $\pm$ 0.24 ^{AB}	0.64 $\pm$ 0.08 ^B
Cápsulas <i>A. citriodora</i> a 400 mg/kg (grupo β)	14.80 $\pm$ 3.50 ^{BC}	2.29 $\pm$ 0.20 ^B	1.00 $\pm$ 0.07 ^B	1.16 $\pm$ 0.23 ^B	0.96 $\pm$ 0.04 ^B	0.15 $\pm$ 0.02 ^C
control sin AR (grupo δ)	0.0 $\pm$ 0.00 ^C	0.00 $\pm$ 0.00 ^C	0.00 $\pm$ 0.00 ^C	0.00 $\pm$ 0.00 ^B	0.00 $\pm$ 0.00 ^C	0.00 $\pm$ 0.00 ^B
MTX 1mg/ kg (grupo γ)	33.37 $\pm$ 5.23 ^A	3.42 $\pm$ 0.16 ^A	2.25 $\pm$ 0.28 ^A	2.91 $\pm$ 0.44 ^A	2.06 $\pm$ 0.36 ^A	1.60 $\pm$ 0.07 ^A
Ratas artríticas (grupo ϵ)	29.20 $\pm$ 5.27 ^{AB}	2.79 $\pm$ 0.10 ^B	1.34 $\pm$ 0.06 ^B	3.75 $\pm$ 0.24 ^A	1.66 $\pm$ 0.11 ^{AB}	1.56 $\pm$ 0.14 ^A

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas a $p < 0.05$ (ANOVA, seguido de la prueba de Tukey).

Al realizarse las cápsulas a una relación 1: 1 (extracto y material de pared).

* Corresponde a 100 mg de extracto y 100 mg de material de pared).

** Corresponde a 200 mg de extracto y 200 mg de material de pared).

En cuanto al índice histopatológico, se aprecia disminución en el daño articular producido por la inducción de colágeno tipo 2 de grado inmunitario. Con lo anterior, se ha comprobado que el extracto de *A. citriodora* dado en dosis de 400 mg/kg pc de cápsulas por 28 días, ejerció un efecto antiinflamatorio en las articulaciones femorotibiales, lo que podría atribuirse a las moléculas presentes en el extracto

(martinósido, kaempferol, verbascósido y luteolina). Investigaciones hechas por Fei *et al.* (2019), mostraron que la luteolina a dosis de 10 mg/kg/día por 45 días, inhibió las respuestas inflamatorias inducidas por IL-1 β en condrocitos de rata, y ralentizó la progresión de la osteoartritis en ratas inyectadas con yodoacetato monosódico.

La molécula mayoritaria presente en este estudio fue kaempferol, descrito en varios estudios por su potencial benéfico para tratar enfermedades autoinmunes, como la diabetes, la artritis y el asma (Rajendran *et al.*, 2014). Tienen un efecto sobre la inhibición de la expresión del iNOS, de la COX-2 y de la PCR, así como cambios en la vía de NF κ B (Garcia *et al.*, 2007). Pragasam (2013) observó que el ácido p-cumárico suprimió la infiltración de leucocitos en articulaciones del tobillo de ratas con artritis inducida por adyuvante.

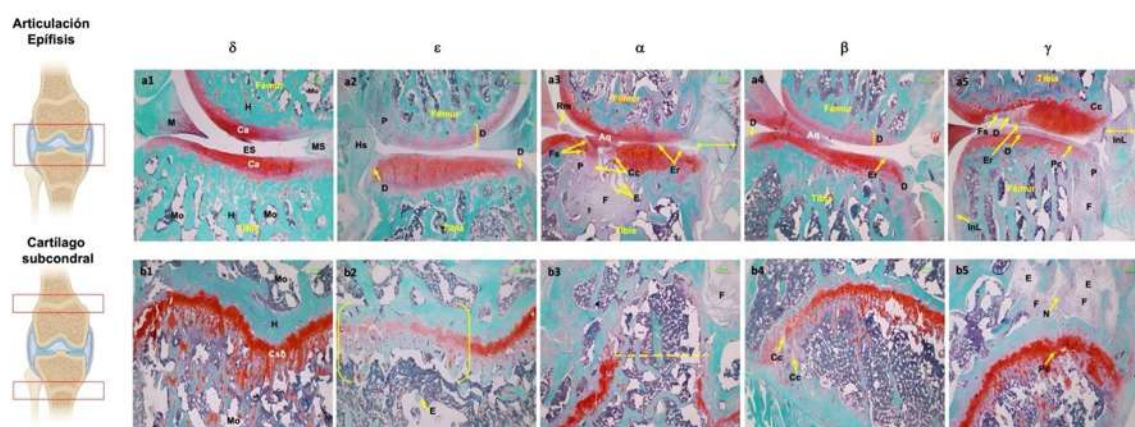


Figura 25. Corte histológico de la articulación femorotibial. ES - Espacio sinovial, Ca – Cartílago articular, M – Menisco, MS – Membrana sinovial, H- Hueso, Mo – Médula ósea, Csb – Cartílago subcondral, Hs – Hiperplasia de la membrana sinovial, D – Perdida de la tinción de Safranina O, InL – Infiltrado linfocitario, P - Pannus, Corchetes – Perdida de la tinción y fisuras en cartílago subcondral, E – Espícula ósea, Aq – Anquilosis, F - Fibrosis, E – Edema, Rm – Ruptura del menisco, Flecha de punta doble - Hiperplasia de la membrana sinovial, Cc – Cartílago calcificado, Er – erosión del cartílago, Fs - Fisura del cartílago, Línea punteada – Pérdida del cartílago subcondral, Pc – Pérdida de condrocitos.

(α Grupo con AR + cápsulas del extracto acuoso a 200 mg/kg/día *; β Grupo con AR + cápsulas del extracto acuoso a 400 mg/kg/día **; δ Grupo control sin Artritis.; γ Grupo con AR + MTX a 1 mg/kg/día; ϵ Con AR + H₂O).

En otro estudio del mismo autor, refiere que el tratamiento de ratas artríticas con ácido p-cumárico (100 mg/kg de peso corporal) redujo significativamente la tinción

de TNF- α sinovial. En un modelo de lesión pulmonar aguda en ratas inducida por el verbascósido (30 y 60 mg/kg) redujo significativamente los niveles de TNF- α , IL-1 β e IL-6. Este efecto se asoció con la inhibición de la vía NF- κ B, evidenciada por la disminución de I κ B α , IKK α e IKK β . Los resultados confirman su potente acción antiinflamatoria molecular (Jing *et al.*, 2015).

Aunado a la combinación de moléculas presentes en las cápsulas de cedrón, como los iridoides, estas pueden ejercer actividades antiinflamatorias. En la Figura 25 (a3) se observa la osificación del menisco, presente en algunos roedores, excepto en el grupo tratado con la dosis más alta de cápsulas de cedrón. La osificación del menisco en el modelo de artritis inducida por colágeno tipo II indica un daño articular grave causado por inflamación prolongada y es una señal clara de que la enfermedad se encuentra en una etapa avanzada.

El análisis histopatológico del daño articular mostro que el tratamiento con capsulas de *A. citriodora* Palau produjo una reducción significativa del daño total articular en comparación el grupo de ratas artríticas no tratadas, con un efecto más marcado en la dosis de 400 mg/kg (14.80 ± 3.50 %) respecto a 200 mg/kg (22.94 ± 4.28 %), lo que sugiere una respuesta dependiente de la dosis. Esta disminución del daño se asoció principalmente con reducciones de hiperplasia de la membrana sinovial (1.16 ± 0.23 vs 2.77 ± 0.48) y en la angiogénesis en el pannus (0.15 ± 0.02 vs 0.84 ± 0.08), indicando un efecto relevante sobre la proliferación sinovial y la neovascularización. En contraste, la disminución en los parámetros de inflamación (0.96 ± 0.04 y 1.40 ± 0.24) y formación de pannus (1.00 ± 0.07 y 1.36 ± 0.01) fue menos pronunciada, lo que sugiere que probablemente el extracto ejerce su efecto antiartrítico principalmente a través de los mecanismos antiproliferativo y antiangiogénicos más que por una actividad antiinflamatoria. El tratamiento con metotrexato (1 mg/kg) mostró el mayor daño articular (33.37 ± 5.23 %) y valores elevados en todos los parámetros evaluados, lo que concuerda con el curso exacerbado de la enfermedad en este modelo y resalta las diferencias en el mecanismo de acción frente al extracto de cedrón.

9.5.8 Evaluación del daño renal y bazo

La AR puede dañar tanto las articulaciones como los órganos extraarticulares, incluyendo el corazón, los riñones, los pulmones, el sistema digestivo, los ojos, la piel y el sistema nervioso (Papadogianni y Lambrou, 2023). Se observa en la Figura 26 los daños predominantes en los riñones, los cuales se evaluaron como se detallan en anexo 1 índice histopatológico de renal. Los daños predominantes en el glomérulo fueron hiperplasia glomerular, congestión capilar, hipertrofia de los podocitos, hiperproliferación mesangial, e Infiltrado celular. En un estudio realizado por Song *et al.* (2020), en el que estudio diferentes marcadores renales en ratas inducidas con artritis utilizando colágeno de tipo 2, identificaron cinco marcadores específicos de daño renal en la AR. Tras el análisis de estos metabolitos, se observó que las interconversiones de pentosas y glucuronatos están estrechamente relacionadas con la patogénesis del daño renal en la AR. En su estudio concluyen que el modelo de colágeno tipo 2, entre las semanas 8 – 10 es la etapa en la que se presenta daño renal en la AR, en la cual el riñón de las ratas a presentado evidente infiltración de células inflamatorias crónicas en el intersticio renal y se observó atrofiaba glomerular gradualmente (Song *et al.*, 2020). En el presente estudio, tras un periodo experimental de seis semanas, se observaron daños renales consistentes con la progresión de la enfermedad en el grupo control positivo (ϵ) (ver Tabla 30). Se evidenció daño renal en todos los grupos en los que se indujo AR. El análisis estadístico mediante ANOVA con prueba de Tukey ($p = 0.05$) indicó que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. Por lo tanto, se concluye que el daño renal observado fue consecuencia de la inducción de AR y no fue provocado por la administración de cápsulas de *A. citriodora* ni de MTX. Según Leyva-Jiménez (2019), la Unión Europea ha autorizado el uso de *Lippia citriodora* como nuevo alimento (Reglamento de Ejecución UE 2017/2470), permitiendo su uso como ingrediente con potencial en el área de la salud.

Tabla 30. Evaluación histológica del daño renal.

Tratamiento	Daño Renal (%)	Hiperproliferación mesangial (0-4)	Hipertrofia de podocitos (0-4)	Congestión capilar glomerular (0-4)	Inflamación (0-4)	Necrosis glomerular (0-4)
Cápsulas A. <i>citriodora</i> a 200 mg/kg (grupo α)	31.69 $\pm$ 2.94 ^A	2.15 $\pm$ 0.14 ^{AB}	1.24 $\pm$ 0.11 ^{AB}	1.98 $\pm$ 0.16 ^A	1.51 $\pm$ 0.21 ^A	1.64 $\pm$ 0.20 ^A
Cápsulas A. <i>citriodora</i> a 400 mg/kg (grupo β)	34.24 $\pm$ 2.27 ^A	2.41 $\pm$ 0.16 ^A	1.00 $\pm$ 0.09 ^B	2.41 $\pm$ 0.17 ^A	1.02 $\pm$ 0.14 ^A	1.65 $\pm$ 0.17 ^A
Control sin AR (grupo δ)	0.0 $\pm$ 0.00 ^B	0.00 $\pm$ 0.00 ^C	0.00 $\pm$ 0.00 ^C	0.00 $\pm$ 0.00 ^C	0.00 $\pm$ 0.00 ^B	0.00 $\pm$ 0.00 ^B
MTX 1mg/ kg (grupo γ)	26.78 $\pm$ 2.53 ^A	1.73 $\pm$ 0.22 ^B	1.04 $\pm$ 0.10 ^B	1.36 $\pm$ 0.15 ^B	1.14 $\pm$ 0.14 ^A	1.33 $\pm$ 0.23 ^A
Ratas artríticas (grupo ϵ)	34.86 $\pm$ 2.99 ^A	2.52 $\pm$ 0.19 ^A	1.54 $\pm$ 0.17 ^A	1.96 $\pm$ 0.13 ^A	1.23 $\pm$ 0.16 ^A	1.56 $\pm$ 0.14 ^A

Se observo necrosis glomerular en los tratamientos inducidos con AR en un trabajo realizado por Tsybul'ko *et al.* (2001). Reportaron que los niveles séricos de TNF- α en pacientes con AR parecieron ser significativamente más altos. Los niveles séricos altos de TNF- α se correlacionaron significativamente con la presencia de síndrome nefrótico causado por amiloidosis secundaria. La AR puede causar lesiones glomerulares como amiloidosis, glomerulonefritis membranosa y proliferación mesangial (Kuznetsky *et al.*, 1986). La inducción de artritis elevó significativamente los niveles de anticuerpos anticolágeno, así como el estrés oxidativo generado durante la inflamación favorece la formación de productos finales de glucosilación avanzada (AGEs), los cuales inducen daño no enzimático por glioxidación en el colágeno. Esta acumulación afecta al colágeno de la matriz extracelular renal, alterando su grosor y recambio en la membrana basal (Bailey *et al.*, 1998; Choi, 2007). Lo anterior

concuenda con el presente estudio, en el cual las ratas sometidas a inmunización con colágeno presentaron daño glomerular sin diferencias significativas ($p = 0.05$), con una ponderación similar en la necrosis glomerular, un daño considerado no reparable. Cabe destacar que, a una dosis de 400 mg/kg/día de cápsulas de cedrón, se observó una mayor ponderación de hiperproliferación mesangial (2.41 ± 0.16), siendo significativamente similar al grupo de ratas artríticas sin tratamiento (ϵ), y significativamente diferente al grupo tratado con MTX 1 mg/kg/día (γ), que presentó un valor de 1.73 ± 0.22 .

Los daños renales observados a nivel histopatológico se presentan en la Figura 26. El grupo control mostró características morfológicas normales, los glomérulos exhibieron cápsula y espacio de Bowman bien definidos, y capilares glomerulares sin alteraciones. Asimismo, los túbulos mostraron una estructura sana con células epiteliales y núcleos intactos (Figura 26 c1).

En contraste, los cuatro grupos inmunizados con colágeno tipo II se caracterizaron por hiperplasia glomerular, proliferación de células mesangiales y congestión del penacho glomerular figuras (c2, c3, c4 y c5). A nivel tubular, se observó atrofia con degeneración celular, pérdida del borde en cepillo, presencia de núcleos en la luz tubular, cariólisis y cariorexis. Además, algunos espacios tubulointersticiales presentaron edema e infiltrado linfocitario de leve a moderado, indicativos de inflamación crónica tisular, así como edema intersticial Figuras 26 (e2, e3, e4 y e5).

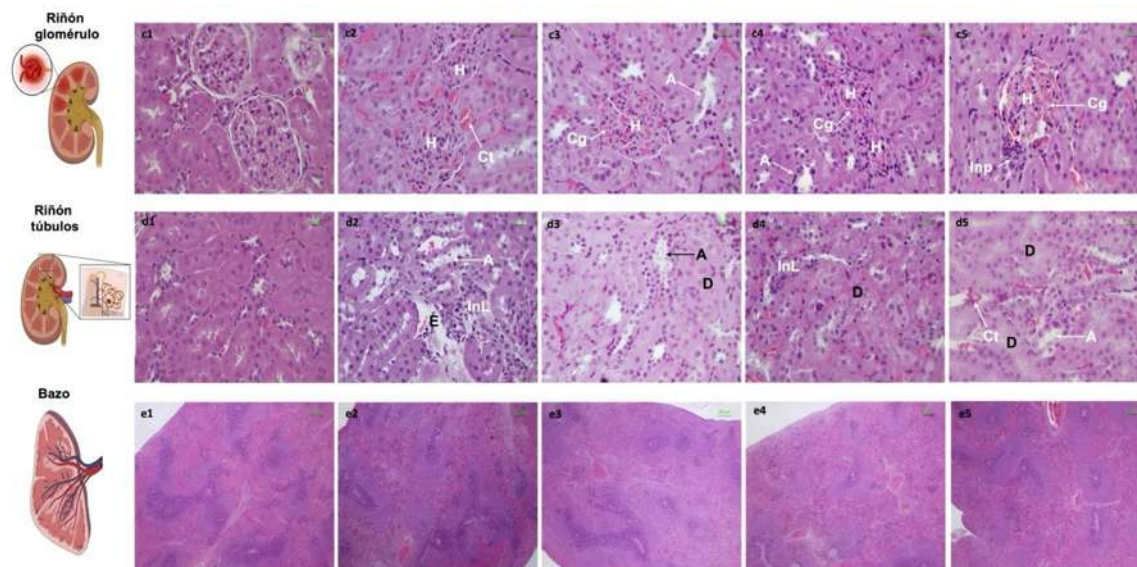


Figura 26. Corte histológico del riñón y bazo. H - Hiperplasia glomerular, Cg – Congestión capilar glomerular, Ct - Congestión capilar tubulointersticial, Inp- Inflamación periglomerular, Int – Infiltrado túbulo intersticial, D – Degeneración celular cariólisis y cariorexis, A – Atrofia tubular, E-Edema, InL – Infiltrado linfocitario. (α Grupo con AR + cápsulas del extracto acuoso a 200 mg/kg/día*; β Grupo con AR + cápsulas del extracto acuoso a 400 mg/kg/día**; δ Grupo control sin Artritis.; γ Grupo con AR + MTX a 1 mg/kg/día; ε Con AR + H₂O).

Como se muestra en la Figura 26, en el bazo se observó que los grupos α y ε , los cuales fueron tratados con 200 mg/kg de cápsulas de *A. citriodora* y el grupo control de la enfermedad, respectivamente, mostraron un incremento notable en el número y tamaño de los folículos linfoides. Dichos folículos presentaron morfología variable y centros germinales bien desarrollados, acompañados de un aumento en la población de macrófagos y células dendríticas, sin evidencia de infiltración por leucocitos polimorfonucleares ni células plasmáticas. Estos hallazgos son consistentes con un diagnóstico de hiperplasia folicular difusa, lo que sugiere una respuesta inmunitaria activa probablemente inducida por un proceso inflamatorio crónico. En contraste, los grupos metotrexato 1 mg/kg (γ) y cápsulas de *A. citriodora* a 400 mg/kg (β) mostraron una arquitectura esplénica conservada, con igual proporción de pulpa blanca y pulpa roja, y folículos linfoides con formas y tamaños normales. Se observa la ausencia de una activación inmune exacerbada en estos grupos, lo que sugiere un posible efecto modulador del MTX sobre la hiperplasia

linfoide, así como se las cápsulas de cedrón a una dosis de 400 mg/kg/ día. Choi en el año 2007 reportó que los ratones inmunizados con colágeno de tipo II fueron más susceptibles al daño oxidativo en el bazo y el hígado bajo condiciones inflamatorias crónicas. En los roedores con artritis inducidas por colágeno, se observaron niveles significativamente elevados de proteínas oxidadas y una disminución la actividad enzimática antioxidante en el bazo, en comparación con roedores sanos. Estos hallazgos sugieren que el estrés oxidativo en el sistema inmunitario esplénico podría contribuir a la patogénesis de la artritis reumatoide (Choi, 2007).

9.6 Conclusión

Se demostró que las cápsulas de extracto de *A. citriondora* a una dosis de 400 mg/kg/día, presentó eficacia antiartrítica y antiinflamatoria en un modelo de artritis inducida por colágeno tipo II y adyuvante incompleto de Freund. Este efecto se evidenció en el retraso en la aparición de los signos durante los primeros siete días de administración, una mayor actividad motora, regulación del daño tímico y reducción significativa de los hallazgos histopatológicos característicos de la enfermedad, como son infiltrado inflamatorio y degeneración del cartílago en la articulación femorotibial. En adición, la preservación de la arquitectura esplénica normal sugiere que la inflamación sistémica fue controlada, lo que indica que el tratamiento a 400 mg/kg/día contribuyó a reducir el daño articular, la hinchazón y otros signos clínicos asociados a la artritis en las ratas. En riñón se observó que los daños glomerulares y de los túbulos intersticiales se indujeron por la inmunización con colágeno tipo II, y no por los tratamientos. Tanto el extracto de *A. citriondora* como el MTX no provocaron daño renal adicional, lo que refuerza la seguridad de ambos compuestos en este modelo. La dosis de 200 mg/kg/día no mostró un efecto terapéutico evidente. Y el tratamiento con 400 mg/kg mostró una eficacia superior incluso al grupo tratado con MTX. Estos hallazgos respaldan el potencial del extracto como agente terapéutico para la artritis y abren nuevas líneas de investigación, tanto para los compuestos bioactivos presentes en las cápsulas como el verbascósido, martinósido, luteolina, kaempferol, como al efecto sinérgico del extracto completo de *A. citriondora*. Se recomienda continuar con estudios preclínicos y clínicos que permitan validar y fortalecer estos resultados.

9.7 Referencias tercer capítulo

- Ahsan, H., Hasan, M. Y., Ahmad, R.** (2022). Reactive oxygen species (ROS) in the pathophysiology of rheumatoid arthritis (RA). *React. Oxyg. Species*, 107(10.5772). 10.5772/intechopen.
- Akyer, S.P., Karagur, E.R., Ata, M.T., Toprak, E.K., Donmez, A.C., Donmez, B.O.** (2023). Verbascoside Inhibits/Repairs the Damage of LPS-Induced Inflammation by Regulating Apoptosis, Oxidative Stress, and Bone Remodeling. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(11), 8755-8766.
- Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A.J., Funovits, J., Felson, D.T., Bingham, C.O., Hawker, G.** (2010) Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis & Rheumatism*, 62(9), 2569–2581.
- Alfaro-Burgos, S.** (2013). Morphological Alterations of the Spleen of Rats (*Rattus norvegicus*) Treated with Arsenic Trioxide. *Journal of Morphology*, 31(3), 1012-1019
- Alipieva, K., Korkina, L., Orhan, I.E., Georgiev, M.I.** (2014). Verbascoside — A review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. *Biotechnology Advances*, 32(6), 1065–1076.
- Amin, A., Akhtar, M.F., Saleem, A., Sharif, A., Shah, S., Khan, M.I., Sohail, M.F.** (2022). Pterostilbene improves CFA-induced arthritis and peripheral neuropathy through modulation of oxidative stress, inflammatory cytokines and neurotransmitters in Wistar rats. *Inflammopharmacology*, 30(6), 2285-2300.
- Anderson, A. E., Shin, B., Bryars, M., Maynard, C., Harrington, L.** (2021). STAT4 influences the expression of IL-10 in Th17 cells. *The Journal of Immunology*, 206(1_Supplement), 51- 12.
- Bailey, A.J., Paul, R.G., Knott, L.** (1998) Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mech. Ageing Dev.* 106: 1–56.
- Barik, R.R., Bhatt, L.K.** (2021). Emerging epigenetic targets in rheumatoid arthritis. *Rheumatology International*. 41(12), 2047-2067.
- Bottomley, W.W., Goodfield, M.** (1995). Methotrexate for the treatment of severe mucocutaneous lupus erythematosus. *Br. J. Dermatol.* 133:311-4.

- Brand, D.D., Latham, K.A., Rosloniec, E.F.** (2007). Collagen-induced arthritis. *Nature Protocols*, 2(5), 1269–1275.
- Buchwald-Werner, S., Naka, I., Wilhelm, M., Schütz, E., Schoen, C., Reule, C.** (2018). Effects of lemon verbena extract (Recoverben®) supplementation on muscle strength and recovery after exhaustive exercise: a randomized, placebo-controlled trial. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 15(1), 5.
- Bullock, J., Rizvi, S.A., Saleh, A.M., Ahmed, S.S., Do, D.P., Ansari, R.A., Ahmed, J.** (2019). Rheumatoid arthritis: a brief overview of the treatment. *Medical Principles and Practice*, 27(6), 501-507.
- Choi, E.M.** (2007). Oxidative status of DBA/1J mice with type II collagen-induced arthritis. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, 27(5), 472-481.
- Crofford, L.J., Wilder, R.L., Ristimäki, A.P., Sano, H., Remmers, E.F., Epps, H.R., Hla, T.** (1994). Cyclooxygenase-1 and-2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. *The Journal of Clinical Investigation*, 93(3), 1095-1101.
- El-Hawary, S.S., Yousif, M.F., Motaal, A.A.A., Abd-Hameed, L.M.** (2012). Bioactivities, phenolic compounds and in-vitro propagation of *Lippia citriodora* Kunth cultivated in Egypt. *Bulletin Faculty Pharmacy, Cairo University*, 50(1):1-6.
- Fei, J., Liang, B., Jiang, C., Ni, H., Wang, L.** (2019). Luteolin inhibits IL-1 β -induced inflammation in rat chondrocytes and attenuates osteoarthritis progression in a rat model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 1586-1592.
- Filella, X., Molina, R., Ballesta, A.M.** (2002). Structure and function of cytokines. *Integral Medicine*, 39(2):63-71.
- Firestein, G.S.** (2003). Evolution of Concepts on Rheumatoid Arthritis. *Nature*, 423(6937), 356–361.
- García, R.E., Calix, E.P., Zarzosa, A.O., Pérez, M.E.G.** (2018). Ethnomedicinal plants used for the treatment of dermatological affections on the Purépecha Plateau, Michoacán, Mexico. *Acta Botánica Mex.*, (125):95-132.
- Gupta, A., Singh, S.** (2014). Evaluation of anti-inflammatory effect of *Withania somnifera* root on collagen-induced arthritis in rats. *Pharmaceutical Biology*, 52(3), 308-320.

Hamed, K.M., Dighriri, I.M., Baomar, A.F., Alharthy, B.T., Alenazi, F.E., Alali, G. H., Alzahrani, S. (2022). Overview of methotrexate toxicity: a comprehensive literature review. *Cureus*, 14(9).

Holoshitz, J. (2010). The rheumatoid arthritis HLA–DRB1 shared epitope. *Current Opinion in Rheumatology*, 22(3), 293–298.

Hurtado-Nuñez, G.E., Cortés-Rojo, C., Sánchez-Ceja, S.G., Martínez-Flores, H.E., Salgado-Garciglia, R., Bartolomé-Camacho, M.C., García-Pérez, M.E. (2022). Gallic, ellagic acids and their oral combined administration induce kidney, lung, and heart injury after acute exposure in Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology*, 170, 113492.

Jing, W., Chunhua, M., Shumin, W. (2015). Effects of acteoside on lipopolysaccharide-induced inflammation in acute lung injury via regulation of NF-κB pathway in vivo and in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 285(2), 128-135.

Kabara, A.L., Patil, P.S., Mohan, P.B. (2023). Safety Profile of Methotrexate in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Journal of Advances in Medicine and Medical Research*, 35(15), 79-87.

Kimariyo, P.F., Kurati, S.P., Babu, P.S., Moyo, A.A., Muthyala, M.K.K. (2024). Synthesized diterpene lactone derivative attenuated Freund's complete adjuvant-induced arthritis in Wistar rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 27(9), 1197.

Koyama, A., Tanaka, A., To, H. (2017). Daily oral administration of low-dose methotrexate has greater antirheumatic effects in collagen-induced arthritis rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69(9), 1145-1154.

Khtar MF, Khan K, Saleem A, Baig MMFA, Rasul A, Abdel-DaimMMJI (2021) Chemical Characterization and Anti-Arthritic Properties: Evaluation of Monotoca buxifolia Methanolic Extract in Freund's Adjuvant-Induced Arthritis in Wistar Rats. *Inflammopharmacology*. 29(2):393–40.

Kuznetsky, K.A., Schwartz, M.M., Lohmann, L.A., Lewis, E.J. (1986) Necrotizing glomerulonephritis in rheumatoid arthritis. *Clin Nephrol*;26(5):257-64. PMID: 3802589.

Leyva-Jiménez, F.J., Lozano-Sánchez, J., Cádiz-Gurrea, M.D.L.L., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A. (2019). Functional ingredients based on nutritional phenolics. A case study against inflammation: *Lippia* genus. *Nutrients*, 11(7), 1646.

- Li, Y., Yu, H., Jin, Y., Li, M., Qu, C. (2018).** Verbascoside alleviates atopic dermatitis like symptoms in mice via its potent anti-inflammatory effect. *Intern. Arch. Allergy Immunol.*, 175(4):220-230.
- Lillie, R.D., Fulmer, H.M. (1976).** Histopathologic Technic and Practical Histochemistry, 4th ed. New York, NY:McGraw-Hill;657.
- Liu, W., Li, Y., Xiong, X., Chen, Y., Qiao, L., Wang, J., Su, X., Chu, F., Liu, H. (2020)** Traditional Chinese Medicine Protects against Hypertensive Kidney Injury in Dahl Salt-Sensitive Rats by Targeting Transforming Growth Factor- β Signaling *Pathway. Biomed. Pharmacother.* 131, 110746.
- López, M.D. (2007).** Actividad antiinflamatoria y antioxidante de las especies *Barkleyanthus salicifolius* Kunth y *Penstemon gentianoides* HBK. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.
- Lopez-Olivo, M. A., Siddhanamatha, H. R., Shea, B., Tugwell, P., Wells, G. A., Suarez-Almazor, M. E. (2014).** Methotrexate for treating rheumatoid arthritis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 6.
- Maia, E.A., Francisco, J., Pires, T., Manfredi, C.S. (2011).** O uso de espécies vegetais para fins medicinais por duas comunidades da Serra Catarinense, Santa Catarina, Brasil. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, 11(1):54-74.
- Matshimba, E. N., Dinangayi, D. T., Phoba, D. U., Nkal, G. K., Nkongolo, C. K., Mvita, J. B., y Tshimankinda, P. M. (2024).** Profil phytochimique et activités antioxydante, antibactérienne, antiinflammatoire et antidrèpanocytaire de *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek (Fabaceae) cultivé en RD Congo. *Revue Congolaise des Sciences et Technologies*, 3(3), 355-363.
- McGonagle, D., Gibbon, W., Emery, P. (1998).** Clasificación de la artritis inflamatoria por entesitis. *The Lancet*, 352(9134), 1137–1140.
- Meckes, M., David-Rivera, A., Nava-Aguilar, V., y Jiménez, A. (2004).** Activity of some Mexican medicinal plant extracts on carrageenan-induced rat paw edema, *Phytomedicine*, 11(5), 446–451.
- Meles, D.K., Wurlina, W., Mustofa, I., Zakaria, S., Basori, A., Hariadi, M. ud., Safitri, E., Cempaka Putri, D.K.S., Suwasanti, N. (2018).** Toxicity, Stability and Renal Histopathology of Alkaloid of Jarong (*Achyranthes aspera* Linn.) (Caryophyllales:

Amaranthaceae) Leaf on Mice. Philipp. *J. Vet. Med.* 55.

Mohannad, N., Rashwan, E., Moaaz, M., Medhat, E. (2016). AB0050 Detection of Interleukin-22 and Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor 1 (TRAF1) in Patients with Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus: Correlation with Disease. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 75(Suppl 2), 914.1–914.

Papadogianni, P., Lambrou, G.I. (2023). Rheumatoid Arthritis and Pannus. *Journal of Research and Practice on the Musculoskeletal System*, 7(2), 44–49.

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.

Pinheiro, G. R., Ferraz, M. B., Atra, E. (1993). A short-term randomized controlled study with methotrexate in rheumatoid arthritis. *Revista da Associacao Medica Brasileira* (1992), 39(2), 91-94.

Pragasam, S.J., Murunikkara, V., Sabina, E.P., Rasool, M. (2013b). Ameliorative effect of p-coumaric acid, a common dietary phenol, on adjuvant-induced arthritis in rats. *Rheumatology International*, 33(2), 325-334.

Pragasam, S.J., Venkatesan, V., Rasool, M. (2013a). Immunomodulatory and anti-inflammatory effect of p-coumaric acid, a common dietary polyphenol on experimental inflammation in rats. *Inflammation*, 36(1), 169-176.

Rajendran, P., Rengarajan, T., Nandakumar, N., Palaniswami, R., Nishigaki, Y., Nishigaki, I. (2014). Kaempferol, a potential cytostatic and cure for inflammatory disorders. *European journal of medicinal chemistry*, 86, 103-112.

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.

Saag, K.G., Teng, G.G., Patkar, N.M., Anuntiyo, J., Finney, C., Curtis, J.R., Furst, D.E. (2008). American College of Rheumatology 2008 recommendations for the use of nonbiologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 59(6), 762–784.

- Saleem, A., Hameed, I., Akhtar, M.F., Ashraf, G.M., Alghamdi, B.S., Rahman, M. H., Almashjary, M.N.** (2023). Exploration of acute and chronic anti-inflammatory potential of *Quercus leucotrichophora* A. Camus extracts in Wistar rats: *A mechanistic insight. Frontiers in Pharmacology*, 14, 1002999.
- Sánchez, A.V.M., Hernandez-Diaz, C., Duarte-Salazar, C., Barbosa-Cobos, R.E., Romero- Vazquez, I., Ventura, L., Lugo-Zamudio, G.** (2022). AB0260 Association between inflammation and depressive symptoms in rheumatoid arthritis patients. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 81(Suppl1) 1257.1-1257.
- Santos, A.C.B., Nunes, T.S., Coutinho, T.S., Silva, M.A.P.** (2015). Uso popular de espécies medicinais da família Verbenaceae no Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 17(4):980-991.
- Sereno Villaseñor, L.A.** (2020) Actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiartrítica de compuestos fenólicos de frutos de *Potentilla indica* (FALSA FRESA). Tesis de Maestría, Facultad de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, México.
- Shalini, R., Ruchitha, J. U., Syed, S. A., Kumar, R., Sahana, N.** (2023). A review on medicinal plants used in the treatment of rheumatoid arthritis. *International Journal of Pharmacognosy and Chemistry*, 9-14.
- Sharma, J.N., Samud, A.M., Asmawi, M.Z.** (2004). Comparison between plethysmometer and micrometer methods to measure acute paw oedema for screening anti-inflammatory activity in mice. *Inflammopharmacology*, 12, 89-94.
- Song, L., Yin, Q., Kang, M., Ma, N., Li, X., Yang, Z., Zhang, Y.** (2020). Untargeted metabolomics reveals novel serum biomarker of renal damage in rheumatoid arthritis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 180, 113068.
- Sun, X., Qi, H., Wu, H., Qu, Y., Wang, K.** (2020). Anti-pruritic and anti-inflammatory effects of natural verbascoside through selective inhibition of temperature-sensitive Ca²⁺- permeable TRPV3 channel. *Journal of Dermatological Science*, 97(3), 229-231
- Suvarna, K. S., Layton, C., & Bancroft, J. D.** (2018). Bancroft's theory and practice of histological techniques, E-Book. *Elsevier Health Sciences*, 316-335.
- Toprak, T., Sekerci, C.A., Aydın, H.R., Ramazanoglu, M.A., Arslan, F.D., Basok, B.I., Kucuk, H., Kocakgol, H., Aksoy, H.Z., Asci, S.S.** (2020). Protective Effect of

Chlorogenic Acid on Renal Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *Arch. Ital. Urol. E Androl.* 92.

Tsybul'ko, S.V., Baranov, A.A., Borodin, A.G., Korshunov, N.I., Kirdianov, Slu. (2001). Faktor nekroza opukholi-alpha i porazhenie pochk pri revmatoidnom artrite (Tumor necrosis factor-alpha and kidney damage in rheumatoid arthritis). *Ter Arkh.*, 73(5):8-11. Russian. PMID: 1151775

V. Garcia-Mediavill, I. Crespo, P.S. Collado, A. Esteller, S. Sanchez-Campos, M.J. Tunon, J. Gonzalez-Gallego. (2007). The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive Cprotein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *Eur. J. Pharm.* 557,221–229.

Weinblatt, M. E. (1995). Efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 34(suppl_2), 43-48.

Winter, C.A., Risley, 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.

Winyard, P.G., Willoughby, D.A. (Eds.). (2003). Inflammation protocols (Vol. 225). Totowa, NJ: *Humana Press*. 175-179.

9.8 Conclusión general

Las condiciones de extracción mediante ultrasonido, particularmente la temperatura, la relación planta/solvente y la amplitud del sonotrodo, ejercieron un efecto significativo en la obtención de compuestos fenólicos y en la actividad antioxidante evaluada mediante IC₅₀. La optimización de estos parámetros permitió identificar a los

extractos “T3R3A2” y “T2R3A3” como los más eficientes, los cuales mostraron una mayor capacidad para eliminar radicales libres y reúnen las características necesarias para ser empleados en estudios posteriores de actividad terapéutica y farmacológica *in vivo*. Asimismo, la comparación con métodos tradicionales de extracción demostró que el uso de agua en combinación con energía ultrasónica superó el rendimiento obtenido con metanol y rotaevaporación en *A. citriodora*.

Por otro lado, las microcápsulas de polifenoles de *A. citriodora* desarrolladas mediante secado por aspersión representan un avance importante en la formulación de nuevos fármacos, obteniendo eficiencias de encapsulación entre 65.29 y 94.93%, destacando el tratamiento “11”, constituido únicamente por CMC como material de pared, como el de mayor rendimiento. La relación cercana a 1:2 entre CMC y maltodextrina favoreció la actividad antioxidante, mientras que al agregar goma gua disminuyó la capacidad de eliminar los radicales libres. La encapsulación no solo mejora la estabilidad y la biodisponibilidad de las moléculas bioactivas al reducir el tamaño de partícula, sino que también facilita su manejo. Por último, en el modelo de la artritis inducida. Las capsulas de *A. citriodora* Palau administradas a 400 mg/kg/día demostraron una eficacia antiartrítica y antiinflamatoria, retrasando la aparición de los signos clínicos, se observó que en algunos roedores preservó la integridad de la articulación femorotibial, manteniendo la arquitectura esplénica normal. Estos efectos superaron incluso a los obtenidos con metotrexato, mientras que la dosis de 200 mg/kg/día no mostró beneficios evidentes. En conjunto, los hallazgos respaldan el potencial terapéutico del extracto encapsulado de *A. citriodora*, atribuible tanto al contenido de compuestos fenólicos como a su acción sinérgica, y sientan las bases para continuar con investigaciones preclínicas y clínicas que consoliden su uso como agente natural para el tratamiento de la artritis reumatoide.

9.9 Referencias generales

Alvarez Cortes, O. (2020) Elaboración de una Biopelícula Comestible Incorporando Nanocápsulas de Aceite Esencial y Extractos Polifenólicos de *Aloysia citriodora* con Actividad Antiinflamatoria Evaluado en un Modelo Biológico. Master's Thesis, Facultad

de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, México.

Ahsan, H., Hasan, M. Y., Ahmad, R. (2022). Reactive oxygen species (ROS) in the pathophysiology of rheumatoid arthritis (RA). *React. Oxyg. Species*, 107(10.5772).

Akyer, S. P., Karagur, E. R., Ata, M. T., Toprak, E. K., Donmez, A. C., Donmez, B. O. (2023). Verbascoside Inhibits/Repairs the Damage of LPS-Induced Inflammation by Regulating Apoptosis, Oxidative Stress, and Bone Remodeling. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(11), 8755-8766.

Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A.J., Funovits, J., Felson, D.T., Bingham, C.O., Hawker, G. (2010) Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis & Rheumatism*, 62(9), 2569–2581.

Aloke, C., Ohanenye, I.C., Aja, P.M., Ejike, C.E. (2022). Phytochemicals from medicinal plants from African forests with potentials in rheumatoid arthritis management. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 74(9), 1205-1219.

Alvarez-Cortes, O., Fuentes-García, E.A., Martínez-Flores, H.E., Tranquilino-Rodríguez, E., Laguna-Martínez, Z., Alvarez-Navarrete, M., Garnica-Romo, M.G., García-Martínez, R.M. (2025). Chemical Profile, Antibacterial, and Antioxidant Properties of Aloysia citrodora Essential Oil from Mexico. *ChemistrySelect*, 10(43).

Anderson, A.E., Shin, B., Bryars, M., Maynard, C., Harrington, L. (2021). STAT4 influences the expression of IL-10 in Th17 cells. *The Journal of Immunology*, 206, 51-12.

Arajyan, G., Sargsyan, S., Melyan, G., Shahinyan, M., Martirosyan, Y., Gabrielyan, I. (2025). Phytochemical insights and therapeutic benefits of Aloysia citrodora (lemon verbena): implications for chronic disease prevention and functional food development. *Functional Food Science*, 5(9), 402-414.

Athanasiadis, V., Chatzimitakos, T., Makrygiannis, I., Kalompatsios, D., Bozinou, E., Lalas, S.I. (2024). Antioxidant-Rich Extracts from Lemon Verbena (Aloysia citrodora L.) Leaves through Response Surface Methodology. *Oxygen*, 4(1), 1-19.

- BALAN, Karim,** 14 Dic. 2006 *Use of an extract of Aloysia/Verbena/Lippia triphylla/citriodora for the treatment of chronic and/or inflammatory diseases*. U.S. Patent Application No 11/454,777,
- Barik, R. R., Bhatt, L.K.** (2021). Emerging epigenetic targets in rheumatoid arthritis. *Rheumatology International*. doi:10.1007/s00296-021-04951-y.
- Benelli, G., Pavela, R., Canale, A., Cianfaglione, K., Ciaschetti, G., Conti, F., Nicoletti, M., Senthilnathan, S., Mehlhorn, H., Maggi, F.** (2017). Acute larvicidal toxicity of five essential oils (Pinus nigra, Hyssopus officinalis, Satureja montana, Aloysia citrodora and Pelargonium graveolens) against the filariasis vector Culex quinquefasciatus: Synergistic and antagonistic effects. *Parasitol. Int.* 66, 166-171.
- Black, R.J., Cross, M., Haile, L.M., Culbreth, G.T., Steinmetz, J.D., Hagins, H., Majeed, A.** (2023). Global, regional, and national burden of rheumatoid arthritis, 1990–2020, and projections to 2050: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet Rheumatology*, 5(10), e594-e610.
- Bullock, J., Rizvi, S. A., Saleh, A.M., Ahmed, S.S., Do, D.P., Ansari, R.A., Ahmed, J.** (2019). Rheumatoid arthritis: a brief overview of the treatment. *Medical Principles and Practice*, 27(6), 501-507.
- Champagne, C.P., Fustier, P.** (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current opinion in biotechnology*, 18(2), 184-190.
- Chranioti, C., Tzia, C.** (2014). Arabic gum mixtures as encapsulating agents of freeze-dried fennel oleoresin products. *Food and Bioprocess Technology*, 7(4): 1057-1065.
- Coury, F.F., Weinblatt, M.E.** (2010). Clinical trials to establish methotrexate as a therapy for rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology-Incl Supplements*, 28(5), S9.
- Deis, R.C.** 1997. Spray-drying-innovative use of an old process. *Food Product Design*. 7: 97-113.
- 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.

- El-Hawary, S.S., Yousif, M.F., Motaal, A.A.A., Abd-Hameed, L.M.** (2012). Bioactivities, phenolic compounds and in-vitro propagation of *Lippia citriodora* Kunth cultivated in Egypt. *Bulletin Faculty Pharmacy, Cairo University*, 50(1):1-6.
- Emad, M.E.K., Sahar, O., Fatma, M.** (2018). Evaluation of Anti-Rheumatoid Arthritis Activity of White, Black Mulberry and Turmeric in Complete Freund's Adjuvant Induced Rheumatoid Arthritis Rats. *The Medical Journal of Cairo University*, 86, 3715-3722.
- Ersus, S., Yurdagel, U.** (2007). Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. *J. Food Eng.* 80, 805–812.
- Firestein, G.S.** (2003). Evolution of Concepts on Rheumatoid Arthritis. *Nature*, 423(6937), 356–361. doi:10.1038/nature01661.
- Gandhi, Y., Kumar, R., Grewal, J., Rawat, H., Mishra, S. K., Kumar, V., ... Acharya, R.** (2022). Advances in anti-inflammatory medicinal plants and phytochemicals in the management of arthritis: A comprehensive review. *Food Chemistry Advances*, 1, 100085.
- García, R.E., Calix, E.P., Zarzosa, A.O., Pérez, M.E.G.** (2018). Ethnomedicinal plants used for the treatment of dermatological affections on the Purépecha Plateau, Michoacán, Mexico. *Acta Botánica Mex.*, (125):95-132.
- Gattuso, S., van BAREN, C. M., Gil, A., Bandoni, A., Ferraro, G., Gattuso, M.** (2008). Morpho-histological and quantitative parameters in the characterization of lemon verbena (*Aloysia citriodora* Palau) from Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 7(4), 190-198.
- Gibbs, B.F., Kermasha, S., Alli, I., Mulligan, C.N.** (1999). Encapsulation in the food industry: A review. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 50: 213-224.
- Holoshitz, J.** (2010). The rheumatoid arthritis HLA–DRB1 shared epitope. *Current Opinion in Rheumatology*, 22(3), 293–298. doi:10.1097/bor.0b013e328336ba63.
- Jones, N.M., Bernardo-Gil, M.G., Lourenco, M.G.** (2001). Comparison of methods for extraction of tobacco alkaloids. *Journal of AOAC International*, 84(2), 309-316.
- Jones, W.P., Kinghorn, A.D.** (2012). Extraction of plant secondary metabolites. *Natural Products Isolation*, 341-366.
- Kalla, A.A., Tikly, M.** (2003). Rheumatoid arthritis in the developing world. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 17(5), 863–875.

- Köroğlu, A., Altanlar, N., Kendir, G., Şimşek, D.** (2015). Piyasada satışa sunulan *Aloysia citriodora* Palau örneklerinin antioksidan kapasite ve mikrobiyolojik kontaminasyon yönünden incelenmesi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 45(3): 136-144.
- Koupantsis, T., Pavlidou, E., Paraskevopoulou, A.** (2014). Flavour encapsulation in milk proteins-CMC coacervate-type complexes. *Food Hydrocolloids*, 37, 134-142.
- Li, Y., Yu, H., Jin, Y., Li, M., Qu, C.** (2018). Verbascoside alleviates atopic dermatitislike symptoms in mice via its potent anti-inflammatory effect. *Intern. Arch. Allergy Immunol.*, 175(4):220-230.
- Ma, H., Liang, X., Li, S.S., Li, W., Li, T.F.** (2024). The role of anti-citrullinated protein antibody in pathogenesis of RA. *Clinical and Experimental Medicine*, 24(1), 153.
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., Desobry, S.** (2006). Flavour Encapsulation and controlled release: A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41:1-21.
- Maia, E.A., Francisco, J., Pires, T., Manfredi, C.S.** (2011). O uso de espécies vegetais para fins medicinais por duas comunidades da Serra Catarinense, Santa Catarina, Brasil. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, 11(1):54-74.
- Malviya, G., Salemi, S., Lagana, B., Diamanti, A. P., D'Amelio, R., Signore, A.** (2013). Biological therapies for rheumatoid arthritis: progress to date. *BioDrugs*, 27(4), 329-345.
- McGonagle, D., Gibbon, W., Emery, P.** (1998). Clasificación de la artritis inflamatoria por entesitis. *The Lancet*, 352(9134), 1137–1140.
- Mehta, V., Nagu, P., Parashar, A., Chaudhary, M.** (2023). Effect of hydroalcoholic leaf extract of *Cassia fistula* L. on type II collagen-induced arthritis in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 13(5), 195-204.
- Mikuls, T.R., Moore, G.F., O'Dell, J.R.** (2014). *Manual de Reumatología*. Editorial El Manual Moderno.
- Mohannad, N., Rashwan, E., Moaaz, M., Medhat, E.** (2016). Detection of Interleukin-22 and Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor 1 (TRAF1) in Patients with Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus: Correlation with Disease *Annals of the Rheumatic Diseases*, 75(Suppl 2), 914.1–914.

Moreno-Montoya, J., Alvarez-Nemegyei, J., Sanin, L.H., Pérez-Barbosa, L., Trejo-Valdivia, B., Santana, N., Peláez-Ballestas, I. (2015). Association of Regional and Cultural Factors With the Prevalence of Rheumatoid Arthritis in the Mexican Population. *Journal of Clinical Rheumatology*, 21(2), 57–62.

Nalla, S., Prasad, S., Kavuri, L., Pendyala, V. (2022). Traditional Medicinal Plants: Safe and Efficacious Potential Drugs in the Management of Rheumatoid Arthritis. *Frontiers in Arthritis*, 97.

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.

Ponce-Monter, H., Fernández-Martínez, E., Ortiz, M. I., Ramírez-Montiel, M. L., Cruz-Elizalde, D., Pérez-Hernández, N., Cariño-Cortés, R. (2010). Spasmolytic and anti-inflammatory effects of *Aloysia triphylla* and citral, in vitro and in vivo studies. *Journal of Smooth Muscle Research*, 46(6), 309-319.

Preglej, T., Tosevska, A., Brinkmann, M., Schatzlmaier, P., Simader, E., Sieghart, D., Bonelli, M. (2025). Time-resolved immune dynamics in rheumatoid arthritis under methotrexate therapy. *BioRxiv*, 2025-01.

Quirantes-Pine, R., Funes, L., MicoL, V., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. (2009). Highperformance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a lemon verbena extract. *J. Chromatogr. A*. 1216, 5391-5397

Saag, K.G., Teng, G.G., Patkar, N.M., Anuntiyo, J., Finney, C., Curtis, J.R., Furst, D.E. (2008). Recomendaciones de 2008 del American College of Rheumatology para el uso de fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad biológicos y no biológicos en la artritis reumatoide. *Arthritis & Rheumatism*, 59(6), 762–784.

Sagili, S. U. K. R., Addo, P. W., MacPherson, S., Shearer, M., Taylor, N., Paris, M., Orsat, V. (2023). Effects of particle size, solvent type, and extraction temperature on the extraction of crude cannabis oil, cannabinoids, and terpenes. *ACS Food Science & Technology*, 3(7), 1203-1215.

Sánchez, A.V.M., Hernandez-Diaz, C., Duarte-Salazar, C., Barbosa-Cobos, R.E., Romero-Vazquez, I., Ventura, L., Lugo-Zamudio, G. (2022). AB0260 Association between inflammation and depressive symptoms in rheumatoid arthritis patients. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 81(Suppl1) 1257.1-1257.

Santos, A.C.B., Nunes, T.S., Coutinho, T.S., Silva, M.A.P. (2015). Uso popular de espécies medicinais da família Verbenaceae no Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 17(4):980-991.

Shalini, R., Ruchitha, J.U., Syed, S.A., Kumar, R., Sahana, N. (2023). A review on medicinal plants used in the treatment of rheumatoid arthritis. *International Journal of Pharmacognosy and Chemistry*, 9-14.

Skaltsa, H., Shammash, G. (1988). Flavonoids from *Lippia citriodora*. *Planta Medica*, 54(05), 465–465.

Sun, X., Qi, H., Wu, H., Qu, Y., Wang, K. (2020). Anti-pruritic and anti-inflammatory effects of natural verbascoside through selective inhibition of temperature-sensitive Ca²⁺-permeable TRPV3 channel. *Journal of Dermatological Science*, 97(3), 229-231.

Timilsena, Y. P., Haque, M.A., Adhikari, B. (2020). Encapsulation in the food industry: A brief historical overview to recent developments. *Food and Nutrition Sciences*, 11(6), 481-508.

Topete-Betancourt, A., Samano, L., Martinez-Flores, H.E., Álvarez-Cortés, O., Virgen-Ortiz, J., Garnica-Romo, M.G., Ortega-Varela, L.F., García-Martínez, R. (2023). Comparison of cannabis flower oil extract from microwave, ultrasound, and combined processes: yield, cannabinoids content, and analgesic effect in situ. *Journal of Food and Nutrition Research*, 11, 594-601.

Vázquez, M.B., Comini, L.R., Martini, R.E., Montoya, S.N., Bottini, S., Cabrera, J. L. (2014). Comparisons between conventional, ultrasound-assisted and microwave-assisted methods for extraction of anthraquinones from *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae). *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(2), 478-484.

Wandrey, C., Bartkowiak, A., Harding, S.E. (2010) Materials for Encapsulation. In: Zuidam, N.J. and Nedović, V.A., Eds., *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, Springer, New York, 31-100.

- Wang, J.-L., Dong, X.-Y., Wei, F., Zhong, J., Liu, B., Yao, M.-H., Quek, S.Y., Chen, H.** (2014). Preparation and characterization of novel lipid carriers containing micro-algae oil for food applications. *Journal of Food Science*, 79(2): E169-E177.
- Wang, W., Zhou, H., Liu, L.** (2018). Side effects of methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: A systematic review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 158, 502-516.
- Weinblatt, M.E., Coblyn, J.S., Fox, D.A., Fraser, P.A., Holdsworth, D.E., Glass, D. N., Trentham, D.E.** (1985). Efficacy of Low-Dose Methotrexate in Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicine*, 312(13), 818–822.
- 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.
- Williams, H.J., Willkens, R.F., Samuelson, C.O., Alarcón, G.S., Guttadauria, M., Yarboro, C., Ward, J.R.** (1985). Comparison of low-dose oral pulse methotrexate and placebo in the treatment of rheumatoid arthritis. A Controlled Clinical Trial. *Arthritis & Rheumatism*, 28(7), 721–730.
- Yahya, A., Bengtsson, C., Larsson, P., Too, C.L., Mustafa, A.N., Abdullah, N.A., Alfredsson, L.** (2013). Silica exposure is associated with an increased risk of developing ACPA-positive rheumatoid arthritis in an Asian population: evidence from the Malaysian MyEIRA case– control study. *Modern Rheumatology*.
- Zhang, Y., Chen, Y., Wang, S., Dong, Y., Wang, T., Qu, L., Wang, T.** (2015). Constituyentes bioactivos de las partes aéreas de *Lippia triphylla*. *Molecules*, 20(12), 21946–21959.

Anexo 1



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



ANEXO 1 ÍNDICE HISTOPATOLÓGICO RENAL

ALUMNO:	Osvaldo Álvarez Cortes
EVALUADOR:	
TRATAMIENTO:	
FECHA:	

PARÁMETRO #1. PUNTUACIÓN GLOMERULAR RENAL

CRITERIOS	INTENSIDAD DEL DAÑO	PUNTAJE	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Hiperproliferación mesangial	Sin hiperproliferación mesangial en los glomérulos	0						
	<25% de los glomérulos presentan hiperproliferación mesangial	1						
	26-50% de los glomérulos presentan hiperproliferación mesangial	2						
	51-75% de los glomérulos presentan hiperproliferación mesangial	3						
	>76% de los glomérulos presentan hiperproliferación mesangial	4						
Hipertrofia de podocitos Nota: Podocitos que incrementan su tamaño	Sin hipertrofia de los podocitos	0						
	<25% de los glomérulos presentan hipertrofia de los podocitos	1						
	26-50% de los glomérulos presentan hipertrofia de los podocitos	2						
	51-75% de los glomérulos presentan hipertrofia de los podocitos	3						
	>76% de los glomérulos presentan hipertrofia de los podocitos	4						
Infiltración de células inflamatorias en el penacho capilar glomerular Nota: -Neutrófilos o linfocitos	Sin inflamación glomerular	0						
	<25% de los glomérulos presentan inflamación	1						
	26-50% de los glomérulos presentan inflamación	2						
	51-75% de los glomérulos presentan inflamación	3						
	>76% de los glomérulos presentan inflamación	4						
	Sin hemorragia glomerular	0						

Congestión capilar glomerular (hemorragia)	<25% de los glomérulos presentan hemorragia	1							
	26-50% de los glomérulos presentan hemorragia	2							
	51-75% de los glomérulos presentan hemorragia	3							
	>76% de los glomérulos presentan hemorragia	4							
Hiperplasia glomerular Nota: Pérdida del espacio de Bowman	Sin hiperplasia glomerular	0							
	<25% de los glomérulos presentan hiperplasia glomerular	1							
	26-50% de los glomérulos presentan hiperplasia glomerular	2							
	51-75% de los glomérulos presentan hiperplasia glomerular	3							
	>76% de los glomérulos presentan hiperplasia glomerular	4							
Atrofia glomerular Nota: Retracción del penacho glomerular	Sin atrofia glomerular	0							
	<25% de los glomérulos presentan atrofia	1							
	26-50% de los glomérulos presentan atrofia	2							
	51-75% de los glomérulos presentan atrofia	3							
	>76% de los glomérulos presentan atrofia	4							
Alteraciones de la cápsula de Bowman									
Pérdida de las células epiteliales de la cápsula de Bowman	Sin alteraciones en las células epiteliales de la cápsula de Bowman	0							
	<25% de los glomérulos presentan alteraciones en las células epiteliales de la cápsula de Bowman	1							
	26-50% de los glomérulos presentan alteraciones en las células epiteliales de la cápsula de Bowman	2							
	51-75% de los glomérulos presentan alteraciones en las células epiteliales de la cápsula de Bowman	3							
	>76% de los glomérulos presentan alteraciones en las	4							

PARÁMETRO #2. PUNTUACIÓN ENDOTELIAL

INTENSIDAD DEL DAÑO	PUNTAJE	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Ningún daño endotelial	0						
Inflamación endotelial	1						
Ruptura endotelial	2						
Pérdida endotelial	3						

OBSERVACIONES:

PARÁMETRO #3. PUNTUACIÓN TUBULOINTERSTICIAL RENAL

CRITERIOS	INTENSIDAD DEL DAÑO	PUNTAJE	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Degeneración del epitelio tubular Nota: -Pérdida del borde en cepillo de las células epiteliales tubulares -Integridad de la membrana basal (adelgazamiento o engrosamiento)	Sin degeneración del epitelio tubular	0						
	<25% del tejido presenta degeneración del epitelio tubular	1						
	26-50% del tejido presenta degeneración del epitelio tubular	2						
	51-75% del tejido presenta degeneración del epitelio tubular	3						
	>76% del tejido presenta degeneración del epitelio tubular	4						
Atrofia tubular Nota: -Adelgazamiento epitelial -Núcleos picnóticos -Dilatación de la luz del tubulo -Formación de cilindros	Sin atrofia tubular	0						
	<25% del tejido presenta atrofia tubular	1						
	26-50% del tejido presenta atrofia tubular	2						
	51-75% del tejido presenta atrofia tubular	3						
	>76% del tejido presenta atrofia tubular	4						
Infiltración de células inflamatorias tubulo intersticiales Nota: Infiltrado de neutrófilos o de linfocitos	Sin infiltrado inflamatorio	0						
	<25% del tejido presenta infiltrado inflamatorio	1						
	26-50% del tejido presenta infiltrado inflamatorio	2						
	51-75% del tejido presenta infiltrado inflamatorio	3						
	>76% del tejido presenta infiltrado inflamatorio	4						

	células epiteliales de la cápsula de Bowman							
Ensogramiento de la cápsula de Bwoman	Sin alteraciones en la cápsula de Bowman	0						
	<25% de los glomérulos presentan ensogramiento de la cápsula de Bwoman	1						
	26-50% de los glomérulos presentan ensogramiento de la cápsula de Bwoman	2						
	51-75% de los glomérulos presentan ensogramiento de la cápsula de Bwoman	3						
	>76% de los glomérulos presentan ensogramiento de la cápsula de Bwoman	4						
Adelgazamiento de la cápsula de Bwoman	Sin alteraciones en la cápsula de Bowman	0						
	<25% de los glomérulos presentan adelgazamiento de la cápsula de Bwoman	1						
	26-50% de los glomérulos presentan adelgazamiento de la cápsula de Bwoman	2						
	51-75% de los glomérulos presentan adelgazamiento de la cápsula de Bwoman	3						
	>76% de los glomérulos presentan adelgazamiento de la cápsula de Bwoman	4						
Esclerosis glomerular	Sin esclerosis	0						
	<25% de los glomérulos presentan esclerosis	1						
	26-50% de los glomérulos presentan esclerosis	2						
	51-75% de los glomérulos presentan esclerosis	3						
	>76% de los glomérulos presentan esclerosis	4						

Hemorragia tubulointersticial	Sin hemorragia tubulointersticial	0						
	<25% del tejido presenta hemorragia tubulointersticial	1						
	26-50% del tejido presenta hemorragia tubulointersticial	2						
	51-75% del tejido presenta hemorragia tubulointersticial	3						
	>76% del tejido presenta hemorragia tubulointersticial	4						
Necrosis tubulointersticial Nota: *Necrosis coagulativa: -Pérdida del núcleo (cariolisis) -Fragmentación del núcleo (cariorrhexis) -Núcleos pignóticos (encogimiento del núcleo y de aspecto basófilo) -Citoplasmas eosinófilos -Desprendimiento de células hacia la luz del túbulo *Necrosis licuefactiva	Sin necrosis tubulointersticial	0						
	<25% de los túbulos presentan necrosis tubulointersticial	1						
	26-50% de d los túbulos presentan necrosis tubulointersticial	2						
	51-75% de los túbulos presentan necrosis tubulointersticial	3						
	>76% de los túbulos presentan necrosis tubulointersticial	4						
Fibrosis tubulointersticial Nota: -Fibras de colágeno y presencia de fibroblastos	Sin fibrosis	0						
	<25% del tejido presenta fibrosis tubulointersticial	1						
	26-50% del tejido presenta fibrosis tubulointersticial	2						
	51-75% del tejido presenta fibrosis tubulointersticial	3						
	>76% del tejido presenta fibrosis tubulointersticial	4						

Observaciones:

REFERENCIAS

1. Liu, W.; Li, Y.; Xiong, X.; Chen, Y.; Qiao, L.; Wang, J.; Su, X.; Chu, F.; Liu, H. Traditional Chinese Medicine Protects against Hypertensive Kidney Injury in Dahl Salt-Sensitive Rats by Targeting Transforming Growth Factor- β Signaling Pathway. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *131*, 110746, doi:10.1016/j.biopha.2020.110746.
2. Toprak, T.; Sekerci, C.A.; Aydın, H.R.; Ramazanoglu, M.A.; Arslan, F.D.; Basok, B.I.; Kucuk, H.; Kocakgol, H.; Aksoy, H.Z.; Asci, S.S. Protective Effect of Chlorogenic Acid on Renal Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *Arch. Ital. Urol. E Androl.* **2020**, *S2*.
3. Meles, D.K.; Wurlina, W.; Mustofa, I.; Zakaria, S.; Basori, A.; Hariadi, M. ud; Safitri, E.; Cempaka Putri, D.K.S.; Suwasanti, N. Toxicity, Stability and Renal Histopathology of Alkaloid of Jarong (*Achyranthes Aspera* Linn.)(Caryophyllales: Amaranthaceae) Leaf on Mice. *Philipp. J. Vet. Med.* **2018**, *55*.

Anexo 2



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



ANEXO 2 ÍNDICE HISTOPATOLÓGICO DE ARTRITIS

ALUMNO:	Osvaldo Álvarez Cortes
EVALUADOR:	
FECHA:	

	Score	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Inflamación	Ausente	0	F T EF ET	F T EF ET	F T EF ET	F T EF ET	F T EF ET
	Infiltración mínima en tejido periarticular	1	F T EF ET	F T EF ET	F T EF ET	F T EF ET	F T EF ET
	Infiltración leve	2	F T EF ET	F T EF ET	F T EF ET	F T EF ET	F T EF ET
	Infiltración moderada con edema moderado	3	F T EF ET	F T EF ET	F T EF ET	F T EF ET	F T EF ET
	Infiltración marcada con edema marcado	4	F T EF ET	F T EF ET	F T EF ET	F T EF ET	F T EF ET
	Infiltrado severa con edema severo	5	F T EF ET	F T EF ET	F T EF ET	F T EF ET	F T EF ET
	Hemorragia	0-5	F T EF ET	F T EF ET	F T EF ET	F T EF ET	F T EF ET

Observaciones:

		Score	R1				R2				R3				R4				R5				R6			
Formación de Pannus	Ausente	0																								
			F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET
	Infiltración mínima de pannus en cartílago y hueso subcondral	1																								
			F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET
	Infiltración leve (<1/4 de la articulación de rodilla en los bordes)	2																								
			F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET
	Infiltración moderada (1/4 de la articulación de rodilla afectada)	3																								
			F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET
	Infiltración marcada (1/2 a 3/4 de la articulación de rodilla afectada)	4																								
			F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET
	Infiltración severa (>3/4 de la articulación de rodilla afectada y distorsión severa de la arquitectura general)	5																								
			F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET
	Hemorragia en el pannus	0-5																								
			F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET
	Angiogenesis en el pannus	0-5																								

		Score	R1				R2				R3				R4				R5				R6			
Daño del cartilago	Ausente	0	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET
	Pérdida mínima a leve de tinción de safranina sin pérdida de condrocitos ni alteración del colágeno	1	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET
	Pérdida leve de tinción de safranina con pérdida focal de condrocitos y daño al colágeno	2	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET
	Pérdida moderada de tinción con de safranina con pérdida de condrocitos en zona media y daño al colágeno	3	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET
	Pérdida marcada de tinción de safranina con pérdida de condrocitos en zona profunda y daño al colágeno	4	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET
	Pérdida difusa severa de tinción con de safranina con pérdida severa multifocal de condrocitos y/o disrupción del colágeno	5	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET
Membrana sinovial	Hiperplasia de la membrana sinovial	0-5	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET
	Angiogénesis de la membrana sinovial	0-5	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET	F	T	EF	ET

Osvaldo Álvarez Cortés

Actividad antiinflamatoria y antiartrítica evaluada en rata por efecto de polifenoles extraídos por procesamiento ultrasónico ...

 Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid::3117:546238954

Fecha de entrega

14 ene 2026, 1:32 p.m. GMT-6

Fecha de descarga

16 ene 2026, 11:47 a.m. GMT-6

Nombre del archivo

Actividad antiinflamatoria y antiartrítica evaluada en rata por efecto de polifenoles extraídos po....pdf

Tamaño del archivo

3.4 MB

154 páginas

42.426 palabras

234.327 caracteres

24% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- Texto citado
- Texto mencionado
- Coincidencias menores (menos de 10 palabras)

Fuentes principales

- 24%  Fuentes de Internet
- 18%  Publicaciones
- 0%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alerta de integridad para revisión

-  **Caracteres reemplazados**
76 caracteres sospechosos en N.º de páginas
Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
Programa educativo	Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas	
Título del trabajo	Actividad antiinflamatoria y antiartrítica evaluada en rata por efecto de Polifenoles extraídos por procesamiento ultrasónico y nano encapsulados, a partir de hojas de Cedrón <i>Calogyia citriodora</i> Palca	
	Nombre	Correo electrónico
Autor/es	Oswaldo Alvarez Cortes	osvaldo.alvarez@umich.mx
Director	Héctor Eduardo Martínez Flores	hector.martinez.flores@umich.mx
Codirector		
Coordinador del programa	Rodolfo Pérez Rodríguez	doc.ciencias.biotologicas@umich.mx

Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	Sí	Mejora en la redacción

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Traducción al español	NO	
Traducción a otra lengua	SI	Verificación del ingles en Abstract
Revisión y corrección de estilo	SI	Corrección estilo Científico
Análisis de datos	NO	
Búsqueda y organización de información	NO	
Formateo de las referencias bibliográficas	NO	
Generación de contenido multimedia	NO	
Otro	NO	

Datos del solicitante	
Nombre y firma	
Lugar y fecha	Morelia, Michoacan a 12/Enero/2026