

Monitoreo de los componentes mayoritarios del aceite esencial de *Turnera diffusa* incorporado en una nanoemulsión para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea

Ginna Paola Pinto Rueda

Trabajo de Grado para optar al título de Química

Directora

Elena E. Stashenko

Química, *PhD*.

Codirector

Jairo Rene Martínez

Químico, *PhD*.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2025

Agradecimientos

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi familia: Néstor, Yolanda, Cristian y Kevin, por su amor incondicional, paciencia y constante apoyo a lo largo de mi formación profesional. Su compañía fue un pilar esencial durante este camino.

A los profesores Elena Stashenko y Jairo Martínez, por sus observaciones, sugerencias y comentarios durante el desarrollo de esta investigación.

Un agradecimiento especial a Roger y Lady, cuya paciencia, guía y enseñanzas fueron fundamentales para el desarrollo del trabajo. Así mismo, a Silvia por los conocimientos compartidos y a Carolina por su amistad y cariño, quienes representaron un valioso apoyo académico y emocional.

También extendiendo mi gratitud a todas aquellas personas que, directa o indirectamente, colaboraron en la estructuración de ideas, revisión del documento y preparación para la sustentación. Su ayuda fue indispensable para la culminación de esta etapa.

Finalmente, a la Universidad Industrial de Santander, al laboratorio CROM-MASS y al grupo CIBIMOL por el soporte instrumental y el acompañamiento técnico brindado y por haber permitido el desarrollo de esta investigación en sus instalaciones.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	13
1. Marco referencial	15
1.1 Antecedentes	15
1.2 Marco teórico	18
1.2.1 Turnera diffusa willd. ex Shult	18
1.2.2 Técnicas extractivas	21
1.2.3 Técnicas analíticas	22
1.2.3.1 Cromatografía de gases	22
1.2.3.2 Detector selectivo de masas	23
1.2.4 Pruebas de estabilidad	23
2. Objetivos	24
2.1 Objetivo general	24
2.2 Objetivos específicos	24
3. Metodología	25
3.1 Obtención del aceite esencial	25
3.2 Preparación de la nanoemulsión	25
3.3 Extracción de los compuestos volátiles	26
3.4 Análisis químico	27
3.4.1 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	27
3.4.2 Determinación de las condiciones para la extracción de volátiles por HS-SPME	28

3.5 Evaluación de la estabilidad.....	29
4. Resultados y discusión.....	30
4.1 Caracterización química por GC/MS de los compuestos mayoritarios presentes en el AE de T. diffusa.....	30
4.2 Caracterización química por GC/MS de la composición química de la matriz blanco	32
4.3 Análisis estadístico de las variables estudiadas	34
4.3.1 Tiempo de exposición de la fibra SPME a la muestra.....	34
4.3.2 Cantidad de muestra.....	36
4.4 Análisis de la estabilidad química de la nanoemulsión	38
4.4.1 Análisis estadístico para las muestras almacenadas a 25 °C	42
4.4.2 Análisis estadístico para las muestras almacenadas a 40 °C	43
5. Conclusiones.....	56
6. Recomendaciones	57
7. Divulgación de Resultados	58
Referencias Bibliográficas	59
Apéndices.....	65

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Caracterización química por GC/MS de los compuestos mayoritarios de la fracción volátil del AE de <i>T. diffusa</i>	31
Tabla 2. Caracterización química por GC/MS de los compuestos presentes en la fracción volátil de la matriz blanco de NE.....	33
Tabla 3. Cantidad relativa de los compuestos mayoritarios de la fracción volátil de la nanoemulsión, expresada como A_c/A_{ISTD} , obtenida en un periodo de 60 días a 25 y 40 °C.....	41
Tabla 5. Porcentajes de pérdida relativa de los volátiles al día 60 respecto a los valores iniciales a 25 y 40 °C.	54

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Número de publicaciones sobre la incorporación de AE en formulaciones y su estabilidad, en función del tiempo	16
Figura 2.	21
Figura 3. Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (full scan) de la fracción volátil de una muestra de 0,5 mg de AE de T. diffusa.....	30
Figura 4. Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (full scan) de la fracción volátil de una muestra de 50 mg de NE sin AE.....	32
Figura 5. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/MS (full scan) de la fracción volátil de 50 mg de NE variando el tiempo de exposición de la fibra. a). 10 min; b). 20 min; c). 30 min.....	34
Figura 6. Gráfico de cajas y bigotes de la distribución de las áreas cromatográficas relativas en función del tiempo de exposición de la fibra SPME a la muestra (10, 20 y 30 min).	35
Figura 7. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/MS (full scan) de la fracción volátil de la NE variando la cantidad de muestra a 20 min de exposición de la fibra. a). 25 mg; b). 50mg; c). 100 mg	37
Figura 8. Gráfico de cajas y bigotes de la distribución de las áreas cromatográficas relativas en función de la cantidad de muestra (25, 50 y 100 mg) para un tiempo de exposición de 20 min..	38
Figura 9. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/MS (full scan) de la fracción volátil de 100 mg de la NE. a). día cero (NE recién preparada); b). día 60 a 25 °C; c). día 60 a 40 °C	39
Figura 10. Gráfico de cajas y bigotes de la distribución de las áreas cromatográficas relativas en función del día del experimento. a). 25 °C; b). 40 °C.....	40

- Figura 11. Gráfico de la prueba LSD de Fisher para los datos obtenidos a 25 °C. Los días marcados con letras distintas (a, b y c) representan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). 43
- Figura 12. Gráfico de la prueba LSD de Fisher para los datos obtenidos a 40 °C. Los días marcados con letras distintas (a, b y c) representan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) 44
- Figura 13. Comportamiento del 4,5-di-epi-aristolocheno a 25 y 40 °C, y de los demás compuestos volátiles a 25 °C durante el monitoreo de 60 días 46
- Figura 14. Comportamiento de los compuestos volátiles (N.I. M^{+} 204, m/z (48 %), 161 (100 %), coelusión de valenceno y β -selineno y N.I. M^{+} 204, m/z (36 %), 93 (100 %)) con cantidades relativas iniciales entre 1,01 y 3,0 durante el monitoreo de 60 días a 25 y 40 °C. 47
- Figura 15. Comportamiento de los compuestos volátiles (β -elemeno, trans- β -cariofileno y óxido de cariofileno) con cantidades relativas iniciales entre 0,51 y 1,0 durante el monitoreo de 60 días a 25 y 40 °C. 49
- Figura 16. Comportamiento de los compuestos volátiles (N.I. M^{+} 140, m/z (4 %), 43 (100 %), N.I. M^{+} 220, m/z (17 %), 111 (100 %) y dehidrofuquinona) con cantidades relativas iniciales entre 0 y 0,5 durante el monitoreo de 60 días a 25 y 40 °C 51
- Figura 17. Comportamiento del ρ -cimeno durante el monitoreo de 60 días a 25 y 40 °C. 52
- Figura 18. Gráfico de la prueba LSD de Fisher para los datos obtenidos de ρ -cimeno a 40 °C. 53

Lista de apéndices

	Pág.
Apéndice A. Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (<i>full scan</i>) de una muestra de AE de <i>T. diffusa</i>	65
Apéndice B. Resultados del ANOVA obtenidos en Microsoft Excel para el análisis de las áreas relativas de la variación del tiempo de exposición.	66
Apéndice C. Resultados del ANOVA obtenidos en Microsoft Excel para el análisis de las áreas relativas de la variación de la cantidad de muestra.	67
Apéndice D. Resultados del ANOVA obtenidos en Microsoft Excel para el análisis de las áreas relativas de la fracción volátil de la muestra almacenada a 25 °C durante 60 días.	68
Apéndice E. Resultados del ANOVA obtenidos en Microsoft Excel para el análisis de las áreas relativas de la fracción volátil de la muestra almacenada a 40 °C durante 60 días.	69
Apéndice F. Gráfico de la prueba LSD de Fisher para los datos obtenidos del 4,5-di- <i>epi</i> -aristolocheno durante los 60 días de monitoreo. a). 25 °C; b). 40 °C.....	70
Apéndice G. Gráfico de la prueba LSD de Fisher para los datos obtenidos del N.I. M ⁺ 204, <i>m/z</i> (48 %), 161 (100 %) durante los 60 días de monitoreo. a). 25 °C; b). 40 °C.....	71
Apéndice H. Gráfico de la prueba LSD de Fisher para los datos obtenidos de la coelusión de valenceno y β -selineno durante los 60 días de monitoreo. a). 25 °C; b). 40 °C	72
Apéndice I. Gráfico de la prueba LSD de Fisher para los datos obtenidos del N.I. M ⁺ 204, <i>m/z</i> (36 %), 93 (100 %) durante los 60 días de monitoreo. a). 25 °C; b). 40 °C.....	73
Apéndice J. Gráfico de la prueba LSD de Fisher para los datos obtenidos del β -elemeno durante los 60 días de monitoreo. a). 25 °C; b). 40 °C	74

Apéndice K. Gráfico de la prueba LSD de Fisher para los datos obtenidos del <i>trans</i> - β -cariofileno durante los 60 días de monitoreo a 25 °C	75
Apéndice L. Gráfico de la prueba LSD de Fisher para los datos obtenidos del óxido de cariofileno durante los 60 días de monitoreo. a). 25 °C; b). 40 °C.....	76
Apéndice M. Gráfico de la prueba LSD de Fisher para los datos obtenidos del N.I. M ⁺ 140, <i>m/z</i> (4 %), 43 (100 %) durante los 60 días de monitoreo. a). 25 °C; b). 40 °C.....	77
Apéndice N. Gráfico de la prueba LSD de Fisher para los datos obtenidos del N.I. M ⁺ 220, <i>m/z</i> (17 %), 111 (100 %) durante los 60 días de monitoreo. a). 25 °C; b). 40 °C.....	78
Apéndice O. Gráfico de la prueba LSD de Fisher para los datos obtenidos de dehidrofuquinona durante los 60 días de monitoreo. a). 25 °C; b). 40 °C	79

Glosario

AE	Aceite esencial
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agro-industrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales
CIBIMOL	Centro de Investigación en Biomoléculas.
GC	<i>Gas chromatography</i> (Cromatografía de gases).
IRL	Índice(s) de retención lineal(es).
ISTD	<i>Internal standard</i> (Estándar interno).
KOLL	Kolliphor
KTZ	Ketoconazol
LSD	<i>Least significant difference</i> (Diferencia mínima significativa)
MS	<i>Mass spectrometry</i> (Espectrometría de masas)
<i>m/z</i>	Relación masa/carga.
NE	Nanoemulsión
OR	Óleo de ricino
tr	Tiempo de retención.

Resumen

Título: Monitoreo de los componentes mayoritarios del aceite esencial de *Turnera diffusa* incorporado en una nanoemulsión para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea*

Autor: Ginna Paola Pinto Rueda **

Palabras Clave: Aceite esencial, Nanoemulsión, Estabilidad.

Descripción

La encapsulación de aceites esenciales (AE) en nanoemulsiones (NE) surge como una alternativa para superar las limitaciones de volatilidad y baja solubilidad que dificultan su uso en formulaciones farmacéuticas y cosméticas. Sin embargo, la inestabilidad inherente de las NE requiere una caracterización del AE y un monitoreo de sus metabolitos secundarios. Este estudio analizó la estabilidad de los compuestos mayoritarios del AE de *T. diffusa*, destacando el 4,5-di-*epi*-aristolóqueno (33,8 %) como el más abundante. La estabilidad química de la NE se monitoreó durante 60 días, evidenciando una disminución general en las cantidades relativas de los compuestos volátiles. Sin embargo, *ρ*-cimeno, *β*-elemeno y *trans-β*-cariofileno conservaron alrededor del 68 % de sus cantidades iniciales, lo que sugiere una liberación gradual del AE desde las gotículas liposomales generadas durante el proceso de formulación de la NE.

El análisis estadístico mostró que las condiciones seleccionadas de extracción (100 mg de muestra, 20 min de exposición) maximizaron la recuperación de compuestos. Se observó que las condiciones de almacenamiento afectaron significativamente la pérdida de volátiles durante los primeros 32 días. Posteriormente, no hubo diferencias significativas, sugiriendo una estabilización del sistema. Estos resultados respaldan el potencial de las NE para la liberación controlada y estabilidad prolongada del AE de *T. diffusa* en aplicaciones farmacéuticas y cosméticas.

* Proyecto de Grado

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química Directora Elena E. Stashenko Química, PhD. Codirector: Jairo R. Martínez Químico, PhD.

Abstract

Title: Monitoring the major components of *Turnera diffusa* essential oil incorporated into a nanoemulsion for the treatment of cutaneous leishmaniasis*

Author: Ginna Paola Pinto Rueda**

Key Words: Essential oil, Nanoemulsion, Stability.

Description

Encapsulation of essential oils (EO) in nanoemulsions (NE) emerges as an alternative to overcome the limitations of volatility and low solubility that hinder their use in pharmaceutical and cosmetic formulations. However, the inherent instability of NE requires EO characterization and monitoring of its secondary metabolites. This study analyzed the stability of the major compounds in the EO of *T. diffusa*, with 4,5-di-*epi*-aristolochene (33.8 %) being the most abundant. The chemical stability of the NE was monitored over 60 days, showing a general reduction in the relative quantities of volatile compounds. However, *p*-cymene, *β*-elemene, and *trans-β*-caryophyllene retained approximately 68 % of their initial quantities, suggesting a gradual release of EO from the liposomal vesicles generated during the NE formulation process.

Statistical analysis showed that the selected extraction conditions (100 mg sample, 20 min exposure) maximized compound recovery. Storage conditions significantly affected volatile loss during the first 32 days. After this period, no significant differences were observed, indicating system stabilization. These results support the potential of NE for controlled release and long-term stability of *T. diffusa* EO in pharmaceutical and cosmetic applications.

* Project of grade

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química Directora Elena E. Stashenko Química, PhD. Codirector: Jairo R. Martínez Químico, PhD.

Introducción

Los aceites esenciales (AE) son mezclas complejas de compuestos volátiles, que le permiten a la planta defenderse de sus depredadores o comunicarse con su entorno. La composición química de un AE puede variar según el tipo de planta, el tratamiento post-cosecha, la ubicación geográfica, entre otros factores (García Quintero, 2022; Stashenko E. E., 2009).

El uso de los AE con fines medicinales y como alternativas en productos de belleza y cuidado de la piel tiene una larga tradición. Este conocimiento etnobotánico ha generado un creciente interés en la investigación de plantas cuyos aceites esenciales y extractos se puedan emplear como ingredientes activos en diversas industrias (Stashenko E. E., 2009; González-Minero & Bravo-Díaz, 2018; Sinico, y otros, 2005; Bravo & Pereañez, 2016), o como coadyuvantes (Carreño, Stashenko, & Escobar, 2023).

Sin embargo, los AE presentan limitaciones en su incorporación en formulaciones cosméticas y farmacéuticas debido a su volatilidad y baja solubilidad en algunos solventes (Prakash, Baskaran, Paramasivam, & Vadivel, 2018). En la literatura, la encapsulación de los AE en nanoemulsiones (NE) se presenta como una alternativa viable para superar dichas limitaciones (Sinico, y otros, 2005; Donsì, 2011; Henríquez Sanabria, 2022). No obstante, las NE tienden a sufrir desestabilización mediante fenómenos como coalescencia (fusión de gotas), floculación (agregación) o maduración de Ostwald (crecimiento diferencial de gotas) debido a diversas fuerzas en el sistema (Prakash, Baskaran, Paramasivam, & Vadivel, 2018).

Existen diferentes métodos de encapsulación, algunos de los cuales requieren agitación vigorosa o altas temperaturas, lo que puede degradar o volatilizar los metabolitos secundarios y

afectar la concentración y composición del aceite y sus propiedades biológicas (Prakash, Baskaran, Paramasivam, & Vadivel, 2018; Donsi, 2011; Bai, y otros, 2023). Por lo tanto, la caracterización del AE previa a su incorporación y el monitoreo adecuado de los metabolitos secundarios de interés en el tiempo, son esenciales para evaluar si la emulsión sufrió pérdidas durante el proceso de fabricación o si, al someter la emulsión a condiciones específicas de almacenamiento, las gotículas liposomales liberarían gradualmente el aceite (Sinico, y otros, 2005; Karaca, Demirci, & Gavahian, 2023). Este seguimiento permite determinar si los AE conservan las características químicas registradas durante el proceso de selección, cumpliendo con la Directiva 2001/83/CE o la Regulación (EC) No 1223/2009 dictadas por el Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea, en la que se pide que cada producto incluya la información sobre la composición cualitativa y cuantitativa del medicamento, así como la estabilidad del producto bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas. Esta información debe ser verificable y actualizarse constantemente según el tipo de producto (Celeiro, Garcia-Jares, Llompart, & Lores, 2021; Directive, 2001; Regulation, 2009).

Este proyecto tuvo como objetivo determinar los cambios en la composición química de la fracción volátil de una nanoemulsión, desarrollada en colaboración con el Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP), que incorpora el aceite esencial de *T. diffusa* como coadyuvante para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea, con el propósito de monitorear los cambios en los componentes mayoritarios del aceite esencial. De esta manera, se cumpliría con la normativa de la UE relacionada con la composición del medicamento final y se fomentaría el desarrollo de formulaciones con ingredientes naturales como compuestos activos y de menor toxicidad.

Los resultados del monitoreo de la fracción volátil de la nanoemulsión durante el tiempo permiten establecer las bases para determinar la estabilidad de la formulación. Estos hallazgos no solo brindan información crucial para la formulación actual, sino que también aportan perspectivas significativas para el desarrollo futuro de emulsiones en el ámbito farmacéutico y cosmético.

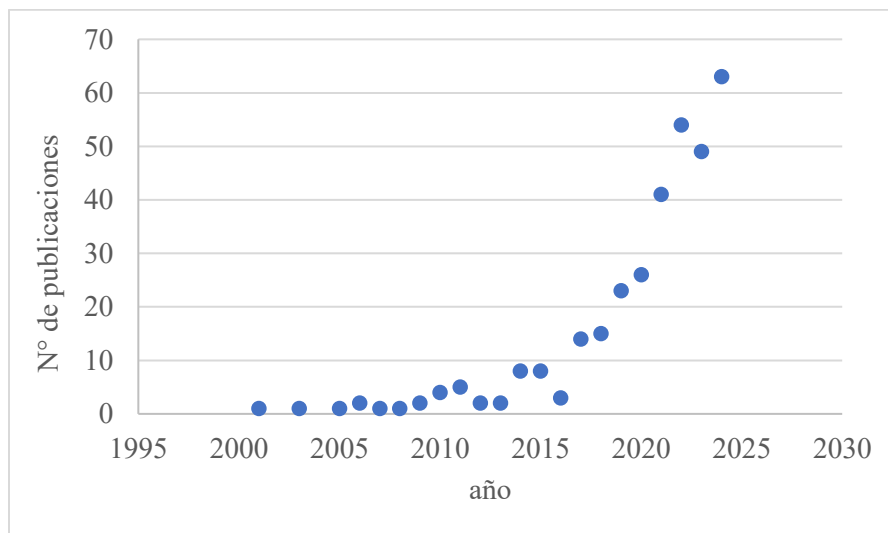
1. Marco referencial

1.1 Antecedentes

Diversos estudios han mostrado el potencial de los aceites esenciales (AE) como ingredientes activos y conservantes naturales en una variedad de productos cosméticos para el cuidado de la piel, perfumería, fármacos, pesticidas, entre otros (Sinico, y otros, 2005; Bolouri, y otros, 2022; Lertsatitthanakorn, Taweechaisupapong, Aromdee, & Khunkitti, 2006; Mossa, 2016). En las últimas dos décadas, la investigación sobre su aplicación en estos ámbitos ha experimentado un notable incremento. Usando la ecuación de búsqueda *TITLE-ABS-KEY* (“*essential oils*” *AND incorporation AND stability*) en la base de datos *Scopus* (*Elsevier*) se encontraron alrededor de 326 publicaciones entre 2001-2024. Los artículos se relacionan con el monitoreo de AE y su incorporación en diversas formulaciones.

Figura 1.

Número de publicaciones sobre la incorporación de AE en formulaciones y su estabilidad, en función del tiempo



Nota. Tomado de: Scopus (Elsevier). Periodo de búsqueda: 2001-2024. Fecha de consulta: 5 de mayo de 2025. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (“essential oils” AND incorporation AND stability).

Algunos estudios, como el realizado por C. Sinico *et al.* (2005) investigaron la influencia de la estructura y composición de las gotículas sobre la actividad antiviral *in vitro* del aceite de *Artemisia arborescens L.* incorporado. Se llevó a cabo un análisis de estabilidad en el que se monitorearon diferentes formulaciones que contenían AE encapsulado, almacenadas a 5 ± 1 °C. Técnicas como la microscopía de transmisión electrónica (TEM) y la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con trampa de iones (GC/ITMS), revelaron que el tamaño de las gotículas y la retención de los compuestos mayoritarios del AE en los liposomas se mantuvieron estables durante los primeros 6 meses. Después de este período, se observó una disminución en las concentraciones de AE, reteniendo hasta el 92 % de las concentraciones iniciales. Además, el

estudio *in vitro* reveló que las formulaciones que contenían liposomas de mayor tamaño tuvieron mayor actividad antiviral en comparación con la administración directa del AE al cultivo.

F. Donsi *et al.* (2011), encapsularon D-limoneno y una mezcla de terpenos extraídos de *Melaleuca alternifolia* en diversas formulaciones. La emulsión más efectiva fue incorporada en jugos de naranja y pera para prevenir el crecimiento microbiano, sin alterar sus propiedades organolépticas. Los resultados obtenidos mediante GC/MS de las emulsiones sugieren que algunos compuestos activos se degradan durante el proceso de nanoencapsulación debido al estrés fluidodinámico. Las matrices de jugos que contenían nanocápsulas de terpenos fueron almacenadas a 32 °C y demostraron que, a concentraciones de 1,0 g/L, se retrasa el crecimiento microbiano, mientras que a 5,0 g/L se inactivan por completo los microorganismos, con un mínimo impacto en sus propiedades organolépticas.

En el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM), Henríquez Sanabria J. C. *et al.* (2022) llevaron a cabo un estudio, en el cual evaluaron la estabilidad y las propiedades antioxidantes de una microemulsión que contenía extractos y AE de plantas aromáticas que crecen en Santander. La fórmula que mostró los resultados preliminares más favorables fue sometida a pruebas de estabilidad, en las cuales se expuso la muestra a tres condiciones de almacenamiento (5, 25 y 40 °C) durante un período de 30 días. Los resultados revelaron que después de los 30 días, las microemulsiones almacenadas a 25 y 40 °C no mostraron cambios en la cantidad del ingrediente activo, a diferencia de la muestra almacenada a 5 °C. Sin embargo, también se evaluaron la estabilidad del pH, la viscosidad, la conductividad y la actividad antioxidante. Los resultados de estas pruebas mostraron variaciones en las muestras almacenadas a 5 y 40 °C de aproximadamente un 3 % en la actividad antioxidante.

Muehlmann *et al.* (Muehlmann, y otros, 2015) Estudiaron la emulsificación espontánea de una nanoemulsión (NE) compuesta por aceite de ricino y Cremophor ELP, empleada como vehículo para fármacos como el cloruro de ftalocianina de aluminio (AlPc), con el objetivo de mejorar sus propiedades farmacocinéticas y prevenir la agregación. La estabilidad coloidal de la NE se evaluó durante un año, almacenando las muestras en condiciones de oscuridad a temperaturas de 4, 25 y 37 °C. Se observó que el diámetro hidrodinámico de las nanogotas en la formulación con AlPc era de aproximadamente 25 nm y se mantuvo estable durante el período de almacenamiento en todas las temperaturas. Además, se evidenció que la NE mostraba una notable actividad fotodinámica *in vitro* sobre células cancerosas, en contraste con el fármaco no encapsulado.

Estos estudios demuestran la versatilidad y el potencial de los AE en diversas aplicaciones, destacando la importancia de la encapsulación y la estructura de las formulaciones para garantizar la estabilidad y eficacia de los productos. Los hallazgos pueden tener implicaciones significativas en el desarrollo de productos más eficientes de diferentes industrias (Carreño, Stashenko, & Escobar, 2023; Bolouri, y otros, 2022; Lertsatitthanakorn, Taweechaisupapong, Aromdee, & Khunkitti, 2006; Mossa, 2016; Muehlmann, y otros, 2015)

1.2 Marco teórico

1.2.1 *Turnera diffusa willd. ex Shult*

T. diffusa, conocida comúnmente como "Damiana", es una planta nativa mesoamericana que crece de forma silvestre en zonas áridas y semiáridas, principalmente en México (Alcaraz

Meléndez & Véliz Murillo, 2006). Es un arbusto pequeño que mide entre 30 cm y 2 m, caducifolio, altamente ramificado, con tallos de color amarillo a pardo rojizo (Alcaraz Melendez, 1999). Sus hojas son lanceoladas, con bordes serrados, y tienen una longitud que oscila entre los 10 y 25 mm (Urbizu-González, Flores, Rosa-Manzano, & Castillo-Ruíz, 2019). Las flores son amarillas y axilares, con cinco pétalos, y tienen un tamaño de entre 8 y 12 mm. El fruto se presenta en forma de cápsula ovoide, con un radio de 4 a 6 mm (Alcaraz Melendez, 1999).

Antiguamente, los mayas utilizaban la planta como tratamiento para el vértigo y la pérdida del equilibrio (Zhao, Pawar, Ali, & Khan, 2007). A lo largo del tiempo, ha sido comúnmente empleada como expectorante, para tratar el resfriado común, desequilibrios hormonales, depresión, trastornos nerviosos y menstruales, así como para incrementar el deseo sexual como bebida afrodisíaca (Szewczyk & Zidorn, 2014).

En la literatura se han reportado las composiciones del AE de *T. diffusa* obtenido de partes aéreas frescas en diversos estudios. Dos investigaciones realizadas en Colombia encontraron composiciones diferentes. En 2017 Ríos N. *et al.* (2017), identificaron los siguientes compuestos: Drima-7,9-(11)-dieno (22,9 %), β -viridifloreno (6,6 %) y *trans*- β -cariofileno (5,2 %). Por otro lado, C. García *et al.* (2022), identificaron los siguientes componentes: aristolocheno (18,3 %), dehidrofuquinona (16,9 %) y γ -gurjuneno (7,1 %). Además, en 2004 un estudio realizado en México por Alcaraz M. *et al.* (2004), informó sobre la composición del AE de *T. diffusa*, en el que encontraron los siguientes compuestos: óxido de cariofileno (12,6 %), *trans*- β -cariofileno (5 %) y β -elemeno (4 %) como compuestos mayoritarios.

Algunas limitaciones de los estudios con AE, es que pueden mostrar variaciones en su composición debido a factores como la ubicación geográfica y las condiciones climáticas en las

que se desarrolla la planta, el método de destilación, entre otros. Por lo que se debe considerar la procedencia de los estudios al interpretar los resultados (Stashenko E. E., 2009).

Actualmente se está investigando el potencial terapéutico del AE de *T. diffusa* contra distintos virus, bacterias, insectos, entre otros (Lim, Chieng, & Pan, 2021; Duque, y otros, 2023). Silva-Trujillo *et al.* (2022) reportaron, por primera vez, diferencias en la actividad antiviral asociadas al contenido de monoterpenos y sesquiterpenos presentes en los AE. El estudio, reveló el AE de *T. diffusa*, rico en alcoholes monoterpénicos, mostró una fuerte actividad antiviral contra el virus del dengue, mientras que otro AE de *T. diffusa* con niveles más bajos de monoterpenos oxigenados resultó inactivo.

Carreño *et al.* (2023) investigaron el efecto de algunos AE en la penetración transdérmica de fármacos. Los resultados mostraron que el AE de *T. diffusa* fue uno de los que mejoró significativamente los valores de flujo de estado estacionario y los coeficientes de permeabilidad de la cafeína. Además, a una concentración del 1 %, no se observó irritación de la piel con este AE, lo cual sugirió que podría utilizarse potencialmente en tratamientos prolongados de hasta 21 días en humanos.

Figura 2.

Flor de la planta Turnera diffusa Willd. ex Shult



Taxonomía	
Reino	Plantae
Familia	Passifloraceae
Género	<i>Turnera</i>
Especie	<i>Turnera diffusa</i>

Nota. Fotografía tomada por Ginna Paola PINTO RUEDA, en el jardín botánico “Un mundo en un Jardín”. CIBIMOL, CENIVAM; UIS, Bucaramanga, 26-05-2023.

1.2.2 Técnicas extractivas

Para monitorear los volátiles, es necesario realizar un pretratamiento de la muestra que permita aislar las sustancias de interés. Algunos de los métodos utilizados para este propósito incluyen la destilación con vapor (SD), la extracción asistida por radiación de microondas (MWAE), la extracción líquido-líquido (LLE), la extracción en fase sólida (SPE) y la microextracción en fase sólida (SPME). La elección del método de aislamiento depende de factores como la naturaleza química de los compuestos, su concentración en la mezcla, el tipo de matriz y el objetivo del experimento (Stashenko & Martínez, 2011).

La SPME en el modo *headspace* (HS) es una técnica ampliamente utilizada para la extracción de compuestos volátiles. Requiere una menor cantidad de muestra a diferencia de otras técnicas extractivas, ya que, no solo extrae los volátiles, sino que también los concentra en una

fibra expuesta al espacio de cabeza. Esto permite obtener señales cromatográficas con mayor abundancia en comparación con la inyección directa. Además, la SPME es una técnica selectiva y sensible gracias a la variedad de fibras que pueden adaptarse a la naturaleza de la muestra y a los compuestos de interés (Stashenko & Martínez, 2009; Stashenko & Martínez, 2007).

1.2.3 Técnicas analíticas

1.2.3.1 Cromatografía de gases. La cromatografía de gases (GC) es un método de separación que permite identificar los componentes presentes en una mezcla y su proporción. Esta técnica consiste en transferir la muestra, utilizando un gas de arrastre, a la columna cromatográfica donde ocurre la separación. La elección de la columna depende del analito de interés y puede variar según el tipo de fase estacionaria, su composición química, polaridad, longitud y diámetro interno (Stashenko & Martínez, 2009; Stashenko & Martínez, 2009; Gomis Yagües, 2008).

La GC se utiliza, principalmente, para el análisis de compuestos volátiles y termoestables, los cuales deben tener temperaturas de ebullición inferiores a 250 °C y un peso molecular que no supere los 300 Da. Por lo tanto, es una herramienta analítica adecuada para la identificación de la composición química de los AE, debido a las mezclas complejas de metabolitos secundarios y rango de masas de sus componentes (Stashenko & Martínez, 2011).

El análisis de sustancias volátiles se utiliza en diversas áreas, incluyendo el monitoreo y la caracterización química de productos naturales, como los metabolitos secundarios, así como en el control de calidad de productos finales, como perfumes, solventes residuales y productos de aseo personal, entre otros (Sinico, y otros, 2005; Prakash, Baskaran, Paramasivam, & Vadivel, 2018; Donsì, 2011).

1.2.3.2 Detector selectivo de masas. El detector selectivo de masas (MSD) es un detector espectrométrico que proporciona información de los analitos, relacionada con la masa molecular, composición elemental, grupos funcionales y, en algunos casos, la geometría e isomería espacial de las moléculas (Stashenko & Martínez, 2009).

La selectividad del detector depende de su respuesta ante sustancias que contienen átomos específicos como nitrógeno, fósforo o azufre, así como sustancias que presentan fragmentos estructurales particulares (Stashenko & Martínez, 2009).

En el MSD, se produce la ionización de la muestra. Los iones generados son extraídos de la cámara de ionización por una serie de electrodos que los coliman y aceleran, formando un haz iónico dirigido hacia el analizador de masas, el cual es responsable de separar los iones en función de su relación masa/carga (m/z). Finalmente, el espectro de masas se genera al procesar la corriente iónica total en función del tiempo (Stashenko & Martínez, 2010).

1.2.4 Pruebas de estabilidad

Las pruebas de estabilidad en productos farmacéuticos o cosméticos se llevan a cabo con el propósito de obtener información sobre la vida media de dichos productos, permitiendo determinar su tiempo de vida útil y su fecha de caducidad bajo condiciones específicas de envasado y almacenamiento. Estas pruebas pueden realizarse tanto a largo plazo, proporcionando datos significativos para la formulación, como de forma acelerada, siendo esta última la opción más común debido a su capacidad para agilizar la notificación oportuna de la fecha de caducidad en la producción cosmética. El método acelerado implica la exposición de los productos a condiciones

de temperatura y humedad diferentes a las del laboratorio donde se realicen las pruebas (Iskandarsyah & Rahman, 2018).

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Determinar la estabilidad química de los compuestos principales del aceite esencial de *T. diffusa* incorporado en una nanoemulsión como coadyuvante para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea.

2.2 Objetivos específicos

Identificar los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de *T. diffusa* utilizando métodos cromatográficos y espectrométricos.

Implementar técnicas extractivas para monitorear los compuestos volátiles del aceite esencial de *T. diffusa* incorporado en una nanoemulsión.

Comparar la fracción volátil del prototipo farmacéutico durante el periodo de almacenamiento mediante GC/MS, con el fin de determinar si hubo pérdidas o degradación de los metabolitos provenientes del aceite esencial.

3. Metodología

3.1 Obtención del aceite esencial

La obtención del AE se llevó a cabo utilizando cultivos disponibles en las parcelas experimentales del Jardín Botánico "Un Mundo en un Jardín", que forma parte del Centro de Investigación CENIVAM (CIBIMOL). El proceso de destilación se realizó mediante arrastre de vapor en un alambique de acero inoxidable con una capacidad de 0,1 m³, equipado con un condensador de tubos y carcasas. El vapor de agua necesario para la destilación se generó en una caldera pirotubular vertical, la cual, se mantuvo a un flujo constante de 200 mL/min. Posteriormente, la mezcla resultante de hidrolato y aceites esenciales se separó en un vaso florentino mediante el método de decantación. La humedad se eliminó utilizando sulfato de sodio anhidro y se procedió a su almacenamiento en frascos de vidrio ámbar, los cuales fueron conservados en una nevera a una temperatura constante de 3 °C hasta su uso posterior.

3.2 Preparación de la nanoemulsión

La NE fue preparada por Heider Carreño *et al.*, en el Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP), siguiendo el protocolo propuesto por Muehlmann *et al.* [19] con algunas variaciones. Para su elaboración, se mezclaron el óleo de ricino (OR) y el kolliphor (Koll) en proporción 1:3 empleando agitación magnética por 20 min. Posteriormente, a 10,6 g de esta mezcla se adicionaron 0,150 g de ketoconazol (KTZ), continuando con la agitación

magnética por 20 min y se calentó aproximadamente a 40 °C hasta disolverlo. A la solución resultante se adicionaron 0,3 g de AE de *T. diffusa* y 18,94 g de agua destilada, manteniendo agitación magnética constante a 120 rpm. La solución se dejó en reposo por 24 horas a temperatura ambiente (24 ± 3 °C) para la formación espontánea de las nanocápsulas. Como control, se preparó una NE sin KTZ ni AE, que se utilizó como matriz blanco.

3.3 Extracción de los compuestos volátiles

La extracción de los compuestos volátiles se llevó a cabo mediante *HS*-SPME siguiendo el protocolo propuesto por Stashenko *et al.* (2009). Las variables que se estudiaron previamente fueron: cantidad de la muestra y tiempo de exposición de la fibra SPME a la muestra.

Para ello, se añadieron 100 mg de la muestra a un vial de 15 mL, el cual se calentó indirectamente por convección térmica de aceite mineral a 60 °C durante 10 min. Posteriormente, se expuso una fibra recubierta de divinilbenceno-carboxeno-polidimetilsiloxano (CAR/DVB/PDMS, 50/30 μ m Supelco S.A., EE. UU.) al espacio de cabeza durante un periodo de 20 min. Los compuestos volátiles resultantes se desorbieron en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases a 250 °C durante 20 min. En el proceso de cuantificación, se emplearon 2 mg del estándar interno (*n*-tetradecano), que se introdujo en un vial de 4 mL y se expuso a la fibra durante 3 min antes de la muestra. Este procedimiento también se realizó para el blanco de la matriz estudiada.

3.4 Análisis químico

3.4.1 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La identificación de los compuestos volátiles en cada una de las muestras se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). Se empleó un cromatógrafo de gases (GC 6890 *System Plus*, *Agilent Technologies*, AT, Palo Alto, CA, EE. UU.), acoplado a un detector selectivo de masas (MSD 5973 *Network*, AT, Palo Alto, CA, EE. UU.), equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250 °C, relación *split* 1:30), como gas de arrastre se usó helio (99,995 %, gas AP, Messer, Bogotá, Colombia), con una velocidad de flujo de 1 mL/min. La separación de los componentes se llevó a cabo en dos columnas: una apolar DB-5MS (J&W, Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) con fase estacionaria de 5 %-fenil-poli(metilsiloxano) de 60 m x 0,2mm, d.i. x 0,25 µm, df, y una columna polar, DB-WAX (J&W, Scientific, Folsom, CA, EE.UU.), con fase estacionaria de polietilenlicol de 60 m x 0,25 mm, D.I. x 0,25 µm, df. El procesamiento de datos se hizo por medio del *software* MSDChemStation G1701DA (AT, Palo Alto, CA, EE. UU.). La identificación tentativa se hizo comparando los índices de retención lineales (IRL), calculados a partir de una mezcla de hidrocarburos, C₆-C₂₅, y los espectros de masas obtenidos por ionización con electrones de 70 eV, que fueron comparados con los de las bases de datos Adams, Babushok y NIST (Adams, 2007; Babushok & Linstrom, 2011; NIST, 2023).

3.4.2 Determinación de las condiciones para la extracción de volátiles por HS-SPME

Se utilizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) para evaluar el efecto del tiempo de exposición de la fibra SPME a la muestra (10, 20 y 30 minutos) y la cantidad de muestra (25, 50 y 100 mg) sobre la cantidad de compuestos volátiles extraídos. Cada dato se obtuvo por triplicado. Durante la evaluación del tiempo de exposición, se emplearon 50 mg de nanoemulsión, mientras que, al evaluar el efecto de la cantidad de muestra, se mantuvo constante un tiempo de exposición de 20 minutos. Los cálculos se realizaron utilizando Microsoft Excel, con un nivel de significancia establecido en $p < 0,05$. Para identificar diferencias significativas entre las medias, se aplicó la prueba de diferencia mínima significativa de Fisher (LSD, por sus siglas en inglés). Donde se realizó la diferencia entre todas las parejas de medias y se comparó con el valor LSD obtenido con la Ecuación 1.

$$LSD = t_{\alpha,gl} * \sqrt{\frac{2 * ECM}{n}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

$t_{\alpha,gl}$ = es el valor crítico de t para el nivel de significancia α (0.05) y los grados de libertad del error (6)

ECM = error cuadrático medio

n = número de datos

3.5 Evaluación de la estabilidad

Se evaluó la estabilidad del AE encapsulado en la NE mediante el seguimiento de una matriz blanco y de otra matriz con AE al 1 %. Ambas matrices se almacenaron en viales de 2 mL, cada uno con una alícuota de 0,5 mL, y se sometieron a dos condiciones de almacenamiento: (1) a temperatura ambiente (24 ± 3 °C) y (2) en una cámara de calor (Serie FD *Classic Line*, *Binder GmbH*, Tuttlingen, Alemania) a 40 ± 3 °C.

Durante el experimento, se empleó el método de muestreo de *HS-SPME* en conjunto con la técnica *GC/MS* para determinar la composición de la fracción volátil del AE de *T. diffusa* encapsulado en la NE, siguiendo el procedimiento detallado en la **sección 3.3**. En cada día que se realizaron las mediciones se utilizó un vial diferente que mantenía las mismas condiciones. De esta forma se evitó el crecimiento de microorganismos no deseados. La cuantificación de los compuestos identificados se llevó a cabo mediante la normalización simple de las áreas de los picos cromatográficos de cada muestra, expresando los resultados en relación al área del estándar interno. Este procedimiento se repitió para las muestras almacenadas a las dos temperaturas mencionadas en diferentes intervalos durante un periodo de 60 días, correspondientes a los días 0, 4, 7, 10, 25, 32, 52 y 60, según la disponibilidad del equipo.

Posteriormente, se realizó el monitoreo de los compuestos mediante la comparación de los resultados obtenidos utilizando un análisis estadístico ANOVA, para evaluar el efecto que tiene la temperatura en la cantidad de compuestos volátiles extraídos a lo largo del tiempo.

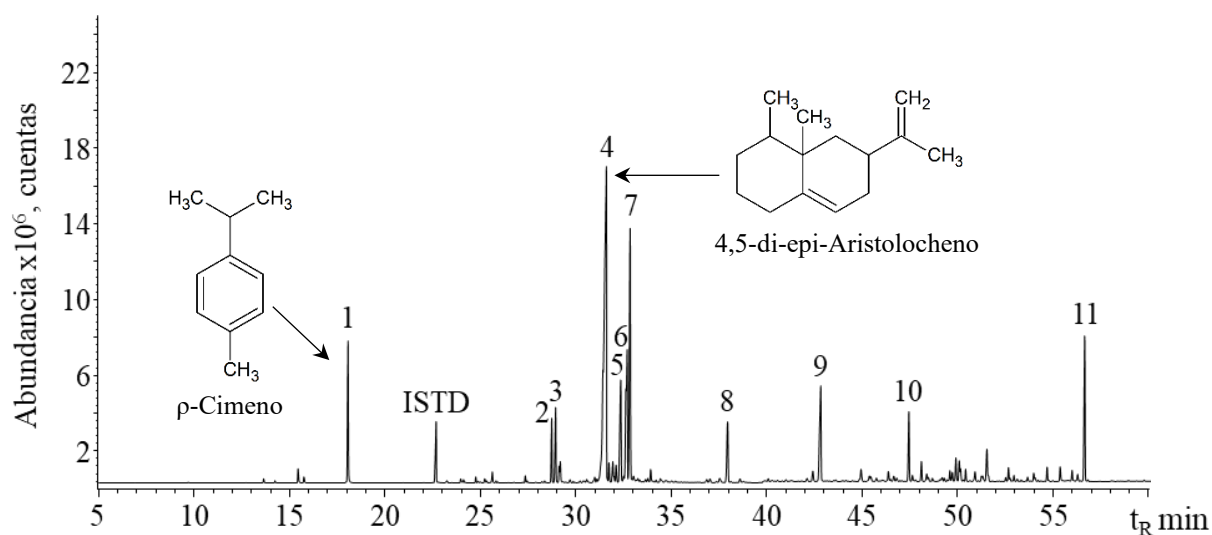
4. Resultados y discusión

4.1 Caracterización química por GC/MS de los compuestos mayoritarios presentes en el AE de *T. diffusa*

La identificación de los compuestos mayoritarios presentes en el AE de *T. diffusa*, se realizó mediante GC/MS, según lo descrito en la Sección 3.4.1. El perfil cromatográfico obtenido con la columna DB-WAX se muestra en la Figura 3. El obtenido con la columna DB-5MS se encuentra en el Anexo 1.

Figura 3.

Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (full scan) de la fracción volátil de una muestra de 0,5 mg de AE de *T. diffusa*



Nota. Columna DB-WAX (60 m), inyección split 1:30. ISTD: n-tetradecano 2 mg.

Se seleccionaron 11 compuestos mayoritarios con áreas cromatográficas relativas superiores al 2 %, correspondientes al 88,22 % del área cromatográfica total, los cuales fueron monitoreados a lo largo del estudio. Entre estos, los tres compuestos más abundantes fueron el 4,5-di-*epi*-aristolocheno (33,8 %), C₁₅H₂₄ [*m/z* 204 (36 %), 161 (66 %), 133 (62 %) and 93 (100 %)] (11,3 %) y la coelución de valenceno y β -selineno (8,7 %), como se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1.

Caracterización química por GC/MS de los compuestos mayoritarios de la fracción volátil del AE de T. diffusa

N° de pico	<i>t_R</i> , min	Compuesto	Índices de retención lineales (IRL)				Área relativa, % DB-WAX
			DB-WAX		DB-5MS		
			Exp.	Lit.	Exp.	Lit.	
1	18,1	ρ -Cimeno ^{a, b}	1268	1270 [37]	1026	1020 [36]	5,2
2	28,9	β -Elemeno ^{a, b}	1591	1591 [37]	1393	1389 [36]	2,2
3	29,2	<i>trans</i> - β -Cariofileno ^{a, b}	1597	1599 [37]	1429	1420 [37]	3,0
4	31,9	4,5-di- <i>epi</i> -Aristolocheno ^{a, b}	1688	-	1481	1471 [36]	33,8
5	32,8	N.I. M ⁺ 204, <i>m/z</i> (48 %), 161 (100 %)	1713	-	-	-	5,6
6	33,2	Coelución de Valenceno y β -Selineno ^{a, b}	1723	1717 [37]	1498	1489 [36]	8,7
7	33,3	N.I. M ⁺ 204, <i>m/z</i> (36 %), 93 (100 %)	1728	-	-	-	11,3
8	39,3	N.I. M ⁺ 140, <i>m/z</i> (4 %), 43 (100 %)	1867	-	-	-	3,3
9	43,8	Óxido de cariofileno ^{a, b}	1983	1986 [37]	1593	1581 [37]	6,1
10	48,2	N.I. M ⁺ 220, <i>m/z</i> (17 %), 111 (100 %)	2111	-	-	-	3,0
11	57	Dehidrofuquinona ^{a, b}	2456	-	1821	1820 [38]	6,1

Nota. ^a Identificación tentativa basada en los espectros de masas (MS, EI, 70 eV, coincidencia >90 %), ^b

Identificación tentativa basada en los IRL, medidos en columnas DB-WAX y DB-5MS. ([36] Adams, 2007;

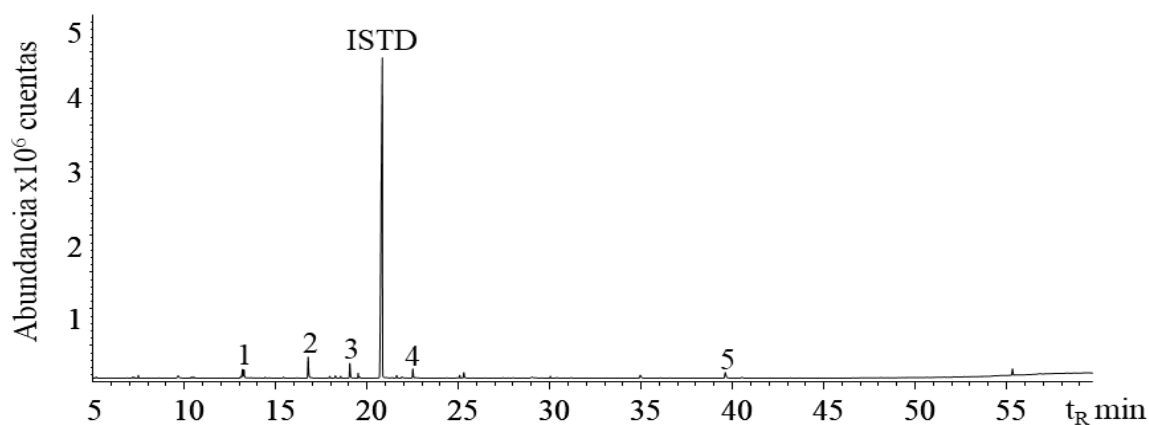
[37] Babushok *et al.*, 2011; [38] NIST 2023).

4.2 Caracterización química por GC/MS de la composición química de la matriz blanco

La identificación de los compuestos presentes en la fracción volátil de la matriz blanco de la NE, se realizó mediante GC/MS, según lo descrito en la Sección 3.4.1. El perfil cromatográfico obtenido con la columna DB-WAX se muestra en la Figura 4. En la Tabla 3 se presenta la caracterización de los compuestos encontrados en la matriz blanco.

Figura 4.

Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (full scan) de la fracción volátil de una muestra de 50 mg de NE sin AE.



Nota. Columna DB-WAX (60 m), inyección *split* 1:30. ISTD: *n*-tetradecano 2 mg.

Tabla 2.

Caracterización química por GC/MS de los compuestos presentes en la fracción volátil de la matriz blanco de NE.

N° de pico	t _R , min	Compuesto	Índices de retención lineales (IRL)		Cantidad relativa, A _c /A _{ISTD} $\bar{X} \pm S$, (n=1)
			DB-WAX		
			Exp.	Lit.	
1	13,2	Heptanal ^{a, b}	1185	1185 [37]	0,018
2	16,8	2-Octanona ^{a, b}	1286	1314 [38]	0,039
3	19,1	1-Hexanol ^{a, b}	1351	1351 [37]	0,028
4	22,5	1-Heptanol ^{a, b}	1453	1448 [37]	0,015
5	39,6	Ácido heptanóico ^{a, b}	1953	1950 [37]	0,016

Nota. ^a Identificación tentativa basada en los espectros de masas (MS, EI, 70 eV, coincidencia >90 %), ^b Identificación tentativa basada en los IRL, medidos en columnas DB-WAX y DB-5MS. ([37] Babushok *et al.*, 2011; [38] NIST 2023).

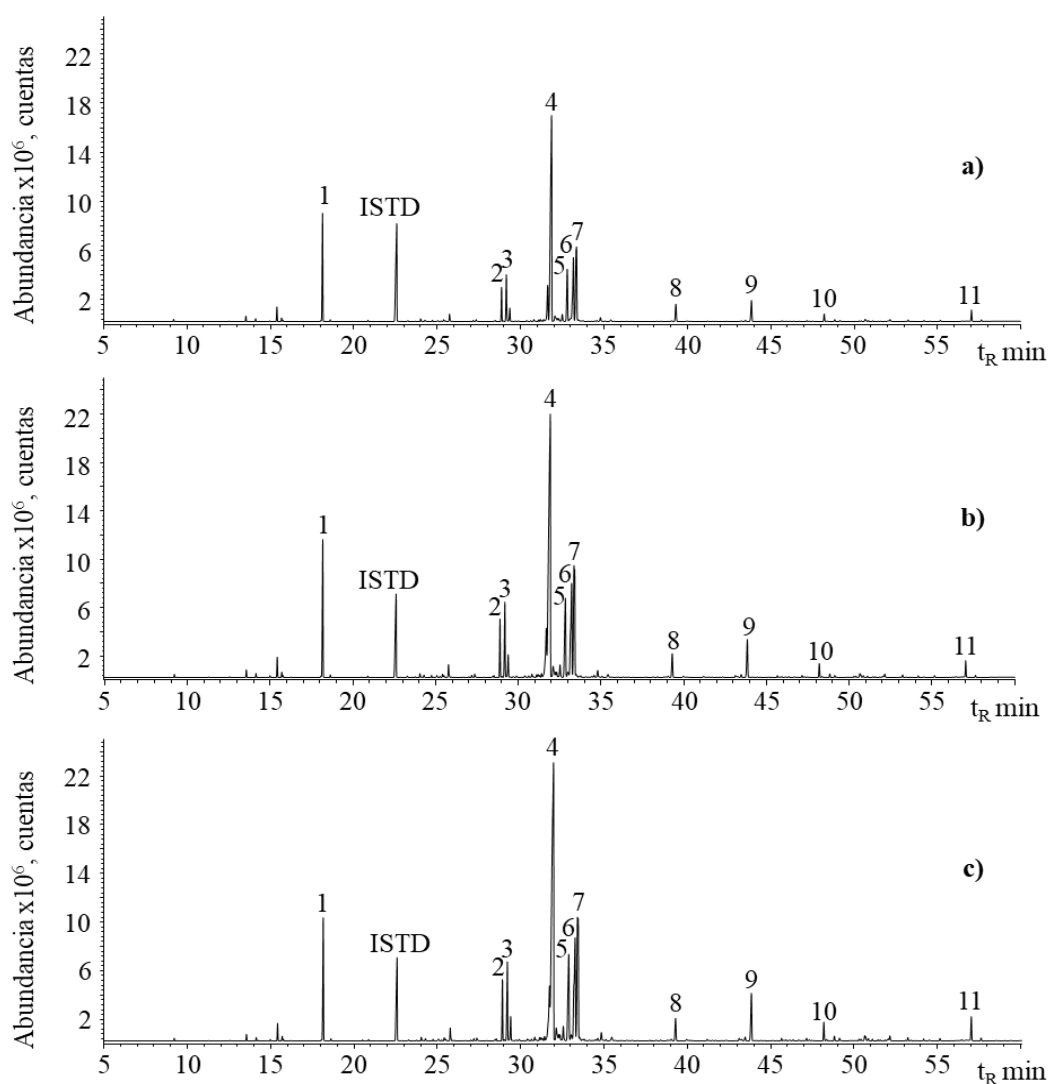
Para la obtención del perfil cromatográfico de la matriz blanco se utilizaron 2 mg del estándar interno, según el procedimiento planteado en la Sección 3.3. Las cantidades relativas al ser inferiores a 0,05 sugieren que el perfil volátil de la matriz no interfiere con el del AE.

4.3 Análisis estadístico de las variables estudiadas

4.3.1 Tiempo de exposición de la fibra SPME a la muestra

Figura 5.

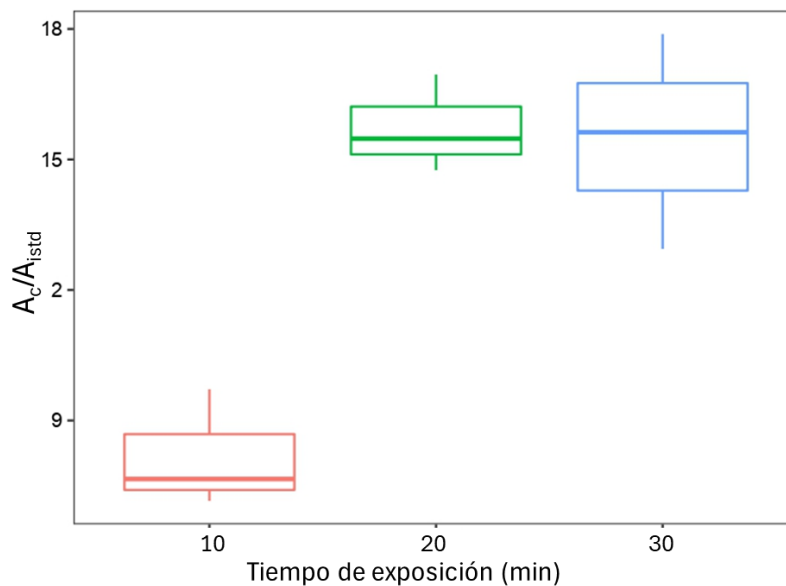
Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/MS (full scan) de la fracción volátil de 50 mg de NE variando el tiempo de exposición de la fibra. a). 10 min; b). 20 min; c). 30 min.



Nota. Columna DB-WAX (60 m), inyección split 1:30. ISTD: n-tetradecano 2 mg.

Figura 6.

Gráfico de cajas y bigotes de la distribución de las áreas cromatográficas relativas en función del tiempo de exposición de la fibra SPME a la muestra (10, 20 y 30 min).



En la Figura 5 se presentan los perfiles cromatográficos obtenidos para la fracción volátil de la NE, en los que se observan diferencias en las intensidades relativas de los compuestos volátiles extraídos al variar el tiempo de exposición en 10, 20 y 30 min. Estas diferencias también se reflejan en la Figura 6, donde se visualizan las distribuciones de las áreas cromatográficas relativas para cada tiempo de exposición. El gráfico evidencia un incremento en las medianas al pasar de 10 a 20 y 30 min.

El análisis estadístico ANOVA, confirmó diferencias significativas en la cantidad de compuestos volátiles extraídos en función del tiempo de exposición. El valor calculado de F ($F_{cal} = 17,99$) fue superior al valor crítico ($F_{crit} = 5,14$), y el valor de p obtenido ($p = 0,003$) indica que al menos uno de los grupos tiene una media diferente. Los resultados del ANOVA obtenido en Microsoft Excel se encuentran en el Anexo 2.

Se aplicó la prueba LSD, obteniéndose un valor de 3,50 (Ecuación 1). Se compararon las medias correspondientes a los intervalos de tiempo 10–20 min, 20–30 min y 10–30 min. La diferencia entre las medias de 20 y 30 min fue 0,25; lo cual, al ser menor que el valor calculado, indica que estas medias no son significativamente diferentes. En cambio, al comparar los resultados de 10 min con los de 20 y 30 min, las diferencias superaron el valor crítico. En función de estos resultados, se determinó que un tiempo de exposición de 20 min es adecuado para la extracción de compuestos volátiles, ya que mejora el proceso al reducir el tiempo de exposición sin generar diferencias significativas en los resultados.

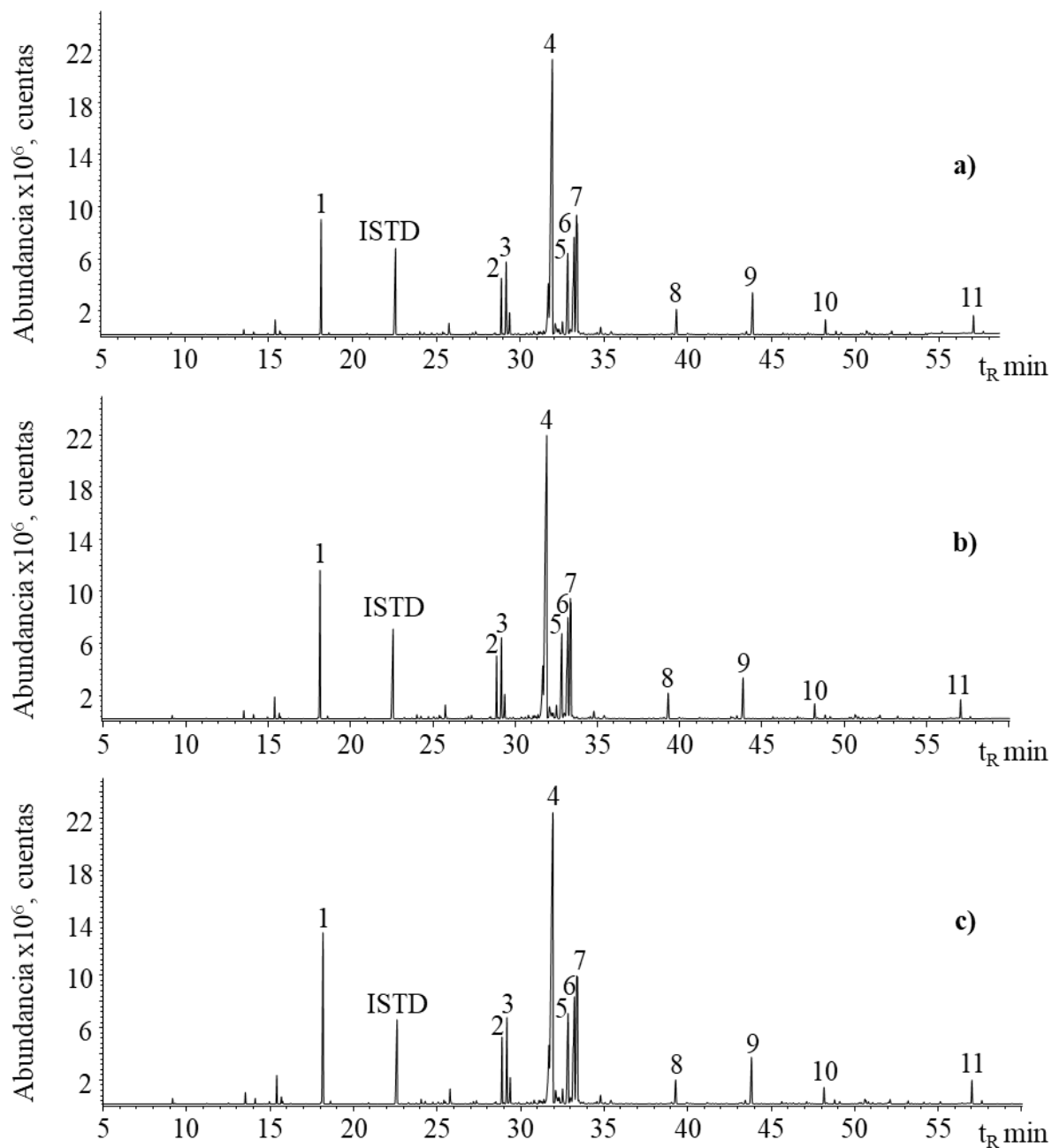
4.3.2 Cantidad de muestra

En la Figura 7 se presentan los cromatogramas correspondientes a la fracción volátil de la nanoemulsión, obtenidos al variar la cantidad de muestra entre 25, 50 y 100 mg. Se observan diferencias en las intensidades relativas de los compuestos volátiles extraídos, siendo más intensas con mayores cantidades de muestra. Estas variaciones también se evidencian en la Figura 8, donde el gráfico de cajas y bigotes muestra un aumento en las medianas al incrementar la cantidad de muestra, el cual fue mayor entre 50 y 100 mg.

El análisis estadístico ANOVA, comprobó que la cantidad de muestra tiene un efecto significativo en la extracción de compuestos volátiles. El valor calculado de F ($F_{cal} = 6,13$) fue superior al valor crítico ($F_{crit} = 5,14$), y el valor de p obtenido ($p = 0,035$) indica diferencias significativas entre las medias de al menos uno de los grupos. Los resultados del ANOVA obtenido en Microsoft Excel se encuentran en el Anexo 3.

Figura 7.

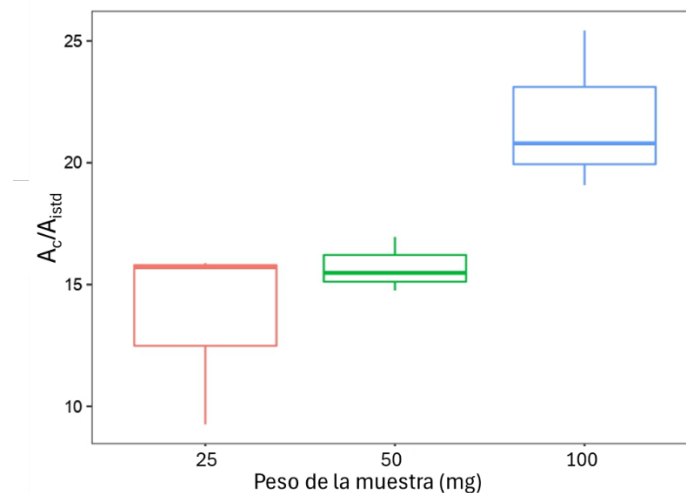
Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/MS (full scan) de la fracción volátil de la NE variando la cantidad de muestra a 20 min de exposición de la fibra. a). 25 mg; b). 50mg; c). 100 mg



Nota. Columna DB-WAX (60 m), inyección split 1:30. ISTD: n-tetradecano 2 mg.

Figura 8.

Gráfico de cajas y bigotes de la distribución de las áreas cromatográficas relativas en función de la cantidad de muestra (25, 50 y 100 mg) para un tiempo de exposición de 20 min.



La prueba LSD permitió identificar las combinaciones específicas que presentaban diferencias significativas. El valor crítico calculado con la Ecuación 1 fue 5,91. La comparación entre las medias de 25 y 50 mg arrojó una diferencia de 2,11; menor que el valor crítico, indicando que no existen diferencias significativas entre estas cantidades de muestra. Sin embargo, las comparaciones con los resultados de 100 mg mostraron diferencias que superaron este umbral, por lo que se determinó que 100 mg es la cantidad de muestra apropiada para la extracción de compuestos volátiles.

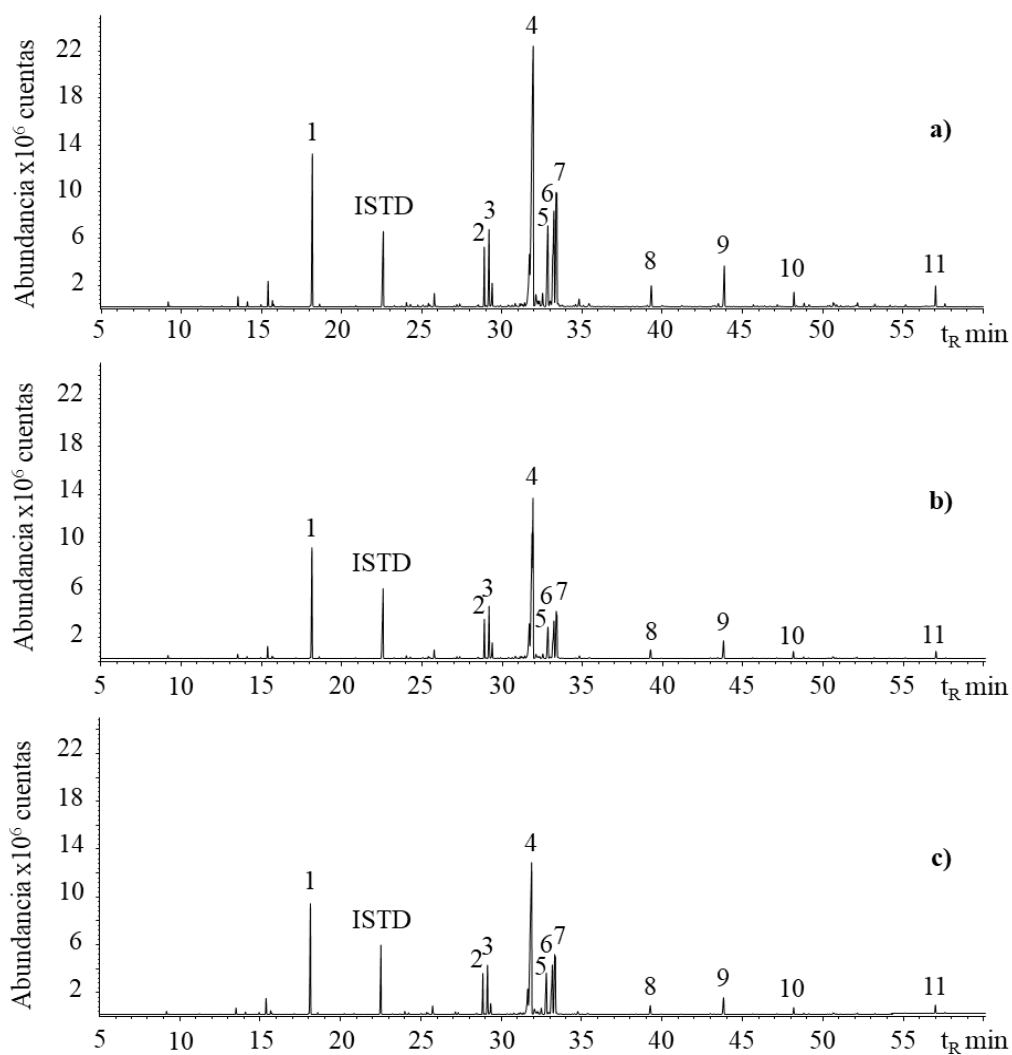
4.4 Análisis de la estabilidad química de la nanoemulsión

Para el análisis de la estabilidad, se utilizaron los resultados obtenidos en las pruebas preliminares, tomando como datos iniciales las variables definidas en la Sección 4.3. En la Figura

9 se presentan los cromatogramas de la fracción volátil de la NE correspondientes al día cero y al día 60 de almacenamiento para las dos temperaturas estudiadas, donde se observa una disminución general en las abundancias de las señales cromatográficas monitoreadas.

Figura 9.

Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/MS (full scan) de la fracción volátil de 100 mg de la NE. a). día cero (NE recién preparada); b). día 60 a 25 °C; c). día 60 a 40 °C

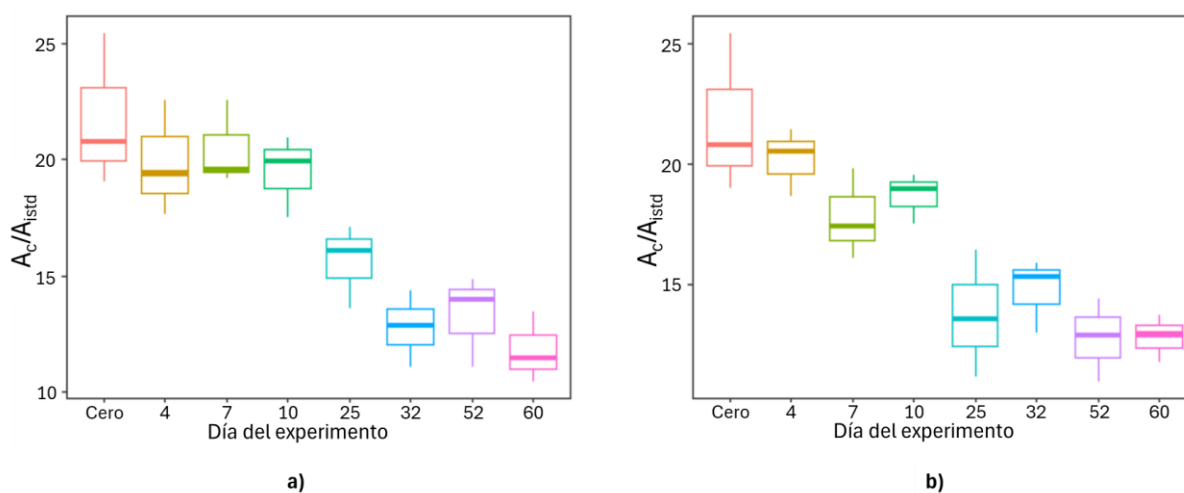


Nota. Columna DB-WAX (60 m), inyección split 1:30.

La variabilidad de los resultados a lo largo del tiempo se muestra en la Figura 10. A 25 °C, los resultados sugieren una disminución progresiva de las áreas relativas de los compuestos presentes en la fracción volátil de la NE, mientras que a 40 °C se observa una rápida pérdida inicial de volátiles, seguida de una estabilización en los valores promedio hacia el final del experimento.

Figura 10.

Gráfico de cajas y bigotes de la distribución de las áreas cromatográficas relativas en función del día del experimento. a). 25 °C; b). 40 °C.



Las cantidades relativas de los compuestos mayoritarios de la fracción volátil de la NE se presentan en la Tabla 3. A 25 °C las cantidades relativas totales disminuyen de manera gradual a lo largo del periodo de estudio. En contraste, a 40 °C, la pérdida de compuestos volátiles es más pronunciada entre los días diez y 25, lo que podría indicar una mayor susceptibilidad a temperaturas elevadas.

Tabla 3.

Cantidad relativa de los compuestos mayoritarios de la fracción volátil de la nanoemulsión, expresada como A_c/A_{ISTD} , obtenida en un periodo de 60 días a 25 y 40 °C.

N° de pico	Compuesto	Cantidad relativa, $A_c/A_{ISTD} \bar{X} \pm S$, (n=3)							
		Día cero		Día 4		Día 7		Día 10	
		25 °C	40 °C	25 °C	40 °C	25 °C	40 °C	25 °C	40 °C
1	ρ -Cimeno	1,7 ± 0,3	1,5 ± 0,1	1,7 ± 0,2	1,6 ± 0,1	1,35 ± 0,07	1,5 ± 0,2	1,6 ± 0,2	
2	β -Elemeno	0,58 ± 0,09	0,54 ± 0,06	0,54 ± 0,03	0,56 ± 0,04	0,47 ± 0,05	0,53 ± 0,04	0,56 ± 0,04	
3	<i>trans</i> - β -Cariofileno	0,9 ± 0,1	0,80 ± 0,08	0,79 ± 0,05	0,83 ± 0,05	0,70 ± 0,08	0,79 ± 0,06	0,85 ± 0,06	
4	4,5-di- <i>epi</i> -Aristolocheno	7 ± 1,1	6,7 ± 0,8	6,8 ± 0,5	6,8 ± 0,5	6,0 ± 0,7	6,6 ± 0,5	6,8 ± 0,5	
5	N.I. M ⁺ 204, m/z (48 %), 161 (100 %)	1,4 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,25 ± 0,08	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	
6	Coelución de Valenceno y β -Selineno	1,94 ± 0,3	1,8 ± 0,2	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,7 ± 0,2	
7	N.I. M ⁺ 204, m/z (36 %), 93 (100 %)	2,5 ± 0,4	2,3 ± 0,3	2,3 ± 0,1	2,3 ± 0,3	2,0 ± 0,2	2,2 ± 0,3	2,3 ± 0,3	
8	N.I. M ⁺ 140, m/z (4 %), 43 (100 %)	0,33 ± 0,06	0,30 ± 0,03	0,32 ± 0,04	0,32 ± 0,03	0,27 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,246 ± 0,008	
9	Óxido de cariofileno	0,62 ± 0,09	0,6 ± 0,1	0,60 ± 0,04	0,57 ± 0,08	0,52 ± 0,06	0,53 ± 0,08	0,53 ± 0,09	
10	N.I. M ⁺ 220, m/z (17 %), 111 (100 %)	0,18 ± 0,02	0,16 ± 0,04	0,17 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,15 ± 0,03	
11	Dehidrofuquinona	0,23 ± 0,03	0,21 ± 0,07	0,24 ± 0,03	0,21 ± 0,05	0,19 ± 0,03	0,18 ± 0,03	0,19 ± 0,05	
	Total	17 ± 2,8	16 ± 2,1	17 ± 1,2	16 ± 1,5	14 ± 1,6	15 ± 1,5	16 ± 1,6	

N° de pico	Compuesto	Cantidad relativa, $A_c/A_{ISTD} \bar{X} \pm S$, (n=3)							
		Día 25		Día 32		Día 52		Día 60	
		25 °C	40 °C	25 °C	40 °C	25 °C	40 °C	25 °C	40 °C
1	ρ -Cimeno	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,4	1,2 ± 0,3	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,5 ± 1,3	1,4 ± 0,4	1,4 ± 0,1
2	β -Elemeno	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,34 ± 0,07	0,47 ± 0,03	0,42 ± 0,02	0,39 ± 0,08	0,37 ± 0,05	0,43 ± 0,04
3	<i>trans</i> - β -Cariofileno	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,71 ± 0,05	0,63 ± 0,05	0,5 ± 0,2	0,56 ± 0,02	0,62 ± 0,06
4	4,5-di- <i>epi</i> -Aristolocheno	6 ± 1,1	5 ± 1,8	4,2 ± 0,7	5,3 ± 0,6	4,2 ± 0,4	4 ± 1,0	3,7 ± 0,5	4,6 ± 0,4
5	N.I. M ⁺ 204, m/z (48 %), 161 (100 %)	1,0 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1
6	Coelución de Valenceno y β -Selineno	1,3 ± 0,2	1,0 ± 0,3	1,1 ± 0,3	1,2 ± 0,3	1,1 ± 0,4	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2
7	N.I. M ⁺ 204, m/z (36 %), 93 (100 %)	1,7 ± 0,3	1,3 ± 0,5	1,5 ± 0,3	1,4 ± 0,3	1,5 ± 0,5	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,2
8	N.I. M ⁺ 140, m/z (4 %), 43 (100 %)	0,24 ± 0,03	0,22 ± 0,05	0,25 ± 0,05	0,25 ± 0,05	0,22 ± 0,07	0,18 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,138 ± 0,007
9	Óxido de cariofileno	0,44 ± 0,05	0,3 ± 0,2	0,41 ± 0,07	0,37 ± 0,02	0,33 ± 0,1	0,33 ± 0,06	0,25 ± 0,02	0,28 ± 0,05
10	N.I. M ⁺ 220, m/z (17 %), 111 (100 %)	0,10 ± 0,01	0,12 ± 0,05	0,11 ± 0,02	0,08 ± 0,03	0,09 ± 0,04	0,11 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,01
11	Dehidrofuquinona	0,17 ± 0,04	0,15 ± 0,08	0,15 ± 0,02	0,09 ± 0,03	0,11 ± 0,05	0,11 ± 0,02	0,10 ± 0,05	0,13 ± 0,01
	Total	13 ± 2,3	11 ± 2,2	10 ± 2,0	12 ± 1,7	10 ± 2,0	10 ± 1,9	9 ± 1,7	10 ± 1,2

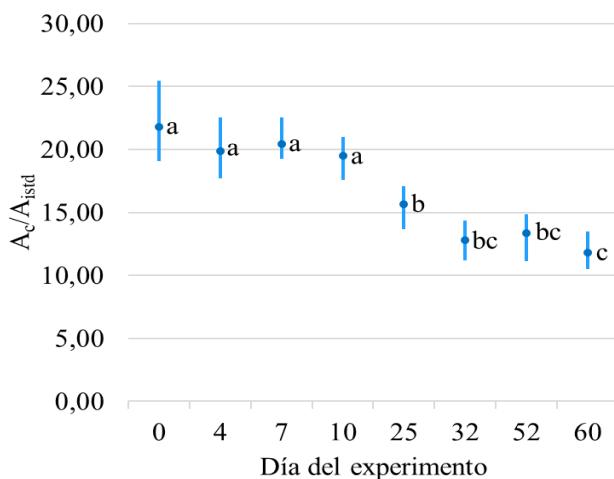
4.4.1 Análisis estadístico para las muestras almacenadas a 25 °C

El análisis estadístico ANOVA, mostró que el tiempo de almacenamiento a 25 °C tiene un efecto significativo en la extracción de compuestos volátiles. El valor calculado de F ($F_{cal} = 10,76$) fue superior al valor crítico ($F_{crit} = 2,66$), y el valor de p obtenido ($p = 0,000052$) fue menor que el valor establecido en la Sección 3.4.2, lo cual que indica que hay diferencias significativas entre las medias de al menos uno de los grupos. Los resultados del ANOVA obtenido en Microsoft Excel se encuentran en el Anexo 4.

Se identificaron las combinaciones específicas que presentaban diferencias significativas utilizando la prueba LSD. Con base en la Ecuación 1 se calculó un valor crítico de 3,60. Las diferencias entre las medias de los grupos fueron evaluadas, asignando la misma letra a aquellos conjuntos de datos donde dichas diferencias no se consideraron estadísticamente significativas según el valor crítico calculado. Los días que presentan más de una letra (por ejemplo, el día 32, que tiene las letras 'b' y 'c') indican que esos días pertenecen a la intersección de dos grupos, como se muestra en la Figura 11. Los resultados (pertenecientes al grupo c) indican que las cantidades relativas obtenidas a partir del día 32 no presentan diferencias significativas.

Figura 11.

Gráfico de la prueba LSD de Fisher para los datos obtenidos a 25 °C. Los días marcados con letras distintas (a, b y c) representan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).



4.4.2 Análisis estadístico para las muestras almacenadas a 40 °C

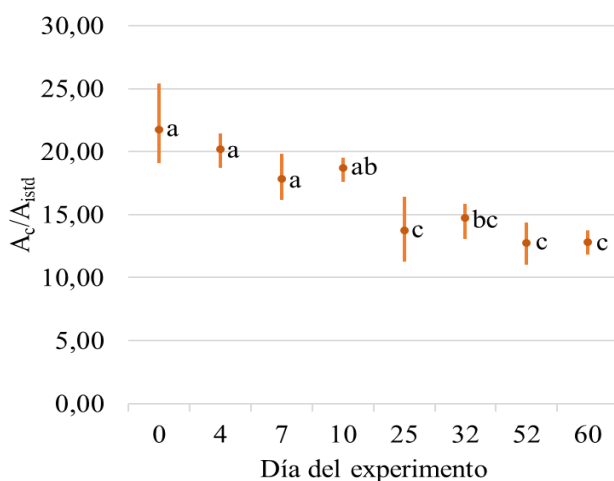
El análisis estadístico ANOVA reveló que el tiempo de almacenamiento a 40 °C tiene un efecto significativo en la extracción de compuestos volátiles. El valor de F calculado ($F_{cal} = 9,88$) superó el valor crítico ($F_{crit} = 2,66$), y el valor de p obtenido ($p = 0,000087$) fue inferior al nivel de significancia especificado en la Sección 3.4.2. Esto confirma la presencia de diferencias significativas entre las medias de al menos uno de los grupos analizados. Los resultados completos del ANOVA, realizado en Microsoft Excel se encuentran en el Anexo 5.

La prueba LSD identificó las combinaciones específicas que presentaban diferencias significativas. Utilizando la Ecuación 1 se calculó un valor crítico de 3,34. Las medias de los grupos fueron comparadas, asignando una misma letra a los conjuntos de datos cuyas diferencias no fueron estadísticamente significativas con respecto al valor crítico. La asignación de grupos se

muestra en la Figura 12. Los resultados indican que las cantidades relativas obtenidas a partir del día 25 no presentan diferencias significativas.

Figura 12.

Gráfico de la prueba LSD de Fisher para los datos obtenidos a 40 °C. Los días marcados con letras distintas (a, b y c) representan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$)



Los resultados evidenciaron una pérdida inicial en las cantidades relativas de los compuestos N.I. $M^{++} 204$ (m/z 36 %), 93 (100 %); N.I. $M^{++} 140$ (m/z 4 %), 43 (100 %); óxido de cariofileno; N.I. $M^{++} 220$ (m/z 17 %), 111 (100 %) y dehidrofuquinona tras el proceso de encapsulación. Esta pérdida podría atribuirse a las condiciones de preparación de la NE, que implicaron un aumento de temperatura y agitación constante durante 24 horas. Entre los compuestos analizados, la dehidrofuquinona mostró la mayor disminución inicial, pasando del 6 % en la composición total del AE al 1 % en la NE.

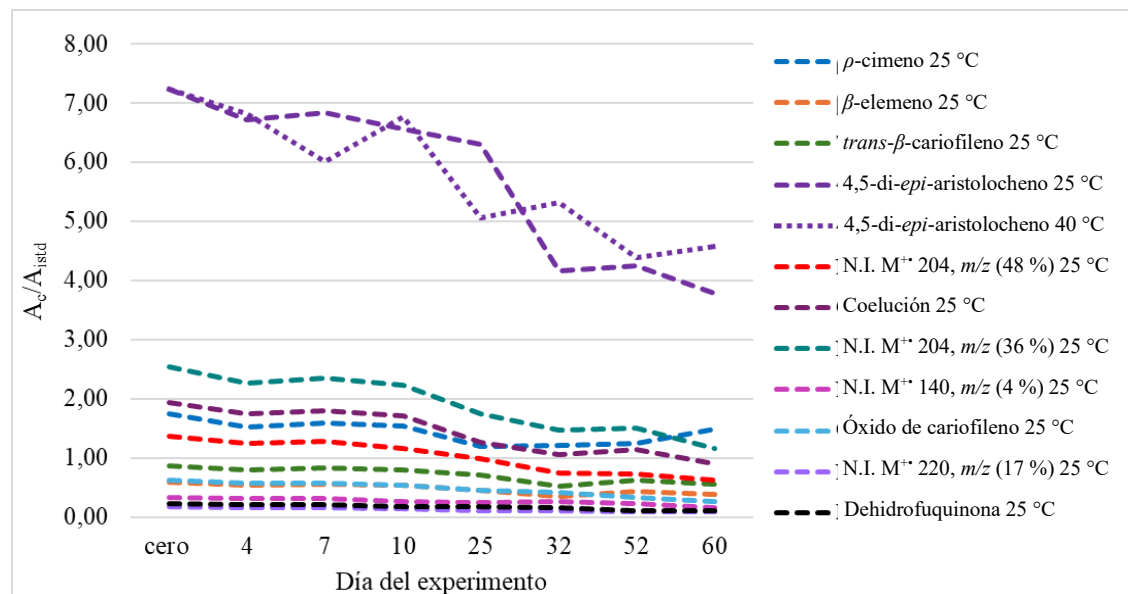
En las Figuras 13 a 17 se ilustra el comportamiento de los compuestos volátiles a lo largo del tiempo. La Figura 13 presenta el comportamiento del compuesto mayoritario, el 4,5-di-*epi*-

aristolocheno, a temperaturas de 25 °C y 40 °C, junto con los otros diez compuestos estudiados a 25 °C. Para facilitar la interpretación de las tendencias, los compuestos se agruparon según sus cantidades relativas en el día cero. La Figura 14 incluye los compuestos con valores entre 1,01 y 3,0; la Figura 15 aquellos con valores entre 0,51 y 1,0; y la Figura 16 los compuestos con valores entre 0 y 0,5. Cabe destacar que el comportamiento del ρ -cimeno fue único, ya que presentó una disminución inicial seguida de un incremento en su cantidad relativa hacia el final del experimento. Este patrón contrastó con el observado en los demás compuestos, por lo que se analizó de forma independiente, Figura 17.

El análisis estadístico ANOVA reveló que la mayoría de los compuestos presentaron diferencias significativas en sus cantidades relativas a lo largo del tiempo. Sin embargo, el ρ -cimeno a 25 °C y el *trans*- β -cariofileno a 40 °C no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$). Para los compuestos que sí presentaron diferencias significativas, se realizó una prueba *post hoc* (LSD) para identificar los días específicos en los que estas variaciones ocurrieron. Al realizar las diferencias entre las medias, según el valor de LSD calculado, se formaron grupos designados con las letras a, b, c, d y e, según corresponda, como se muestran en los Anexos 6-15.

Figura 13.

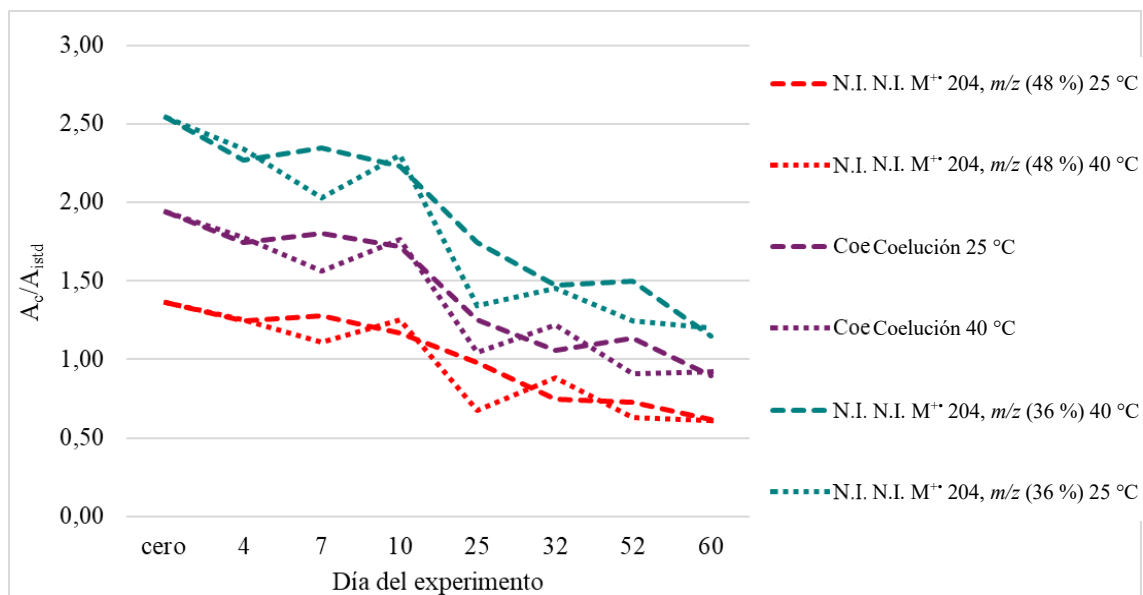
Comportamiento del 4,5-di-*epi*-aristolocheno a 25 y 40 °C, y de los demás compuestos volátiles a 25 °C durante el monitoreo de 60 días



En la Figura 13 se presentan los resultados del compuesto 4,5-di-*epi*-aristolocheno, que mostró diferencias significativas a ambas temperaturas. A 25 °C, el compuesto mostró una disminución del 47 % durante el experimento. El valor crítico en la prueba LSD fue de 1,36. Los resultados indican que no hubo diferencias significativas entre el día cero y el día 25, donde tuvo una pérdida de volátiles de 13 % hasta esta fecha, ni entre el día 32 y el día 60. A 40 °C, la disminución promedio fue del 37 %, el valor crítico fue de 1,64, y los resultados indican que no hay diferencias significativas entre el día cero y el día diez, donde la pérdida fue de 6,6 %, ni entre el día 25 y el día 60. Las gráficas de las pruebas LSD se encuentran en el Anexo 6.

Figura 14.

Comportamiento de los compuestos volátiles (N.I. $M^{+} 204$, m/z (48 %), 161 (100 %), coelusión de valenceno y β -selineno y N.I. $M^{+} 204$, m/z (36 %), 93 (100 %)) con cantidades relativas iniciales entre 1,01 y 3,0 durante el monitoreo de 60 días a 25 y 40 °C.



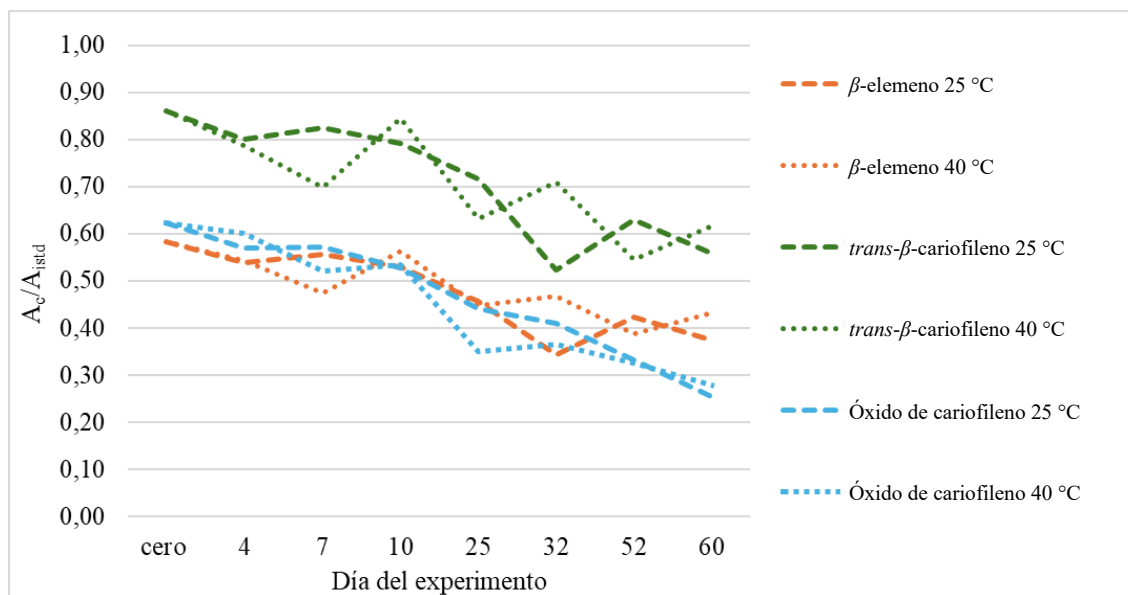
Los compuestos N.I. $M^{+} 204$, m/z (48 %), la coelusión de valenceno y β -selineno y N.I. $M^{+} 204$, m/z (36 %) mostraron un comportamiento similar entre sí, caracterizado por una tendencia decreciente a lo largo del tiempo tanto a 25 °C como a 40 °C, como se puede ver en la Figura 14. El análisis ANOVA reveló diferencias significativas en las cantidades relativas de estos tres compuestos, lo que indica que las variaciones observadas no son aleatorias, sino influenciadas por las condiciones de almacenamiento. En promedio, el compuesto N.I. $M^{+} 204$, m/z (48 %) disminuyó un $54,9 \pm 0,6$ %, la coelusión de valenceno y β -selineno un $53,1 \pm 0,8$ %, y el compuesto N.I. $M^{+} 204$, m/z (36 %) un $53 \pm 1,3$ %. Las pérdidas porcentuales fueron similares al comparar los datos iniciales y finales a ambas temperaturas, lo que sugiere que estos compuestos son igualmente sensibles a las condiciones de almacenamiento estudiadas.

Los resultados de la prueba LSD para estos tres compuestos mostraron que, desde el día cero hasta el día diez, no hubo diferencias significativas, agrupando estos días en un mismo grupo. Durante este período, las pérdidas porcentuales promedio en todas las condiciones fueron de $10 \pm 2,38$ %. A partir del día 25, las diferencias comenzaron a variar más. Para el compuesto N.I. $M^{+} 204$, m/z (48 %), a 25°C no se observaron diferencias significativas a partir del día 32, mientras que a 40°C no hubo diferencias significativas desde el día 52. En el caso de la coelusión de valenceno y β -selineno, a ambas temperaturas no se encontraron diferencias significativas desde el día 25. Por último, el compuesto N.I. $M^{+} 204$, m/z (36 %) a 25°C no mostró diferencias significativas a partir del día 32, mientras que a 40°C no hubo diferencias desde el día 25. Estos resultados indican que, aunque los compuestos comparten una tendencia decreciente general, sus patrones de estabilización pueden variar según la temperatura, el tiempo de almacenamiento o la naturaleza química del compuesto. Las gráficas de las pruebas LSD se presentan en los Anexos 7-9.

En la Figura 15 se muestra el comportamiento de los compuestos β -elemeno, *trans*- β -cariofileno y óxido de cariofileno a lo largo del tiempo a 25°C y 40°C . Los compuestos β -elemeno y *trans*- β -cariofileno presentaron pérdidas totales similares al día 60. A 25°C , ambos compuestos tuvieron una pérdida porcentual de $35,6 \pm 0,6$ %, mientras que a 40°C la pérdida fue de $27 \pm 1,8$ %. El análisis ANOVA mostró diferencias significativas para ambos compuestos, excepto para el *trans*- β -cariofileno a 40°C , donde no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, la gráfica muestra una tendencia decreciente similar a la del β -elemeno, por lo que se sugiere que la falta de significancia estadística podría deberse a una alta variación dentro de los grupos, lo que resultó en un valor de F menor.

Figura 15.

Comportamiento de los compuestos volátiles (β -elemeno, $trans$ - β -cariofileno y óxido de cariofileno) con cantidades relativas iniciales entre 0,51 y 1,0 durante el monitoreo de 60 días a 25 y 40 °C.



Para el β -elemeno, los resultados de las pruebas LSD indican que, tanto a 25 °C como a 40 °C, no hubo diferencias significativas entre el día cero y el día diez, con pérdidas menores al 9 % en este período. A partir del día 25 hasta el día 60, tampoco se observaron diferencias significativas entre los días, y en este lapso ocurrió la mayor pérdida de volátiles. En el caso del $trans$ - β -cariofileno a 25 °C, las pruebas LSD mostraron que no hubo diferencias significativas entre el día cero y el día 25, con una pérdida de volátiles del 16,8 % en este período. A partir del día 32 hasta el día 60, tampoco se encontraron diferencias significativas, y en este lapso ocurrió el resto de las pérdidas de volátiles.

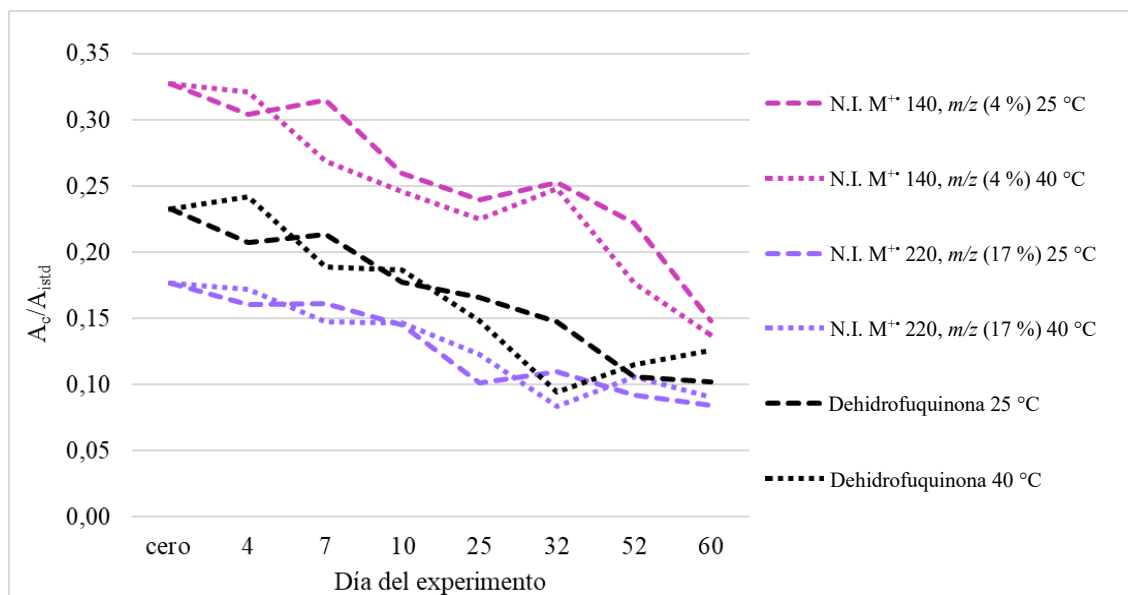
Por otro lado, el análisis ANOVA para el óxido de cariofileno mostró diferencias significativas y este compuesto presentó pérdidas porcentuales totales similares para ambas

temperaturas ($57 \pm 2,7$ %). Los resultados de las pruebas LSD indican que, desde el día cero hasta el día diez, no hubo diferencias significativas para ninguna de las temperaturas y tuvo una pérdida de $14,7 \pm 0,5$ %. A 25 °C, los días 25 a 52 no mostraron diferencias significativas entre sí, y tampoco hubo diferencias entre el día 52 y el día 60. A 40 °C, no se observaron diferencias significativas entre el día 25 y el día 60. Para una visualización detallada de la distribución de los grupos, se puede consultar la gráfica LSD que se presenta en los Anexos 10-12.

Los análisis ANOVA de los compuestos N.I. M^+ 140, m/z (4 %); N.I. M^+ 220, m/z (17 %) y dehidrofuquinona revelaron diferencias significativas en las cantidades relativas de los tres compuestos, como se puede ver en la Figura 16. El compuesto N.I. M^+ 140, m/z (4 %) presentó una disminución promedio del 56 ± 2.3 % en ambas temperaturas. A 25 °C, la prueba LSD mostró que no hubo diferencias significativas entre el día cero y el día diez, período durante el cual se perdió el 20,7 % de la cantidad relativa inicial. Posteriormente, no se detectaron diferencias significativas entre el día diez y el día 52. Sin embargo, el día 60 mostró diferencias significativas con todos los días anteriores, indicando que la tendencia podría seguir decreciente. A 40 °C, no hubo diferencias significativas entre el día cero y el día siete (pérdida de volátiles del 17.8 %), tampoco se encontraron diferencias significativas entre los días del siete al 32 y finalmente entre el día 52 y 60. La gráfica de la prueba LSD se encuentra en el Anexo 13.

Figura 16.

Comportamiento de los compuestos volátiles (N.I. $M^{+} 140$, m/z (4 %), 43 (100 %), N.I. $M^{+} 220$, m/z (17 %), 111 (100 %) y dehidrofuquinona) con cantidades relativas iniciales entre 0 y 0,5 durante el monitoreo de 60 días a 25 y 40 °C



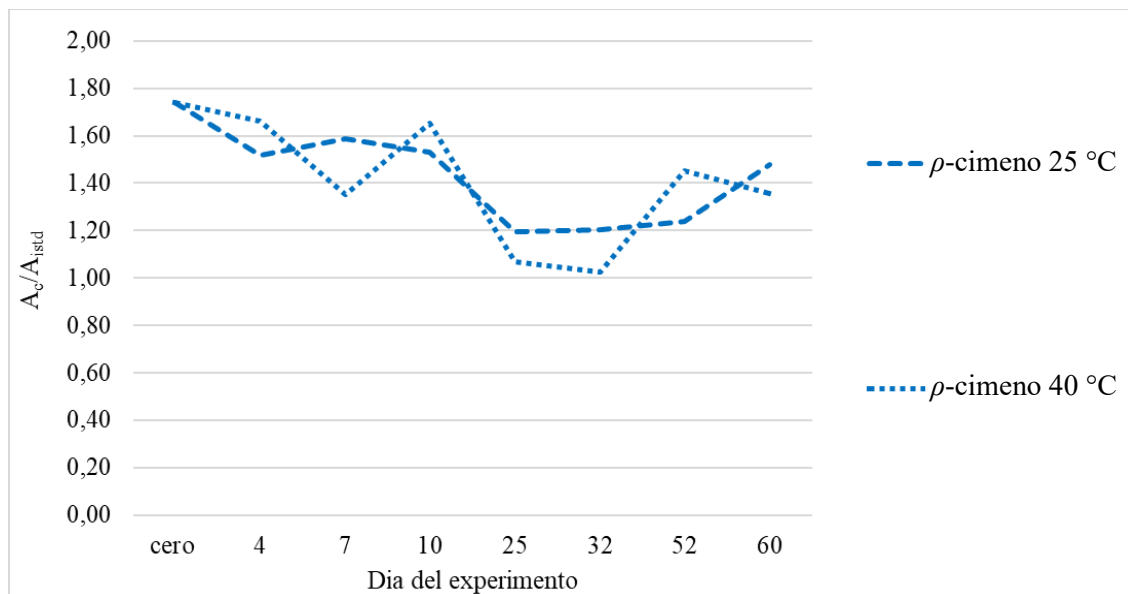
Para el compuesto N.I. $M^{+} 220$, m/z (17 %), la pérdida promedio fue del 50 ± 2.4 % en ambas temperaturas. Los resultados de la prueba LSD mostraron similitudes a ambas temperaturas, ya que no hubo diferencias significativas entre el día cero y el día diez, con una pérdida promedio del $17,3 \pm 0.3$ % a esta fecha, seguido de un período de estabilización entre el día 25 y el día 60 donde tampoco se observaron diferencias significativas. La gráfica de la prueba LSD se encuentra en el Anexo 14.

La Dehidrofuquinona mostró un comportamiento diferente según la temperatura. A 25 °C, la pérdida total fue del 56.3 %, mientras que a 40 °C fue del 45.7 %. A 25 °C, no se encontraron diferencias significativas entre el día cero y el día 25 (pérdida del 28.8 %), ni entre el día diez y el día 60. A 40 °C, el patrón fue similar al de los otros compuestos, sin diferencias significativas entre

el día cero y el día diez (pérdida del 19.8 %), ni entre el día 25 y el día 60. Ver la gráfica de la prueba LSD en el Anexo 15.

Figura 17.

Comportamiento del ρ -cimeno durante el monitoreo de 60 días a 25 y 40 °C.



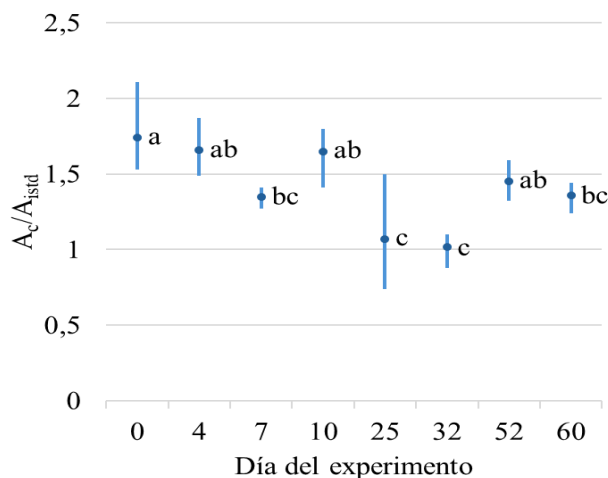
En la Figura 17 se observa que la cantidad relativa del compuesto disminuyó progresivamente desde el día cero hasta el día 25, con una reducción del 31 % hasta esta fecha. Posteriormente, la cantidad relativa comenzó a aumentar, lo que resultó en una pérdida final del 15 % al día 60 respecto al día cero. Aunque se detectaron estas variaciones, el análisis ANOVA indicó que las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$) durante el periodo evaluado. Por otro lado, a 40 °C, se encontraron diferencias significativas, con una disminución máxima del 39% al día 32 y un posterior aumento alcanzando una pérdida final del 22 % al día 60.

La cantidad relativa de ρ -cimeno mostró fluctuaciones a lo largo del tiempo, y se observaron diferencias significativas entre varios días durante los 60 días de monitoreo, lo que

sugiere que el compuesto sigue siendo susceptible a cambios bajo las condiciones evaluadas. En la Figura 18 se muestra la distribución de grupos que tuvieron diferencias significativas.

Figura 18.

Gráfico de la prueba LSD de Fisher para los datos obtenidos de ρ -cimeno a 40 °C.



Nota. Los días marcados con letras distintas (a, b y c) representan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Los resultados obtenidos son consistentes con un estudio que reporta un aumento en la cantidad relativa del ρ -cimeno después de un período de almacenamiento prolongado (12 meses) a temperaturas como 20 °C y 37 °C. Sin embargo, en dicho estudio no se reportan variaciones en el tiempo, sino solo la comparación entre los datos iniciales y finales en AE no encapsulado (Dedebas & Lutfiye Ekici, 2022). El incremento observado en el ρ -cimeno podría atribuirse a transformaciones químicas de otros monoterpenos (Dedebas & Lutfiye Ekici, 2022; Turek, 2013). La tendencia observada sugiere que, en un período mayor a 60 días, el ρ -cimeno podría seguir aumentando.

La Tabla 4 muestra los porcentajes de pérdida relativa de los metabolitos secundarios a 25 y 40 °C, calculados a partir de las medias del día cero y el día 60 presentadas previamente en la Tabla 3. Los resultados revelan que, al día 60, las mayores pérdidas correspondieron a los compuestos con tiempos de retención más prolongados en la columna cromatográfica. Esto sugiere una posible relación entre la polaridad molecular y la liberación gradual del AE desde las gotículas liposomales (Bravo & Pereañez, 2016; Henríquez Sanabria, 2022), teniendo en cuenta que los patrones de pérdida y estabilización mostraron una variación según la temperatura y la naturaleza del compuesto.

Tabla 4.

Porcentajes de pérdida relativa de los volátiles al día 60 respecto a los valores iniciales a 25 y 40 °C.

N° de pico	Compuesto	% de pérdida relativa	
		Día 60	
		25 °C	40 °C
1	<i>ρ</i> -Cimeno	14,94	22,03
2	<i>β</i> -Elemeno	35,97	25,80
3	<i>trans-β</i> -Cariofileno	35,16	28,29
4	4,5-di- <i>epi</i> -Aristolocheno	47,64	36,69
5	N.I. M ⁺⁺ 204, <i>m/z</i> (48 %), 161 (100 %)	54,50	55,37
6	Coelución de Valenceno y <i>β</i> -Selineno	53,65	52,54
7	N.I. M ⁺⁺ 204, <i>m/z</i> (36 %), 93 (100 %)	54,75	52,94
8	N.I. M ⁺⁺ 140, <i>m/z</i> (4 %), 43 (100 %)	54,69	57,90
9	Óxido de cariofileno	59,13	55,29
10	N.I. M ⁺⁺ 220, <i>m/z</i> (17 %), 111 (100 %)	52,21	48,75
11	Dehidrofuquinona	56,25	45,74

La composición química de los AE puede cambiar según las condiciones de almacenamiento, debido reacciones de oxidación, isomerización, ciclación o deshidrogenación,

desencadenadas enzimática o químicamente (Turek, 2013). Estudios muestran como la cantidad relativa de ρ -cimeno, β -elemeno y del óxido de cariofileno aumentan después de 1 año de almacenamiento y a mayor temperatura, mayor fue el incremento en AE de *Hyptis pectinata* L. Poit, *Citrus limon* L., *Citrus sinensis* L. y *Laurus nobilis* L. (Dedebas & Lutfiye Ekici, 2022; Jesus, Blank, Alaves, Arrigoni-Blank, & Lima, 2016), mientras que el AE de *Cuminum cyminum* L. almacenado a diferentes temperaturas durante 6 meses mostró que el ρ -cimeno a 25 °C disminuyó a lo largo del estudio (Mehdizadeh & Ghasemi Pirbalouti, 2017), lo que sugiere que el aumento de este compuesto depende del AE estudiado.

Las pruebas LSD revelaron que, en general, no hubo diferencias significativas entre el día cero y el día diez para muchos compuestos, lo que sugiere un período inicial de estabilidad relativa con tendencia decreciente, seguido de un período de estabilización, el cual varió según las condiciones.

Entre los compuestos más estables destacan el ρ -cimeno, β -elemeno y *trans*- β -cariofileno, que conservaron más del 68 % de la cantidad relativa inicial al día 60, aunque con ligeras fluctuaciones. En contraste, el compuesto mayoritario 4,5-di-epi-aristolocheno presentó pérdidas del 40 %, mientras que otros metabolitos superaron el 50 % de pérdida (Tabla 4).

La ausencia de nuevos picos en los cromatogramas sugiere que las pérdidas se deben principalmente a volatilización y no a reacciones químicas de transformación. Esta interpretación se sustenta en la falta de correlación entre la disminución de un compuesto y el aumento de otro en el perfil cromatográfico, patrón que difiere de lo reportado en estudios previos (Dedebas & Lutfiye Ekici, 2022; Turek, 2013; Jesus, Blank, Alaves, Arrigoni-Blank, & Lima, 2016; Mehdizadeh & Ghasemi Pirbalouti, 2017), con la excepción notable del ρ -cimeno.

Los resultados demuestran que, si bien las pérdidas porcentuales fueron similares en ambas temperaturas para varios compuestos, se observaron diferencias clave en sus patrones de degradación. Esto sugiere que la estabilidad a largo plazo y las variaciones en las cantidades relativas en la NE están determinadas por la naturaleza química específica de cada compuesto (polaridad, volatilidad, reactividad) y las condiciones microambientales durante el almacenamiento (temperatura, oxígeno residual, matriz de encapsulación).

5. Conclusiones

Se identificaron 11 compuestos presentes en el AE de *T. diffusa* con áreas cromatográficas relativas superiores al 2 %. Los 3 compuestos más abundantes fueron 4,5-di-epi-aristolocheno (33,8 %), C₁₅H₂₄ [*m/z* 204 (36 %), 161 (66 %), 133 (62 %), 93 (100 %)] (11,3 %) y la coelución de valenceno y β -selineno (8,7 %). Se observó una pérdida inicial de las abundancias, destacando la dehidrofuquinona, que disminuyó de 6 % a 1 %. Se sugiere que estas pérdidas se deben a las condiciones de preparación de la NE, como la temperatura elevada y la agitación constante.

El monitoreo de la estabilidad química de la NE se realizó por medio de la técnica extractiva HS-SPME, la cual permitió la obtención de los metabolitos secundarios seleccionados para el estudio previamente en el AE.

El análisis estadístico ANOVA reveló que las condiciones utilizadas de temperatura y el tiempo de almacenamiento de la NE, tuvieron un efecto significativo en los resultados. Sin

embargo, los datos obtenidos después del día 32 no mostraron diferencias significativas en la extracción de la fracción volátil del AE en la NE para ambas temperaturas.

Los resultados mostraron una disminución general en las cantidades relativas de los compuestos volátiles durante un periodo de 60 días. Los compuestos ρ -cimeno, β -elemeno y *trans*- β -cariofileno conservaron aproximadamente el 68 % de sus cantidades relativas a lo largo del estudio, se sugiere que la pérdida de volátiles podría estar relacionada con la liberación gradual del AE desde las vesículas liposomales.

6. Recomendaciones

Hacer el estudio a mayor tiempo, tal que permita analizar lo que sucede con algunos compuestos como el ρ -cimeno ya que después de 12 meses en otros estudios mostró un claro aumento en su cantidad relativa.

Realizar un análisis con fechas mas cercanas entre los días diez y 25, ya que la mayoría de compuestos mostraron tener diferencias significativas entre estas fechas, de esta forma se podría revisar si hay una fecha intermedia en la que ocurre mayor pérdida de volátiles.

7. Divulgación de Resultados

Participé en el congreso: XI COCOCRO, XIX COLACRO, III SPAE, XXVI EXTECH, XVI LASEAC y WARPA, bajo la modalidad póster, titulado: Monitoreo de los componentes mayoritarios del aceite esencial de *Turnera diffusa* incorporado en una nanoemulsión para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea. Bucaramanga. Colombia. 13 al 15 de noviembre del 2024.

Referencias Bibliográficas

- Adams, R. P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry 4th ed. Carol Stream, Illinois, EE.UU.: Allured publishing Corporation.
- Alcaraz Melendez, L. (1999). Estudio de las condiciones para la micropropagación de la damiana. (*Turnera diffusa*). Tesis de doctorado (Biología), Facultad de ciencias, Universidad Autónoma de México. México D.F.
- Alcaraz Meléndez, L., & Véliz Murillo, M. G. (2006). Comercialización de una planta del desierto: damiana (*Turnera diffusa*). *Revista Mexicana de Agronegocios*, 1-12.
- Alcaraz-Meléndez, L., Delgado-Rodríguez, J., & Real-Cosío, S. (2004). Analysis of essential oils from wild and micropropagated plants of damiana (*Turnera diffusa*). *Fitoterapia*, 696-701.
- Babushok, V. I., & Linstrom, P. J. (2011). Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 40(4), 1-47.
- Bai, Y., Qiu, T., Chen, B., Shen, C., Yu, C., Luo, Z., . . . Zhang, H. (2023). Formulation and stabilization of high internal phase emulsions: Stabilization by cellulose nanocrystals and gelatinized soluble starch. *Carbohydrate Polymers*, 1-12.
- Bolouri, P., Salami, R., Kouhi, S., Kordi, M., Asgari Lajayer, B., Hadian, J., & Astatkie, T. (2022). Applications of essential oils and plant extracts in different industries. *Molecules*, 1-12.
- Bravo, K., & Pereañez, J. A. (2016). Colombian biodiversity, an opportunity for the strengthening of the pharmaceutical and cosmetic industries. *VITAE*, 1-2.

- Carreño, H., Stashenko, E., & Escobar, P. (2023). Essential oils distilled from Colombian aromatic plants and their constituents as penetration enhancers for transdermal drug delivery. *Molecules*, 1-11.
- Celeiro, M., Garcia-Jares, C., Llompарт, M., & Lores, M. (2021). Recent advances in sample preparation for cosmetics and personal care products analysis. *Molecules*, 1-5.
- Dedebas, T., & Lutfiye Ekici, L. y. (2022). Influence of heating on thermal stability of essential oils during storage. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 25(3), 611-625.
- Directive. (2001). 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 november 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use. *Official Journal of the European Communities*, 74-76. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32001L0083:EN:HTML>
- Donsì, F. A. (2011). Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 1908-1914.
- Duque, J. E., Urbina, D. L., Vesga, L. C., Ortiz-Rodríguez, L. A., Vanegas, T. S., Stashenko, E. E., & Mendez-Sanchez, S. C. (2023). Insecticidal activity of essential oils from American native plants against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): an introduction to their possible mechanism of action. *Nature*, 1-12.
- García Quintero, C. A. (2022). Caracterización química y fraccionamiento de aceites esenciales y extractos hidroalcohólicos obtenidos de *Lippa alba* y *Turnera diffusa*. *Trabajo de Grado para optar al título de Químico, facultad de ciencias, Universidad Industrial de Santander*.
- Gomis Yagües, V. (2008). Tema 3. Cromatografía de gases. *Técnicas Instrumentales en el Análisis Industrial. Universidad de Alicante*, 8-11.

González-Minero, F. J., & Bravo-Díaz, L. (2018). The use of plants in skin-care products, cosmetics and fragrances: past and present. *cosmetics*, 5-6.

Henríquez Sanabria, J. C. (2022). Estudio de estabilidad y propiedades antioxidantes de una microemulsión que incorpora extractos y aceites esenciales de plantas aromáticas que crecen en santander. *Trabajo de investigación para optar al título de Magister en Química*, Universidad Industrial de Santander.

Iskandarsyah, H., & Rahman, A. (2018). Accelerated stability testing of anti-aging cream: formation of myristic acid and stearic acid as degradation products. *International Journal of Applied Phatmaceutics*, 1-5.

Jesus, A., Blank, A., Alaves, M., Arrigoni-Blank, M., & Lima, R. y. (2016). Influence of storage time and temperature on the chemical composition of the essential oil of *Hyptis pectinata* L. Poit. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 18(1), 336-340.

Karaca, N., Demirci, B., & Gavahian, M. y. (2023). Enhanced bioactivity of rosemary, sage, lavender, and chamomile essential oils by fractionation, combination, and emulsification. *ACS Omega*, 10941-10953.

Lertsatitthanakorn, P., Taweechaisupapong, S., Aromdee, C., & Khunkitti, W. (2006). In vitro bioactivities of essential oils used for acne control. *The International journal of aromatherapy* , 45-48.

Lim, S., Chieng, J., & Pan, Y. (2021). Recent insights on anti-dengue virus (DENV) medicinal plants: review on in vitro, in vivo and in silico discoveries. *All life*, 1-33.

Mehdizadeh, L., & Ghasemi Pirbalouti, A. y. (2017). Storage stability of essential oil of cumin (*Cuminum cyminum* L.) as a function of temperature. *International Journal of Food Properties*, 20(2), 1742-1750.

- Mossa, A.-T. H. (2016). Green pesticides: essential oils as biopesticides in insect-pest management. *Journal of Environmental Science and Technology*, 354-378.
- Muehlmann, L., Rodríguez, M., Longo, J., García, M., PY-Daniel, K., Veloso, A., . . . Da Silva, S. y. (2015). Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: Development and in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. *Journal of Nanobiotechnology*, 1-10.
- NIST. (2023). *STANDARD REFERENCE DATABASE; NIST/EPA/NIH Spectral Library with Search Program*. Gaithersburg, EE. UU.
- Prakash, A., Baskaran, R., Paramasivam, N., & Vadivel, V. (2018). Essential oil based nanoemulsions to improve the microbial quality of minimally processed fruits and vegetables: A review. *Food Research International*, 509–523.
- Regulation. (2009). (EC) No. 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 november 2009 on cosmetic products (recast). *Official Journal of the European Union*, 79-81.
- https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/endocrine_disruptors/docs/cosmetic_1223_2009_regulation_en.pdf
- Ríos, N. S. (2017). Evaluation of the insecticidal activity of essential oils and their mixtures against *Aedes aegypti* (Diptera; Culicidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 307-311.
- Silva-Trujillo, L., Quintero-Rueda, E., Stashenko, E., Conde-cazionez, S., Rondón-Villarreal, P., & Ocazionez, R. (2022). Essential oils from Colombian plants: antiviral potential against dengue virus based on chemical composition, in vitro and In silico analyses. *Molecules*, 1-19.

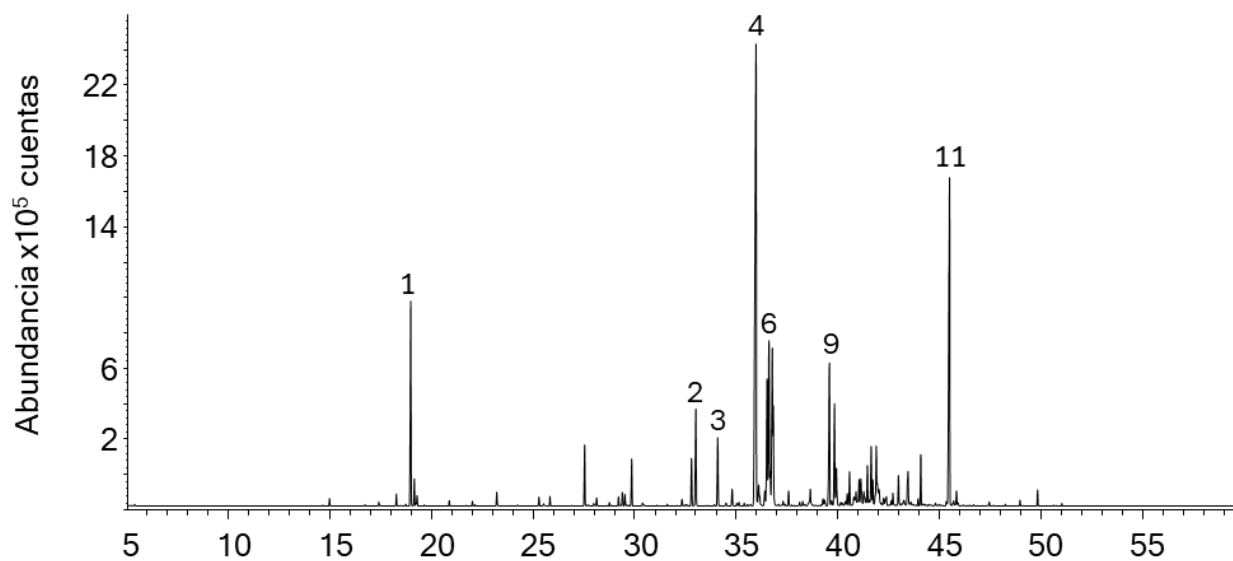
- Sinico, C., Logu, A., Lai, F., Valenti, D., Manconi, M., Loy, G., . . . Fadda, A. M. (2005). Liposomal incorporation of *Artemisia arborescens* L. essential oil and in vitro antiviral activity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 161–168.
- Stashenko, E. E. (2009). Aceites esenciales. *Publicaciones UIS, Universidad Industrial de Santander*, Bucaramanga, Colombia.
- Stashenko, E., & Martínez, J. (2007). Sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid-phase micro-extraction. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 235-242.
- Stashenko, E., & Martínez, J. (2009). ¿Cuántos componentes hay en una mezcla? Respuesta cromatográfica. *Scientia Chromatographica*, 23-33.
- Stashenko, E., & Martínez, J. (2009). Algunos aspectos de la detección en cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Selectividad e identificación. *Scientia Chromatographica*, 29-45.
- Stashenko, E., & Martínez, J. (2010). GC-MS: Más de un Analizador de Masas, ¿para qué? *Scientia Chromatographica*, 25-48.
- Stashenko, E., & Martínez, J. (2011). Algunos consejos útiles para el análisis cromatográfico de compuestos orgánicos volátiles. *Scientia Chromatographica*, 199-221.
- Szewczyk, K., & Zidorn, C. (2014). Ethnobotany, phytochemistry, and bioactivity of the genus *Turnera* (Passifloraceae) with a focus on damiana - *Turnera diffusa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 424-443.
- Turek, C. y. (2013). Stability of essential oils: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12, 40-47.

- Urbizu-González, A. L., Flores, J., Rosa-Manzano, E. d., & Castillo-Ruíz, O. (2019). Morphological differences of *Turnera diffusa* (Turneraceae) in two populations differing in rainfall at Northeastern Mexico. *Botanical Sciences*, 65-73.
- Zhao, J., Pawar, R. S., Ali, Z., & Khan, I. A. (2007). Phytochemical investigation of *Turnera diffusa*. *American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy*, 289-292.

Apéndices

Apéndice A. Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (*full scan*) de una muestra de AE de *T. diffusa*. Columna DB-5MS (60 m), inyección *split* 1:30. Véase la identificación en la Tabla

1.



Apéndice B. Resultados del ANOVA obtenidos en Microsoft Excel para el análisis de las áreas relativas de la variación del tiempo de exposición.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
10 min	3	24,52	8,17	1,85
20 min	3	47,19	15,73	1,26
30 min	3	46,45	15,48	6,11

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	110,55	2	55,28	17,99	0,003	5,14
Dentro de los grupos	18,44	6	3,07			
Total	128,99	8				

Apéndice C. Resultados del ANOVA obtenidos en Microsoft Excel para el análisis de las áreas relativas de la variación de la cantidad de muestra

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
25 mg	3	40,85	13,62	14,24
50 mg	3	47,19	15,73	1,26
100 mg	3	65,31	21,77	10,78

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	107,38	2	53,69	6,13	0,035	5,14
Dentro de los grupos	52,54	6	8,76			
Total	159,92	8				

Apéndice D. Resultados del ANOVA obtenidos en Microsoft Excel para el análisis de las áreas relativas de la fracción volátil de la muestra almacenada a 25 °C durante 60 días.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
día cero	3	65,31	21,77	10,78
día 4	3	59,68	19,89	5,99
día 7	3	61,35	20,45	3,20
día 10	3	58,46	19,49	3,02
día 25	3	46,89	15,63	3,05
día 32	3	38,40	12,80	2,56
día 52	3	40,00	13,33	3,84
día 60	3	35,48	11,83	2,23

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	326,55	7	46,65	10,76	0,000052	2,66
Dentro de los grupos	69,36	16	4,33			
Total	395,90	23				

Apéndice E. Resultados del ANOVA obtenidos en Microsoft Excel para el análisis de las áreas relativas de la fracción volátil de la muestra almacenada a 40 °C durante 60 días.

Análisis de varianza de un factor

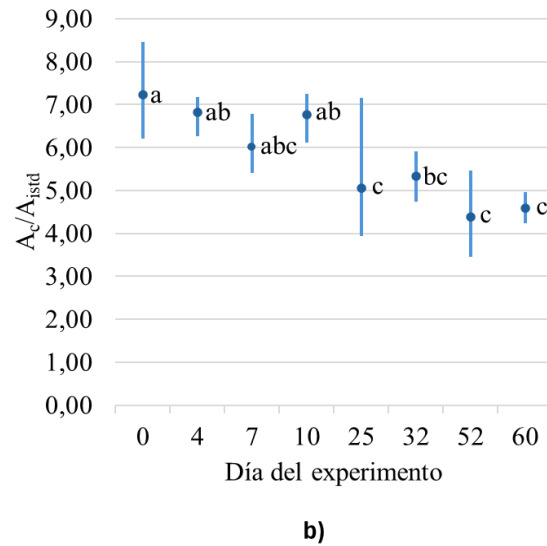
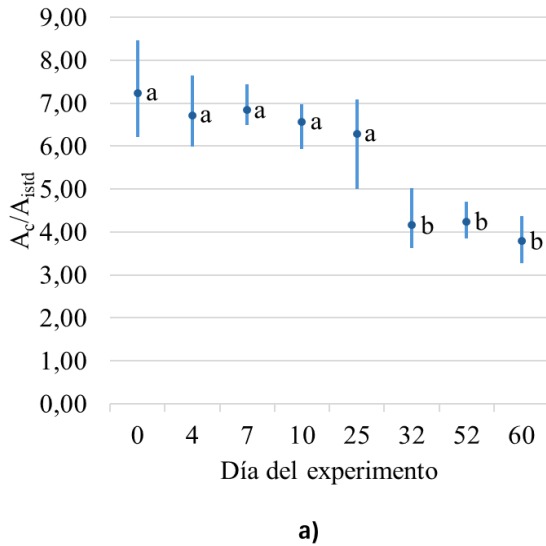
RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
día cero	3	65,31	21,77	10,78
día 4	3	60,65	20,22	1,91
día 7	3	53,42	17,81	3,40
día 10	3	56,04	18,68	0,99
día 25	3	41,24	13,75	6,67
día 32	3	44,27	14,76	2,28
día 52	3	38,34	12,78	2,86
día 60	3	38,51	12,84	0,91

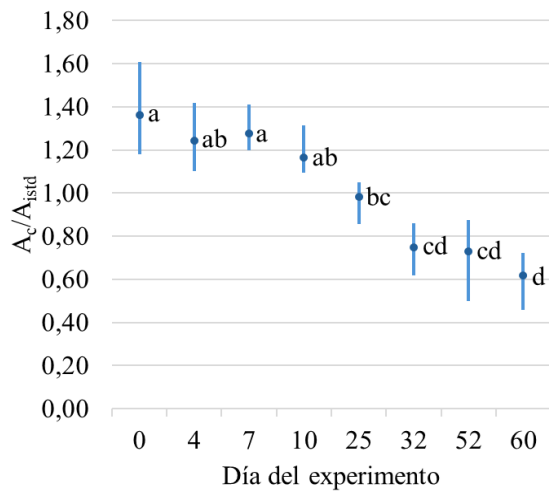
ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	257,60	7	36,80	9,88	0,000087	2,66
Dentro de los grupos	59,60	16	3,73			
Total	317,21	23				

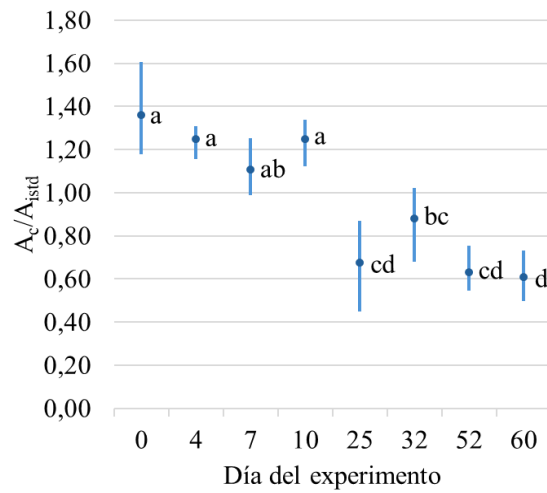
Apéndice F. Gráfico de la prueba LSD de Fisher para los datos obtenidos del 4,5-di-*epi*-aristolocheno durante los 60 días de monitoreo. a). 25 °C; b). 40 °C. Los días marcados con letras distintas (a, b y c) representan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).



Apéndice G. Gráfico de la prueba LSD de Fisher para los datos obtenidos del N.I. M⁺ 204, m/z (48 %), 161 (100 %) durante los 60 días de monitoreo. a). 25 °C; b). 40 °C. Los días marcados con letras distintas (a, b, c y d) representan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

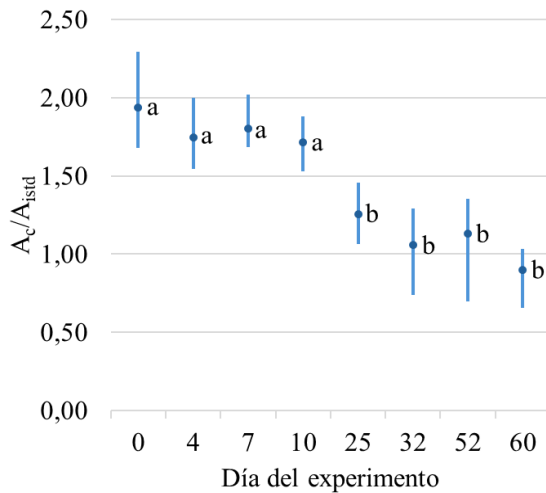


a)

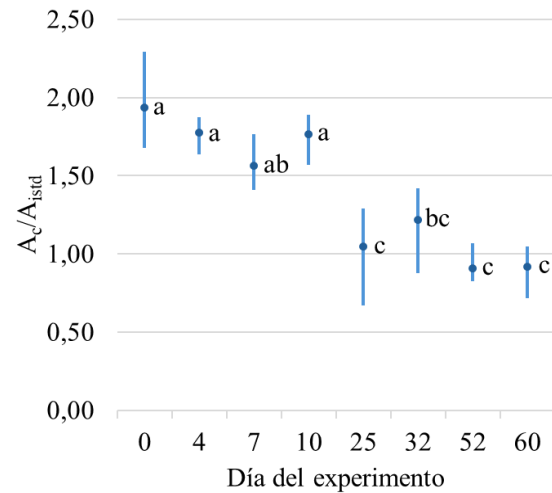


b)

Apéndice H. Gráfico de la prueba LSD de Fisher para los datos obtenidos de la coelusión de valenceno y β -selineno durante los 60 días de monitoreo. a). 25 °C; b). 40 °C. Los días marcados con letras distintas (a, b y c) representan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

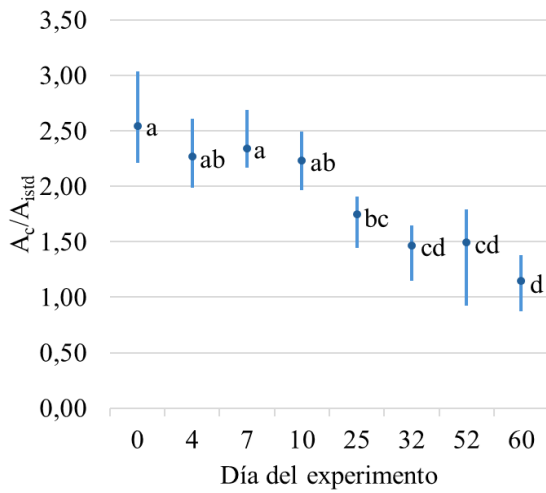


a)

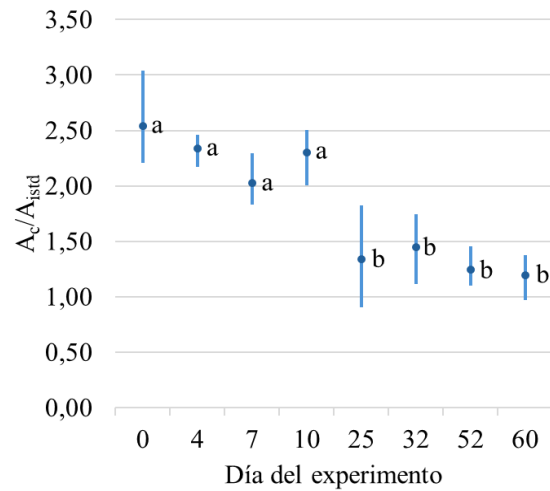


b)

Apéndice I. Gráfico de la prueba LSD de Fisher para los datos obtenidos del N.I. M⁺ 204, m/z (36 %), 93 (100 %) durante los 60 días de monitoreo. a). 25 °C; b). 40 °C. Los días marcados con letras distintas (a, b, c y d) representan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

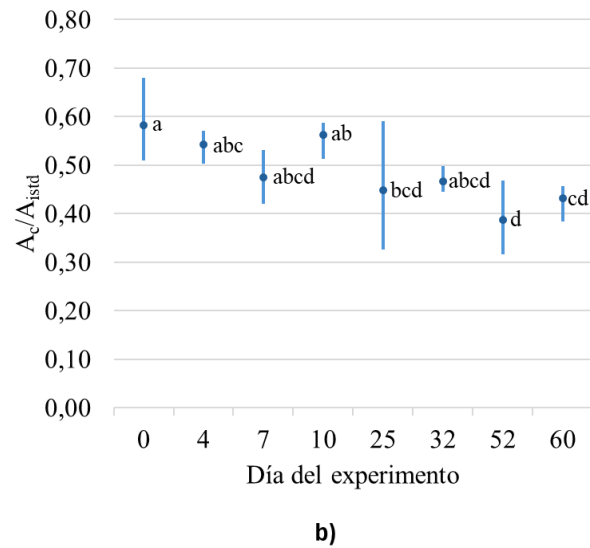
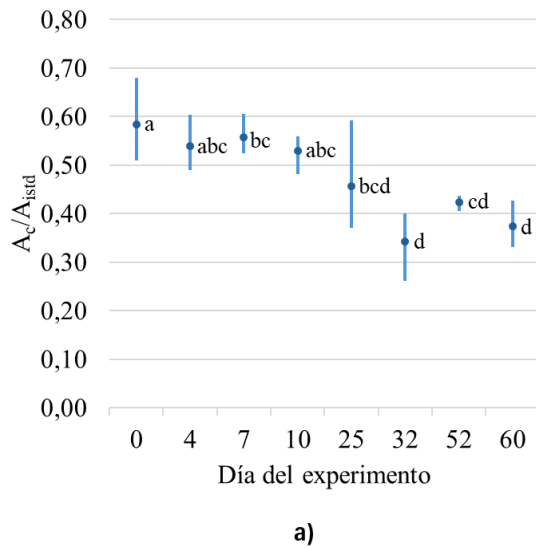


a)

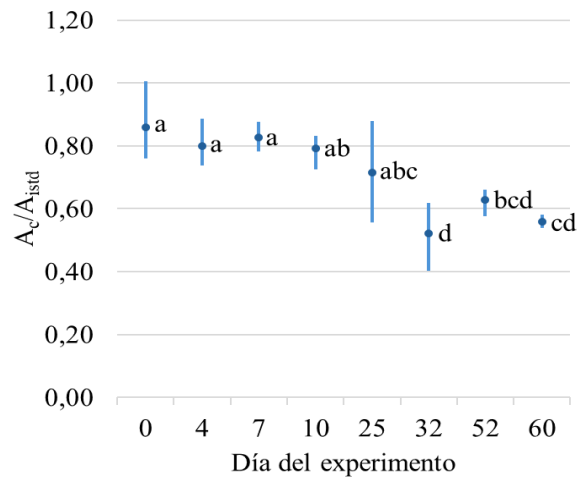


b)

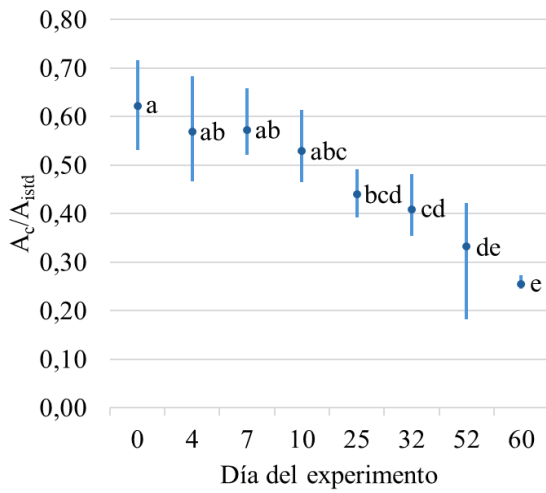
Apéndice J. Gráfico de la prueba LSD de Fisher para los datos obtenidos del β -elemeno durante los 60 días de monitoreo. a). 25 °C; b). 40 °C. Los días marcados con letras distintas (a, b, c y d) representan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).



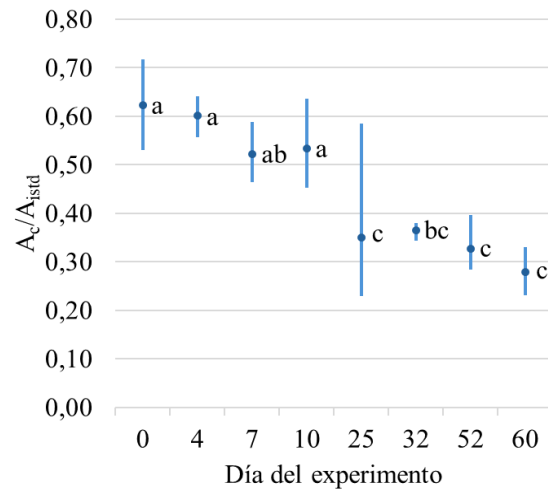
Apéndice K. Gráfico de la prueba LSD de Fisher para los datos obtenidos del *trans-β*-cariofileno durante los 60 días de monitoreo a 25 °C. Los días marcados con letras distintas (a, b, c y d) representan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).



Apéndice L. Gráfico de la prueba LSD de Fisher para los datos obtenidos del óxido de cariofileno durante los 60 días de monitoreo. a). 25 °C; b). 40 °C. Los días marcados con letras distintas (a, b, c, d y e) representan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

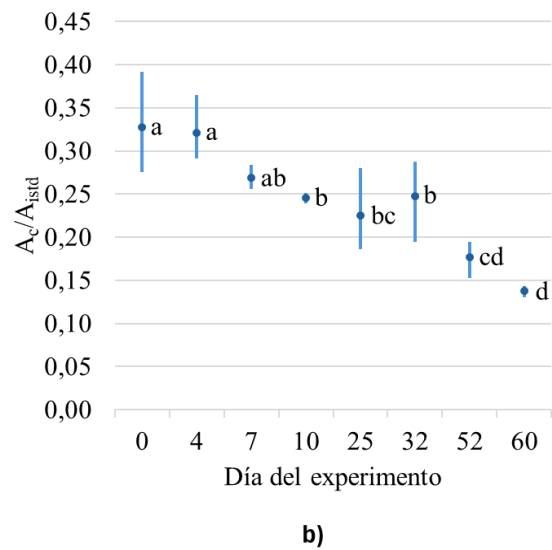
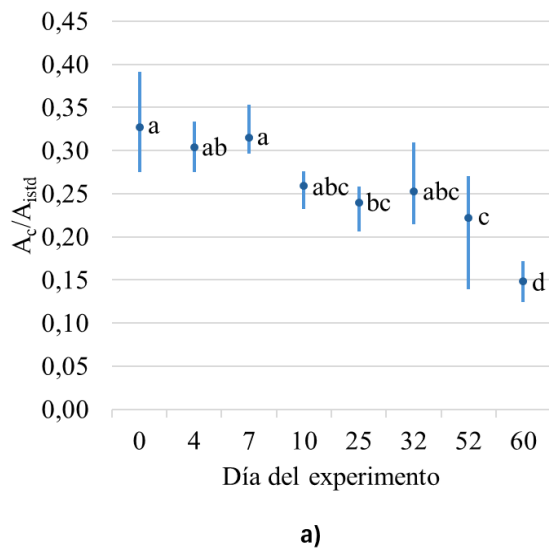


a)

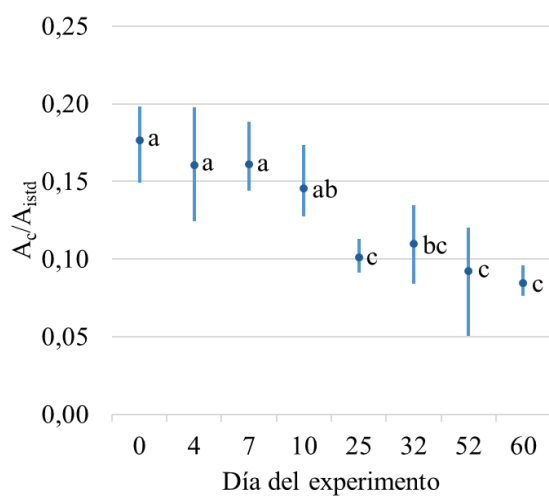


b)

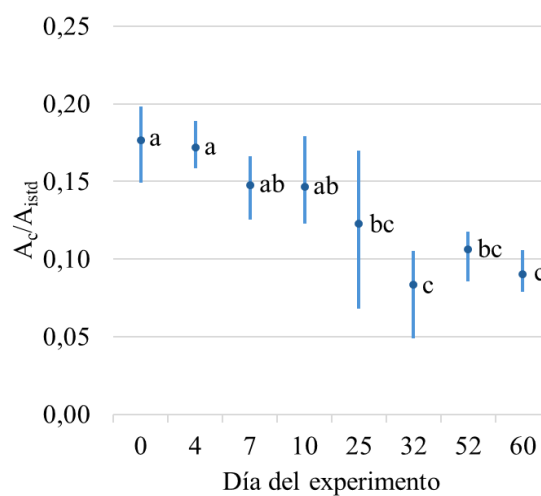
Apéndice M. Gráfico de la prueba LSD de Fisher para los datos obtenidos del N.I. M⁺ 140, m/z (4 %), 43 (100 %) durante los 60 días de monitoreo. a). 25 °C; b). 40 °C. Los días marcados con letras distintas (a, b y c) representan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).



Apéndice N. Gráfico de la prueba LSD de Fisher para los datos obtenidos del N.I. M⁺ 220, m/z (17 %), 111 (100 %) durante los 60 días de monitoreo. a). 25 °C; b). 40 °C. Los días marcados con letras distintas (a, b y c) representan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).



a)



b)

Apéndice O. Gráfico de la prueba LSD de Fisher para los datos obtenidos de dehidrofuquinona durante los 60 días de monitoreo. a). 25 °C; b). 40 °C. Los días marcados con letras distintas (a, b y c) representan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

