

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS AMÉRICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
LICENCIATURA EN FARMACIA**

**Título de la investigación:**

**Análisis comparativo de las propiedades fisicoquímicas obtenidas de los extractos de las hojas y los frutos del *Pleodendron costaricense* en la Península de Osa de Costa Rica, su actividad antimicótica y el posible uso en el desarrollo de formulaciones farmacéuticas durante el año 2023**

**Nombre del estudiante:**

**Melissa Calvo Guerrero**

**Tutora:**

**Dra. Melissa Mata Quirós**

**Sede San José**

**Diciembre, 2023**

## I. Resumen

**Introducción:** El *Pleodendron costaricense* es un árbol, fue descrito en el 2005 en Costa Rica. Previamente, se han realizado diferentes estudios en los que se han analizado ciertos componentes de los extractos de hojas y corteza. Sin embargo, aún falta información específica que se estará tratando en esta investigación. Las pruebas antimicóticas, son útiles para determinar si los aceites esenciales presentan actividad terapéutica para un posible uso farmacológico, por lo que se pusieron a prueba sobre tres cepas diferentes, la *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Candida krusei*. La relevancia de este proyecto recae en la obtención de conocimiento necesario para poder elaborar una formulación de un producto natural de interés comercial. **Objetivo general:** Analizar de forma comparativa las propiedades fisicoquímicas obtenidas de los extractos de las hojas y frutos del *Pleodendron costaricense* obtenidas en la Península de Osa de Costa Rica, su actividad antimicótica y el posible uso en el desarrollo de formulaciones farmacéuticas. **Metodología:** Consiste en una investigación de tipo experimental EC sin asignación aleatoria en la que se divide en el proceso de extracción, identificación de posibles metabolitos secundarios, caracterización de propiedades fisicoquímicas y evaluación de actividad antimicótica, con un enfoque cualitativo. **Resultados:** Los resultados obtenidos permitieron identificar que la hidrodestilación es la técnica más adecuada para extracciones de esta especie, además, que los principales metabolitos presentes en el *P.costaricense* corresponden a los sesquiterpenos. Las propiedades fisicoquímicas de cada uno de los aceites esenciales propicia información del punto de ebullición, densidad, pH que no se mencionaban en los artículos disponibles en las bases de datos, por lo que es útil para el desarrollo de las formulaciones farmacéuticas. Y finalmente, se evidenció que sí tiene actividad antimicótica ambos aceites esenciales. **Conclusiones:** Se analizaron las propiedades fisicoquímicas y la actividad antimicótica de los aceites esenciales de las hojas y frutos del *P.costaricense*, para ambos casos se presentó efecto, esto posiblemente por su alto contenido de sesquiterpenos. Sin embargo, al realizar la comparación entre ambas partes de la planta, para el desarrollo de un producto farmacéutico de interés comercial, se recomienda utilizar el aceite esencial de los frutos.

## II. Agradecimientos

Agradezco a Dios por la oportunidad que me brindó de estudiar una carrera que me encanta, por abrirme puertas en el camino que me han hecho crecer personal y profesionalmente, por brindarme oportunidades increíbles y por siempre colocarme las personas correctas en los momentos adecuados.

Agradezco a mi familia en general y también, especialmente, a María Alicia Guerrero Sandí, Miguel Ángel Calvo López y Melanny Calvo Guerrero por todo el apoyo incondicional en este proceso de Universidad, por creer en mí, impulsarme a cumplir mis metas, darme siempre palabras de aliento y motivación para continuar. A Kemly Arias Sandí y Navid Padilla Valverde por ser parte primordial de que este sueño de estudiar Farmacia fuera posible.

Agradezco a Alejandro Monge Rivas, por siempre ser fuente de motivación, hacerme creer en mí misma, incitarme a realizar actividades académicas o profesionales que me hacen salir de mi zona de confort para crecer, por estar en todo momento escuchándome y aconsejándome en estos cuatro años de carrera universitaria. A mis amigos cercanos, especialmente a Mónica Robles Garbanzo y Paola Con Guillén por siempre escucharme y apoyarme en cualquier meta que me he propuesto desde el colegio.

Agradezco a la Dra. Melissa Mata Quirós, por ser la tutora de mi Trabajo Final de Graduación y por el apoyo brindado en este proceso.

Agradezco a las instituciones que me apoyaron en llevar a cabo este proyecto, a Osa Conservation por enviarme desde la Península de Osa la materia vegetal que utilicé; a Andreína Angulo Guerrero, Marco Vargas Soto y Stefany Lozada, por permitirme asistir al Laboratorio Clínico y Banco de Sangre de la UCR donde pude realizar las pruebas antimicóticas de mi trabajo con los más altos estándares de calidad. A Douglas Oviedo Cerdas por permitir que me presentara al Laboratorio de Química de la Universidad

Iberoamericana donde se tenía el equipo necesario para realizar las extracciones correspondientes. Y agradezco al Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas por accederme el uso de las instalaciones, equipo, reactivos y cristalería necesaria para poder llevar a cabo parte de los experimentos de mi Trabajo Final de Graduación.

### III. Dedicatoria

Dedico este trabajo final de graduación a mi familia y a toda persona que, en este camino de Universidad, me ha brindado apoyo y ha sido parte de mi crecimiento personal y profesional. A mis amigos, compañeros y profesores que en algún momento se han acercado a decirme palabras que llevo en la memoria con mucho cariño y han hecho que haya llegado hasta donde estoy.

#### IV. Tabla de contenido

	Página
Resumen	I
Agradecimientos	II
Dedicatoria	IV
Lista de tablas	XI
Lista de figuras	XIV
Tabla de abreviaturas	XIX
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1 Introducción	1
1.2 Planteamiento del problema	3
1.3 Objetivos	4
1.4 Justificación	4
1.5 Antecedentes	6
<b>CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO</b>	
2.1 Plantas medicinales	8
2.1.1 Generalidades de las plantas medicinales	8
2.1.2 Conceptos importantes de las plantas medicinales	9
2.1.2.1 Etnobotánica	9
2.1.2.2 Historia de la etnobotánica	10
2.1.2.3 Farmacognosia	11
2.1.2.4 Droga vegetal	12
2.1.2.5 Droga	12
2.1.2.6 Sustancia medicinal	12
2.1.2.7 Principio activo	12
2.1.2.8 Fitoquímica	12
2.1.3 Preparación más frecuente de las plantas medicinales	13
2.1.3.1 Tisanas	13
2.1.3.2 Decocción	13

2.1.3.3 Maceración	13
2.1.3.4 Infusión	14
2.1.4 Usos generales de las plantas medicinales	14
2.2 Medicina tradicional	15
2.2.1 Tipos de medicina natural y tradicional	15
2.2.1.1 Acupuntura	15
2.2.1.2 Apiterapia	16
2.2.1.3 Homeopatía	16
2.2.1.4 Magnetoterapia	16
2.3 Metabolismo de plantas	16
2.3.1 Tipos de metabolismo	17
2.3.1.1 Metabolismo primario	17
2.3.1.2 Metabolismo secundario	17
2.4 Aceites esenciales	18
2.4.1 Características generales de los aceites esenciales	18
2.4.2 Características físicas y químicas de los aceites esenciales	18
2.4.3 Usos de los aceites esenciales	19
2.4.4 Principales propiedades fisicoquímicas	19
2.4.5 Principales componentes de los aceites esenciales	20
2.4.5.1 Alcoholes	20
2.4.5.2 Aldehídos	20
2.4.5.3 Cetonas	20
2.4.5.4 Éteres	20
2.4.5.5 Compuestos fenólicos	20
2.4.5.6 Taninos	21
2.4.5.7 Flavonoides	21
2.4.5.8 Terpenos	21
2.4.5.8.1 Sesquiterpenos	22
2.4.5.8.2 Monoterpenos	22
2.4.5.8.3 Diterpenos	22

2.4.5.8.4 Triterpenos	23
2.5 Propiedades fisicoquímicas	23
2.5.1 Consideraciones generales	23
2.5.2 Características fisicoquímicas	23
2.5.2.1 Color	23
2.5.2.2 Olor	23
2.5.2.3 Sabor	23
2.5.2.4 Masa	24
2.5.2.5 Solubilidad	24
2.5.2.6 Densidad	24
2.5.2.7 Punto de fusión	24
2.5.2.8 Punto de ebullición	24
2.5.2.9 Viscosidad	24
2.5.2.10 pH	24
2.6 Métodos fisicoquímicos	25
2.6.1 Objetivo de los métodos fisicoquímicos	25
2.6.2 Equipos utilizados en los análisis fisicoquímicos	25
2.6.2.1 Viscosímetro	25
2.6.2.2 Densímetro o picnómetro	25
2.6.2.3 pH-metro	25
2.6.2.4 Balanza	26
2.6.2.5 Termómetro	26
2.7 Técnicas de extracción de aceites esenciales	26
2.7.1 Destilación por arrastre por vapor	26
2.7.2 Disolventes acuosos	26
2.7.3 Disolventes orgánicos	27
2.7.4 Soxhlet	27
2.7.5 Extracción por prensado	28
2.7.6 Extracción asistida por ultrasonido	28
2.7.7 Extracción asistida por microondas	28

2.7.8 Extracción con fluidos supercríticos	28
2.7.9 Hidrodestilación	28
2.8 Métodos de identificación y caracterización de metabolitos	29
2.8.1 Cromatografía	29
2.8.1.1 Cromatografía de capa fina (TLC)	29
2.8.1.2 Cromatografía de capa fina de alta resolución (HPLC)	29
2.8.1.3 Cromatografía de columna	29
2.8.1.4 Cromatografía de gases (CG)	29
2.8.2 Métodos espectroscópicos	30
2.8.2.1 Absorción	30
2.8.2.2 Espectro UV-Vis	30
2.8.2.3 IR	30
2.8.2.4 RMN	30
2.8.2.5 Espectroscopía de masas	30
2.8.3 Pruebas cualitativas de identificación	31
2.8.3.1 Libermann Burchard	31
2.8.3.2 Reactivo Vainillina-ácido sulfúrico	31
2.8.3.3 Prueba de cloruro férrico al 12,5% (FeCl)	31
2.8.3.4 Reacción de Borntrager	31
2.8.3.5 Prueba de Shinoda	32
2.8.3.6 Reactivo de KOH	32
2.9 Canellaceae	32
2.9.1 Características generales de la familia Canellaceae	32
2.10 <i>Pleodendron costaricense</i>	33
2.10.1 Descubrimiento de la especie	33
2.10.2 Descripción física de la especie	33
2.10.3 Fenología	34
2.10.4 Hábitat y distribución	35
2.10.5 Principales usos	35
2.10.6 Composición química conocida	35

2.10.6.1 Alfa-pineno	35
2.10.6.2 Beta-pineno	36
2.10.6.3 Beta-mirceno	36
2.10.6.4 Beta-tujeno	36
2.10.6.5 Beta-cariofileno	36
2.11 Aplicación terapéutica	36
2.11.1 Consideraciones generales	36
2.12 Actividad antimicótica	37
2.12.2 Evaluaciones antimicóticas	37
2.12.2.1 Método de difusión en agar	37
2.12.3 Medidas de esterilización	37
2.12.3.1 Radiación UV para desinfección microbiológica	38
2.13 Candidiasis	38
2.13.1 Fisiopatología	38
2.13.2 Epidemiología	38
2.13.3 Manifestaciones clínicas	38
2.13.4 Diagnóstico	38
2.13.5 Tratamiento farmacológico	39
2.14 Formulaciones biofarmacéuticas	39
2.14.1 Objetivo de formulaciones biofarmacéuticas	39
2.14.2 Factores biofarmacéuticos por considerar	39
<b>CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO</b>	
3.1 Enfoque	40
3.2 Tipo de investigación	41
3.3 Fuentes de información	41
3.4 Criterios de búsqueda de la información	42
3.5 Criterios de inclusión y exclusión	45
3.6 Análisis de la información	45
3.7 Variables de la investigación	46
3.8 Descripción del procedimiento de recolección y análisis de datos	48

3.9 Descripción de instrumentos y técnicas	49
3.10 Materiales, equipos y condiciones	64
3.11 Componentes reactivos	68
<b>CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS</b>	
4.1 Primer objetivo específico: Realizar la extracción del aceite esencial de las hojas y frutos del <i>Pleodendron costaricense</i> por el método de hidrodestilación	72
4.2 Segundo objetivo específico: Identificar los posibles metabolitos secundarios presentes en el extracto del aceite esencial de las hojas y frutos del <i>Pleodendron costaricense</i> por medio de pruebas cualitativas, uso del espectrofotómetro IR y cromatografía de gases acoplada a detector de masas	94
4.3 Tercer objetivo específico: Comparar las propiedades fisicoquímicas del aceite esencial de las hojas y frutos del <i>Pleodendron costaricense</i>	115
4.4 Cuarto objetivo específico: Evaluar las posibles aplicaciones terapéuticas del extracto de las hojas y de los frutos mediante pruebas antimicóticas	123
<b>CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	
5.1 Conclusiones	136
5.2 Recomendaciones	139
<b>CAPÍTULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	
<b>CAPÍTULO VII. ANEXOS</b>	

## I. Lista de tablas

<b>Tabla N.º</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
Tabla N.º1	Criterios de búsqueda utilizados, según objetivos	42
Tabla N.º2	Criterios de inclusión y exclusión para la selección de artículos	45
Tabla N.º3	Variables del Método Experimental	46
Tabla N.º4	Materiales, equipos y condiciones utilizadas en la sección experimental	65
Tabla N.º5	Reactivos utilizados en la sección experimental	68
Tabla N.º6	Comparación de los métodos recomendados para extracciones de aceites esenciales	75
Tabla N.º7	Condiciones y resultados obtenidos con el método de arrastre por vapor	79
Tabla N.º8	Diferencias de uso del Clevenger, destilador Dean-Stark y destilador Dean-Stark sin llave	83
Tabla N.º9	Datos y resultados obtenidos a partir del extracto de aceite esencial de las hojas del <i>P. costaricense</i> realizado en el Centro de Investigaciones en Productos Naturales en la UCR	87
Tabla N.º10	Datos y resultados obtenidos a partir del extracto de aceite esencial de los frutos del <i>P. costaricense</i> realizado en el Laboratorio de Química de la Universidad Iberoamericana	89
Tabla N.º11	Comparación de la técnica de arrastre con vapor y la hidrodestilación en el proceso de extracción del aceite esencial del <i>P. costaricense</i>	92
Tabla N.º12	Metabolitos conocidos por parte del aceite esencial de hojas y corteza del <i>P. costaricense</i> identificados por cromatografía de gases y por análisis fitoquímico de aislamiento	95

Tabla N.º13	Resultados obtenidos de las pruebas cualitativas de los extractos de aceite esencial de las hojas y frutos del <i>P.costaricense</i>	97
Tabla N.º14	Rango de señal teórica (cm-1) y clasificación de los grupos funcionales presentes en el alfa-pineno	100
Tabla N.º15	Señales detectadas en el espectro del aceite esencial de las hojas del <i>P.costaricense</i> obtenido en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas	101
Tabla N.º16	Comparación de los grupos funcionales obtenidos en el espectro IR del aceite esencial de las hojas del <i>P. costaricense</i> y del análisis de la sustancia aislada del alfa-pineno	103
Tabla N.º17	Señales detectadas en el espectro del aceite esencial de los frutos del <i>P.costaricense</i> obtenido en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas	105
Tabla N.º18	Rango de señal teórica (cm-1) de los grupos funcionales, externos al alfa-pineno, de compuestos presentes en el aceite esencial de los frutos del <i>P.costaricense</i>	111
Tabla N.º19	Resultados obtenidos del CG-MS del aceite esencial de las hojas del <i>P. costaricense</i>	113
Tabla N.º20	Resultados obtenidos del CG-MS del aceite esencial de los frutos del <i>P. costaricense</i>	114
Tabla N.º21	Cantidad de aceite esencial de las hojas y frutos del <i>P. costaricense</i> utilizada por cada sección experimental	116
Tabla N.º22	Propiedades fisicoquímicas del extracto de aceite esencial de las hojas del <i>P. costaricense</i>	117
Tabla N.º23	Propiedades y fisicoquímicas del extracto de aceite esencial de los frutos del <i>P. costaricense</i>	120
Tabla N.º24	Comparación de las propiedades fisicoquímicas del extracto de aceite esencial de las hojas y frutos del <i>P. costaricense</i>	121

Tabla N.º25	Lectura a las 24 horas y 48 horas de la prueba antimicótica del aceite esencial de las hojas y frutos del <i>P. costaricense</i>	127
Tabla N.º26	Fórmula cuali-cuantitativa de la propuesta de producto farmacéutico a base del aceite esencial del <i>P.costaricense</i>	133
Tabla N.º27	Resultados de prueba de peso promedio de la propuesta del producto farmacéutico	135

## I. Lista de figuras

<b>Figura N.º</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
Figura N.º1	Árbol <i>Pleodendron costaricense</i> en el que Osa Conservation obtuvo el material donado	50
Figura N.º2	Frutos del <i>Pleodendron costaricense</i>	50
Figura N.º3	Empaque del servicio de mensajería de Correos de Costa Rica	51
Figura N.º4	Empaque en nuevas bolsas plásticas	51
Figura N.º5	Almacenamiento en refrigeración del material orgánico	51
Figura N.º6	Hojas utilizadas para el proceso de arrastre con vapor y su disminución de tamaño de partícula	53
Figura N.º7	Proceso de arrastre con vapor de las hojas elaborado en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas	53
Figura N.º8	Temperatura en el que el material empieza a destilar	54
Figura N.º9	Separación de fases con la incorporación del hexano	54
Figura N.º10	Uso del Rotavapor	55
Figura N.º11	Proceso de hidrodestilación de las hojas elaborado por los servicios del Centro de Investigaciones en Productos Naturales	55
Figura N.º12	Recolección del aceite esencial producto de la hidrodestilación de las hojas elaborado por los servicios del Centro de Investigaciones en Productos Naturales	56
Figura N.º13	Frutos utilizados para el proceso de arrastre con vapor y su disminución de tamaño de partícula	56
Figura N.º14	Proceso de hidrodestilación de los frutos elaborado en el Laboratorio de Química de la Universidad Iberoamericana	57

Figura N.º15	Recolección del aceite esencial producto de la hidrodestilación de los frutos elaborado en el Laboratorio de Química de la Universidad Iberoamericana	57
Figura N.º16	Espectrofotómetro Infrarrojo IR disponible en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas	59
Figura N.º17	Cromatógrafo de gases acoplado a detector de masas disponible en el Laboratorio de Química de la Universidad Iberoamericana	60
Figura N.º18	Cepas ATCC 90028, ATCC 22019 y ATCC 6258 brindadas por el Laboratorio Clínico y Banco de Sangre de la UCR	61
Figura N.º19	Cámara de flujo laminar con luz UV tipo II para esterilizar círculos que serán impregnados por el aceite, equipo del Laboratorio Clínico y Banco de Sangre de la UCR	62
Figura N.º20	Nefelómetro disponible en el Laboratorio Clínico y Banco de Sangre de la UCR	62
Figura N.º21	Incubadora utilizada a una temperatura aproximada de 33,7°C-34,0°C disponible en el Laboratorio Clínico y Banco de Sangre de la UCR	63
Figura N.º22	Mezclador disponible en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas	64
Figura N.º23	Uso del papel aluminio en el sistema del arrastre por vapor del Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas	79
Figura N.º24	Prueba de evaporación del agua y separarlo del aceite	82
Figura N.º25	Gotas de aceite observadas en el beaker de recolección	83
Figura N.º26	Clevenger	85

Figura N.º27	Equipo utilizado en el Laboratorio de Investigación en Biorefinería de la Escuela de Química de la Universidad Nacional de Costa Rica	85
Figura N.º28	Uso del papel aluminio en el sistema de hidrodestilación del Laboratorio de Química de la Universidad Iberoamericana	90
Figura N.º29	Semillas del <i>P. costaricense</i>	91
Figura N.º30	Sulfato de magnesio anhidro utilizado para secar la muestra	93
Figura N.º31	Recipiente de almacenamiento del aceite esencial de las hojas del <i>P.costaricense</i>	94
Figura N.º32	Prueba de vainillina-ácido sulfúrico del aceite esencial de las hojas del <i>P.costaricense</i>	97
Figura N.º33	Prueba de vainillina-ácido sulfúrico del aceite esencial de los frutos del <i>P.costaricense</i>	98
Figura N.º34	Espectro del aceite esencial de las hojas del <i>P.costaricense</i> obtenido en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas	99
Figura N.º35	Estructura del alfa-pineno	99
Figura N.º36	Identificación de los grupos funcionales del alfa-pineno	100
Figura N.º37	Identificación de grupos funcionales en el espectro del aceite esencial de las hojas del <i>P.costaricense</i> obtenido en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas	102
Figura N.º38	Espectro del alfa-pineno conocido	103
Figura N.º39	Espectro del aceite esencial de las hojas del <i>P.costaricense</i> obtenido en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas	104
Figura N.º40	Espectro del aceite esencial de los frutos del <i>P.costaricense</i> obtenido en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas	104

Figura N.º41	Estructura del beta-pineno	106
Figura N.º42	Estructura del beta-mirceno	106
Figura N.º43	Estructura del beta-tujeno	107
Figura N.º44	Estructura del beta-cariofileno	107
Figura N.º45	Estructura del linalool	108
Figura N.º46	Estructura del cinnamodial	108
Figura N.º47	Estructura del cinnamosmolida	109
Figura N.º48	Estructura del polygodial	109
Figura N.º49	Estructura del mukaadial	110
Figura N.º50	Estructura del parritadial	110
Figura N.º51	Estructura del pleodendione	110
Figura N.º52	Cromatograma del aceite esencial de las hojas del <i>P. costaricense</i>	112
Figura N.º53	Cromatograma del aceite esencial de los frutos del <i>P. costaricense</i>	112
Figura N.º54	Aspecto visual del aceite esencial de las hojas del <i>P. costaricense</i>	117
Figura N.º55	Determinación del pH del aceite esencial de las hojas del <i>P. costaricense</i>	119
Figura N.º56	Aspecto visual del aceite esencial de los frutos del <i>P. costaricense</i>	120
Figura N.º57	Determinación del pH del aceite esencial de las hojas del <i>P. costaricense</i>	121
Figura N.º58	Reproducción de las cepas de <i>Candida albicans</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida krusei</i> .	124
Figura N.º59	Crecimiento de cepas de <i>Candida albicans</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida krusei</i> a las 24 horas	124
Figura N.º60	Vista más de cerca del crecimiento de cepas de <i>Candida albicans</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida krusei</i> a las 24 horas	125

Figura N.º61	Crecimiento de cepas a las 24 horas en el medio cromogénico	125
Figura N.º62	Contacto de los discos con el aceite esencial de las hojas del <i>P. costaricense</i>	126
Figura N.º63	Lectura inicial a las 0 horas de la prueba antimicótica del aceite esencial de las hojas del <i>P. costaricense</i>	126
Figura N.º64	Lectura a las 24 horas de la prueba antimicótica del aceite esencial de las hojas del <i>P. costaricense</i>	128
Figura N.º65	Lectura a las 48 horas de la prueba antimicótica del aceite esencial de las hojas del <i>P. costaricense</i>	129
Figura N.º66	Lectura a las 24 horas de la prueba antimicótica del aceite esencial de los frutos del <i>P. costaricense</i>	130
Figura N.º67	Lectura a las 48 horas de la prueba antimicótica del aceite esencial de los frutos del <i>P. costaricense</i>	130
Figura N.º68	Proceso de llenado del envase del producto	134
Figura N.º69	Etiqueta de la propuesta de producto natural	134
Figura N.º70	Prueba de pH a propuesta de producto farmacéutico	135

## I. Tabla de abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Descripción</b>
<i>P.costaricense</i>	<i>Pleodendron costaricense</i>
INBio	Instituto Nacional de Biodiversidad
MTC	Medicina Tradicional China
MHC	Medicina Herbal China
OMS	Organización Mundial de la Salud
IPP	Isopentenil difosfato
MEP	Metileritritol fosfato
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
Kg	Kilogramos
H+	Iones hidronio
OH-	Iones hidroxilo
TLC	Cromatografía de capa fina
HPLC	Cromatografía de capa fina de alta resolución
CG-MS	Cromatografía de gases acoplado a masas
UV-Vis	Ultravioleta-visible
IR	Infrarroja
RMN	Resonancia magnética nuclear
mm	Milímetros
cm	Centímetros
m	Metros
Km	Kilómetros
mL	Mililitros
FeCl <sub>2</sub>	Cloruro de hierro (II)
NaOH	Hidróxido de sodio
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnesio
CIPRONA	Centro de Investigaciones en Productos Naturales

## **CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN**

## 1.1 Introducción

El *Pleodendron costaricense* es un árbol que fue descrito en el 2005, en Costa Rica. Se encuentra principalmente en zonas que tienen características de bosque lluvioso, en tierras bajas y se identifica por su distintivo olor fuerte de las frutas y semillas<sup>1</sup>. Previamente, se han realizado diferentes estudios en los que se han analizado ciertos componentes de los extractos de hojas y corteza, en los que, a su vez, han establecido que presentan una actividad antimicótica. Sin embargo, aún falta información específica que se estará tratando en esta investigación.

Con base en la información recopilada de diferentes fuentes bibliográficas, se ha establecido la necesidad de conocer sobre características y propiedades de los extractos, por esta razón, en el presente estudio se busca realizar un análisis de manera comparativa sobre las propiedades fisicoquímicas de los extractos de las hojas y frutos del *Pleodendron costaricense*, que serán obtenidas en la Península de Osa de Costa Rica por medio de Osa Conservation, además, de sus posibles aplicaciones terapéuticas. Esto se pretende elaborar con la intención de conseguir información más detallada sobre el aspecto cualitativo de los metabolitos y extractos presentes en la especie, para permitir conocimiento a investigaciones futuras que deseen formular un nuevo producto natural a base de un árbol nacional.

Para obtener la extracción del aceite esencial de las hojas y frutos del *Pleodendron costaricense*, se utilizará el método de hidrodestilación por medio de un cleveger. Lo anterior, se va a realizar para poder estudiar al extracto de ambas partes de la planta, analizarlas por separado y establecer, posteriormente, cuál de los dos es el más apto o el que presenta mayor actividad antimicótica. El método de destilación se ha considerado de las mejores técnicas para poder obtener sustancias activas de las plantas, incluyendo sus raíces, flores, frutos, hojas, semillas y cortezas, debido a que el equipo sirve para poder fraccionar compuestos principalmente de tipo volátil, de baja presión de vapor, alto punto de ebullición e insolubles en agua<sup>2</sup>.

Para el uso de los métodos de destilación por arrastre de vapor, es necesario previamente comprender ciertos términos, aprender el funcionamiento y montaje de este equipo para que cuando se esté realizando la extracción, no exista ningún tipo de fuga de

aire, la temperatura sea la adecuada para que no se degraden los metabolitos presentes en el aceite esencial y en general no existan errores en su obtención.

Posterior al proceso de extracción, tanto de los frutos como de las hojas, se debe realizar el paso de identificación de los metabolitos secundarios presentes en esta planta. Principalmente, la técnica más utilizada para esto es por medio de cromatografía de gases, ya que los aceites esenciales se consideran compuestos volátiles. Sin embargo, también se pueden utilizar métodos más prácticos como las pruebas cualitativas en las que se identifican los grupos o familias de metabolitos presentes<sup>3</sup>.

Las propiedades fisicoquímicas, son cualidades o características propias que tienen las sustancias<sup>4</sup>. Al tener el aceite esencial de hojas y frutos, se puede realizar una comparación entre estos dos de forma cualitativa y, a su vez, al tener identificadas las familias de metabolitos presentes, se pueden comparar entre sí. Lo anterior es de bastante utilidad debido a que, para realizar la formulación de un producto natural, es necesario tener en cuenta las características tanto de los principios activos, que en este caso serían los metabolitos y las cualidades de los excipientes que estarán en la fórmula, para que al unirlos no existan incompatibilidades.

Finalmente, se evaluarán las posibles aplicaciones terapéuticas del extracto de las hojas y de los frutos mediante el uso de equipo proporcionado por el Laboratorio Clínico y Banco de Sangre de la Universidad de Costa Rica. En este se utilizarán cepas de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Candida krusei* en una caja de Petri y se colocarán los extractos obtenidos de las hojas y los frutos para que de esta manera se pueda identificar visualmente cuál de los dos presenta una mejor actividad antimicótica.

La relevancia de esta investigación recae en la obtención de conocimiento necesario sobre las propiedades fisicoquímicas de los extractos de las hojas y frutos del *P. costaricense*, de los metabolitos específicos, tanto su identificación como características y sobre la evaluación de que verdaderamente esta especie presenta actividad terapéutica por medio de pruebas antimicóticas. Esto propicia las bases requeridas para poder elaborar una formulación de un producto natural, en investigaciones futuras.

## 1.2 Planteamiento del problema

En esta investigación, se pretende realizar un análisis de las propiedades fisicoquímicas obtenidas de los extractos de las hojas y frutos del árbol denominado *Pleodendron costaricense*, el cual se obtiene en la Península de Osa de Costa Rica, con la finalidad de poder identificar cuál o cuáles son las principales familias de metabolitos que podrían, en un futuro, ser utilizados para realizar una posible formulación del producto natural. Para lo anterior, además de caracterizar cada aceite contenido, se busca demostrar de forma experimental si esta especie presenta aplicaciones terapéuticas, específicamente el de la actividad antimicótica.

La especie *P. costaricense*, fue descrita en el 2005<sup>1</sup>, lo cual se considera un descubrimiento reciente en comparación a otras plantas, debido a que se requieren años para poder estudiar su comportamiento y, a su vez, caracterizarlas. Por esta razón, no existe suficiente información que abarque todo lo referente a ella y es de interés estudiarla para poder identificar sus posibles usos en el campo de la farmacia, establecer sus aplicaciones terapéuticas y su actividad antimicótica para posibles formulaciones futuras.

A pesar de ser una nueva especie, existe un grupo de investigadores que han realizado estudios científicos en los que la han analizado y han determinado que pertenece a una familia denominada Canellaceae por las características que tiene<sup>1</sup>. Esta familia, es endémica del Este de África, Madagascar y la zona tropical de América; contiene 6 géneros, 26 especies y 5 subespecies<sup>5</sup>. Específicamente, el *P. costaricense*, fue descubierto en Puntarenas, en el cantón de Osa por el Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio)<sup>5</sup>. Además, por medio del uso de cromatografía de gases, se han identificado del aceite esencial de las hojas y corteza, mayoritariamente 19 sesquiterpenos y derivados<sup>5</sup>. Al realizar estos estudios previos han analizado diferentes especies de la familia al mismo tiempo, por lo que, al no ser un estudio tan especializado en solo una especie, puede que no hayan sido identificados todos los metabolitos ni su variabilidad.

Por lo anterior, se plantea como pregunta de este estudio ¿Cuáles son las diferencias en las propiedades fisicoquímicas de los extractos presentes en las hojas y frutos? Además, para poder otorgarle un uso clínico, se plantea conocer sobre ¿Cuál de los dos extractos, de

acuerdo con sus propiedades y actividades farmacológicas, es el más apto en cuanto a una posible formulación de un producto natural que cuente con actividad terapéutica?

### **1.3 Objetivos**

#### 1.3.1 Objetivo general

1.3.1.1 Analizar de forma comparativa las propiedades fisicoquímicas de los extractos de las hojas y frutos del *Pleodendron costaricense* obtenidas en la Península de Osa de Costa Rica, su actividad antimicótica y el posible uso en el desarrollo de formulaciones farmacéuticas.

#### 1.3.2 Objetivos específicos

1.3.2.1 Realizar la extracción del aceite esencial de las hojas y frutos del *Pleodendron costaricense* por el método de hidrodestilación.

1.3.2.2 Identificar los posibles metabolitos secundarios presentes en el extracto del aceite esencial de las hojas y frutos del *Pleodendron costaricense* por medio de pruebas cualitativas, uso del espectrofotómetro IR y cromatografía de gases acoplada a detector de masas.

1.3.2.3 Comparar las propiedades fisicoquímicas del aceite esencial de las hojas y frutos del *Pleodendron costaricense*.

1.3.2.4 Evaluar las posibles aplicaciones terapéuticas del extracto de las hojas y de los frutos mediante pruebas antimicóticas.

### **1.4 Justificación**

Esta investigación es de carácter experimental, cuenta con dos secciones, la de enfoque en la parte fisicoquímica y la clínica. Respectivamente, el estudiar sobre esta especie descubierta en Costa Rica, el árbol *P. costaricense*, es de gran interés debido a que a nivel país, es importante que se creen productos propios y con esta primera parte, se pueden determinar las características de los extractos y metabolitos que funcionan como base para futuros investigadores que deseen formular el producto natural.

En segunda instancia, la parte clínica, es relevante debido a que permite evidenciar su actividad terapéutica y una posible aplicación antimicótica. Esto favorecería a la población, si se genera el producto natural, un posible beneficio de uso alternativo ante, por ejemplo, una Candidiasis.

La Candidiasis es una patología originada principalmente por el hongo *Candida albicans*, sin embargo, también puede producirse por la *Candida parapsilosis* y *Candida krusei*. Esta enfermedad se considera de las más frecuentes de las infecciones en las mucosas y a nivel sistémico. Hay estudios que evidencian que la *Candida albicans* es el causante del 70% de las infecciones por hongo en todo el mundo<sup>6</sup>. Por esta razón, en este estudio, es de interés analizar la parte clínica de forma experimental, en la que se utilizarán cepas de este género de hongo y se pondrán en contacto con el extracto de hojas y frutos de la especie para verificar dos aspectos: que realmente se evite la proliferación o crecimiento de este y determinar cuál o cuáles de los extractos es el más indicado para utilizar en la formulación del producto.

En estudios previos, se ha analizado la composición de extractos en las hojas y corteza de la especie *P. costaricense*, sin embargo, estos han realizado el análisis al mismo tiempo que estudian y comparan a otras plantas, por lo que no permite un estudio más especializado y específico de una planta individual. Por lo anterior, se desea investigar solo una especie, identificar la mayoría de sus metabolitos de forma cualitativa y adicional a esto, no solo especificar los componentes de las hojas, sino también sumar el de los frutos.

Además, los estudios mencionados, han evaluado el comportamiento del aceite esencial del *Pleodendron costaricense* sobre diferentes hongos, sin embargo, del género de la *Candida*, solo ha sido investigada la *Candida albicans* y *Candida shehatae*. En este trabajo se pondrá en evaluación la actividad antimicótica de la *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Candida krusei*. Y como aspecto adicional, se realizará una propuesta de producto terminado como posible formulación biofarmacéutica del aceite esencial del árbol costarricense.

## 1.5 Antecedentes

### 1.5.1 Antecedentes históricos

Pillco, López, Álvarez-Alcázar y Whitworth<sup>7</sup>, realizaron un estudio en Perú de tipo experimental en el que su propósito era conocer más sobre la historia natural del *P. costaricense* y ante una identificación de solamente cuatro plantas presentes en el Pacífico Sur de Costa Rica, buscaron establecer la primera germinación. En total produjeron 59 árboles jóvenes para la siembra, detectaron cinco animales mamíferos que se alimentaban de sus frutos y uno de ellos, el cual correspondía a un primate, utilizaba la especie para medicina tópica.

### 1.5.2 Antecedentes internacionales

Zimmer, Suh y Karol<sup>8</sup>, realizaron un estudio basado en la fitología y filogenética del género *Pleodendron* de la familia Canellaceae. Pretendían obtener la ubicación más específica de las especies del *P. costaricense*, por lo que secuenciaron diferentes regiones de ADN y dentro de sus resultados, se determinó que un único árbol brindó la suficiente información para identificar que existía un grupo monofilético con *Pleodendron macranthum* y *Cinnamodendron ekmanii*.

### 1.5.3 Antecedentes nacionales

Hammel y Zamora<sup>1</sup>, en Costa Rica, en su estudio, describen las principales características físicas de la especie *P. costaricense*, la historia de su descubrimiento, su biogeografía, hábitat, distribución y conservación. Recalcan los problemas relacionados con la reproducción de la planta y la poca variedad que existe de ella debido a sus condiciones necesarias de reproducción.

Treyvaud et al.<sup>5</sup>, realizaron una investigación de tipo cuantitativa experimental, en la que utilizaron la cromatografía de gases para, a partir de diferentes extracciones, identificar los principales metabolitos secundarios de diferentes especies de la familia Canellaceae y de géneros específicos como *Canella*, *Pleodendron* y *Warburgia*, así como: *Canella winterana*, *Canella alba*, *Warburgia salutaris*, *Warburgia salutaris* y *Pleodendron costaricense*. Adicional a esto, analizaron el comportamiento antimicótico del aceite esencial del extracto

de las hojas y corteza del árbol sobre las cepas *Candida albicans*, *Candida shehatae*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Wangiella dermatitidis*, *Pseudallescheria boydii* y *Alternaria alternata*; para esto realizaron un control en el que utilizaron el Ketoconazol y la Berberina. En el análisis determinaron que, mayoritariamente, los compuestos presentes son los sesquiterpenos y en su investigación, descubrieron dos nuevos sesquiterpenos.

Mata y Calvo<sup>9</sup>, en su análisis, identificaron de forma teórica los posibles usos terapéuticos de la especie *Pleodendron costaricense*, obtuvieron características fisicoquímicas de carácter cualitativo mediante fuentes bibliográficas y establecieron diferentes excipientes que se podrían utilizar en una formulación a futuro. Lo anterior se realizó por medio de búsquedas realizadas en bases de datos, por lo que, a partir de este estudio, que es el que se utilizará como base, se desea ampliar conocimiento al respecto, de una forma experimental, de tal manera que se comprueben los datos y, además, se expanda la información al respecto de los principios activos presentes en la especie, sus características y el efecto terapéutico que se evaluará por pruebas antimicóticas.

## **CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO**

En el siguiente apartado, se desarrolla la descripción de diferentes conceptos importantes relacionados con la temática de interés, entre ellos la definición de etnobotánica, fitoquímica, farmacognosia, plantas medicinales, entre otros. Además, se expresan los diferentes métodos de identificación y extracción de los metabolitos secundarios. Y se comprende información relacionada con el *P. costaricense* así como su hábitat, familia a la que pertenece, características generales, entre otros aspectos relevantes; y, finalmente, se exponen técnicas de evaluación antimicótica y sobre las formulaciones biofarmacéuticas.

## **2.1 Plantas medicinales**

### **2.1.1 Generalidades de las plantas medicinales**

Las plantas, hierbas, hongos y algas son de gran importancia en la medicina actual, considerando sus antecedentes de haber sido utilizadas durante siglos para elaborar remedios naturales con ellas, debido a su sencilla obtención. Además, han tomado el papel de ser terapias alternativas, que en ciertos países se han reconocido como tradicionales por su gran actividad farmacológica<sup>10</sup>. Por ejemplo, en África está incorporada la medicina natural en su sistema de salud y el 80% de su población la utiliza; en China, un 40%, y en Sudamérica, específicamente en Colombia, un 79% de las personas<sup>11</sup>. Esto debido a que, a partir de la botánica medicinal, se pueden obtener diversos elementos denominados principios activos, que presentan una actividad biológica beneficiosa para el organismo.

Las plantas medicinales son aquellas en las que en alguna parte de ellas o su totalidad, funcionan como un producto farmacéutico de diagnóstico, cura, tratamiento o prevención de enfermedades en humanos. Además, menciona que no solo se trata de materiales vegetales, sino que también algas y hongos o combinaciones de estos dos<sup>12</sup>. Los productos botánicos pueden presentarse como una solución, polvo, tableta, cápsula, elixir o inyectable. Es decir, hace referencia a aquellas plantas o parte de ellas, que contiene alguna propiedad terapéutica, que puede generar un efecto curativo para ciertas patologías; y esto no solo en el hombre, sino también en animales y otras especies.

La importancia de utilizar estas plantas medicinales para la salud radica en la capacidad que tienen de ofrecer soluciones adecuadas para ciertas afecciones, aprovechando el poder curativo que estas tienen. Esto se apoya con lo que indica la Organización Mundial de la

Salud sobre la actividad terapéutica: “se refiere a la prevención, el diagnóstico y el tratamiento satisfactorios de enfermedades físicas y mentales, el alivio de los síntomas de las enfermedades y la modificación o regulación beneficiosa del estado físico y mental del organismo”<sup>13</sup>. Además, menciona que el uso de plantas medicinales está reconocido como eficaz y que pueden ser aceptados por autoridades nacionales.

### 2.1.2 Conceptos importantes de las plantas medicinales

Es importante comprender los diferentes conceptos expresados por diversos autores sobre la etnobotánica, farmacognosia y fitoquímica, para que, a partir de esto, se puedan entender correctamente los objetivos que estas tienen e identificar su importancia en relación con la elaboración de productos nuevos de carácter natural y además la interacción que pueden tener con el ser humano.

#### 2.1.2.1 Etnobotánica

El estudio que abarca toda la documentación, textos, enseñanzas y conocimiento que ha sido desarrollado y creado por las sociedades humanas, relacionado al uso tradicional de los animales y de los vegetales, desde los métodos de preparación hasta su utilización, se denomina etnobiología. Esta amplia ciencia se divide en la etnobotánica y etnofarmacología<sup>14</sup>.

La etnobotánica consiste en el estudio y comprensión de las relaciones que presentan las plantas y la población. El conocimiento se obtiene de investigaciones realizadas desde los inicios de la existencia del ser humano, especialmente por los indígenas, quienes, con esa cultura que establecieron con el uso de vegetales, lo transmiten con el paso del tiempo a cada generación. Es importante tanto para no perder la sabiduría de los antepasados, como para poder ponerla en práctica con diversos productos, debido a que las plantas tienen múltiples usos, principalmente como alimentos, medicamentos, combustible, de manera ornamental, entre otros<sup>15</sup>.

Diversos autores proponen que el estudio de la etnobotánica corresponde, no solo de cuál es el uso de la planta y para qué funciona, sino también a la investigación del entorno en el que la especie habita, su relación con las comunidades tradicionales y, por ende, sus creencias, su consideración a lo sagrado, entre otros. Además, otros incluyen a la botánica

económica a la etnobotánica, definiéndola como el estudio de la planta útil ante una comercialización y una domesticación<sup>14</sup>.

Lo anteriormente expuesto se relaciona con el término de etnofarmacología, el cual consiste en un estudio propiamente de las medicinas tradicionales y la actividad farmacológica que poseen. Cada una de las sociedades humanas ha creado su medicina tradicional; para ejemplificar, existe la medicina tradicional china (MTC), que a su vez incluye a la medicina herbal china (MHC)<sup>16</sup>. Esta rama de la etnobiología ha facilitado en la innovación del descubrimiento de nuevos medicamentos.

Por lo tanto, la etnobiología es una ciencia que incluye a la etnobotánica y a la etnofarmacología y sus diferencias son el enfoque de estudio que tienen con las plantas. Respectivamente, el primer término se centra en la relación de la planta con las poblaciones, cómo son utilizadas, aspectos tradicionales y culturales, creencias, entre otros; mientras que el segundo, involucra específicamente las propiedades farmacológicas que puedan encontrarse en las especies y de esta manera, poder crear e innovar nuevos medicamentos de uso común.

La pérdida del conocimiento tradicional, degradación de los ecosistemas, hábitats naturales en diferentes zonas, ha ocasionado que el estudio etnobotánico tome relevancia<sup>17</sup>. Su objetivo principal, es contribuir con el conocimiento general y cultural de la biodiversidad y, a su vez, explorarla para poder encontrar diferentes fuentes de materia prima para crear productos naturales con un interés terapéutico<sup>18</sup>.

#### 2.1.2.2 Historia de la etnobotánica

Con relación a la historia de la etnobotánica, Cussy-Poma et al.<sup>15</sup> recalcan que, en sus orígenes, cuando se comenzaban a utilizar las especies vegetales para el consumo medicinal, los encargados y autorizados de su manipulación y repartición eran los curanderos y chamanes. A partir de la exploración vegetal, las poblaciones identificaron la principal forma de uso, la cual corresponde a la parte alimenticia; sin embargo, con el paso de los años, se han analizado en estudios más específicos, partes de ellas que contienen metabolitos secundarios, que han generado el descubrimiento de sus diversas propiedades terapéuticas permitiendo la síntesis de diversos medicamentos.

Asimismo, la importancia de la etnobotánica radica en la conservación, recuperación, revaloración y difusión del conocimiento tradicional y ancestral de una comunidad. Además, de aportar y proponer alternativas para la realización de proyectos de conservación de especies con importancia en el ámbito económico y el beneficio que esto tiene para las poblaciones. Promueve el desarrollo sostenible y de igual manera, el beneficio y aprovechamiento que pueden obtener al utilizar las plantas<sup>19</sup>. Por lo tanto, todo este conocimiento recopilado permite un interés por parte de los investigadores para poder crear nuevas técnicas, métodos y preparaciones, que ayudan a generar los biofármacos<sup>20</sup>.

### 2.1.2.3 Farmacognosia

La farmacognosia, es una ciencia que se encarga del estudio de lo relacionado con las drogas y las sustancias de tipo medicamentosas que principalmente, tienen un origen natural, ya sea una planta, animales, un agente microbiano como hongos y bacterias<sup>21</sup>.

Algunos de los ejes principales de enfoque de la farmacognosia consisten en el análisis tanto de sustancias con propiedades terapéuticas como las de carácter tóxicas, excipientes, entre otros. Y esta se relaciona con otras áreas de interés farmacéutico, así como la química farmacéutica, encargada de utilizar los productos naturales como modelo para obtener nuevos fármacos ya sea por semisíntesis o síntesis total; también, se asocian con la farmacodinámica, toxicología, farmacología, biofarmacia y farmacocinética debido a que se interrelacionan con la búsqueda del mejor efecto terapéutico, a una dosis segura y correcta<sup>21</sup>.

Sus objetivos como ciencia se basan en determinar el origen sistemático de una especie la cual contiene la droga de estudio, establecer características morfoanatómicas y organolépticas con las que se pueda establecer una caracterización de la droga, investigar los diferentes métodos en los cuales se puedan crear drogas a nivel de escala pequeña y grande. Y, adicional a todo lo anterior, la farmacognosia busca establecer la composición química de la droga de forma cualitativa y cuantitativa<sup>21</sup>.

Lo anterior se realiza para obtener todas las características necesarias para poder establecer posibles relaciones o interacciones del principio activo con los excipientes, para formular una forma farmacéutica final, en la que se ha establecido las propiedades farmacológicas previamente, mediante la farmacognosia.

#### 2.1.2.4 Droga vegetal

Se le conoce como droga vegetal a la parte específica de la planta que contiene el principio activo y, además, es utilizado en la terapéutica. Algunos ejemplos que se pueden mencionar como droga vegetal sobresalen la corteza de tilo, hojas de menta, raíz de ipecacuana, entre otros<sup>22</sup>.

#### 2.1.2.5 Droga

Una droga es todo material que tiene la cualidad de ser de origen vegetal y contiene, en sus hojas, corteza y frutos, los principios activos con actividad farmacológica para un uso directo o para la producción de medicamentos nuevos<sup>22</sup>.

#### 2.1.2.6 Sustancia medicinal

Sustancia medicinal hace referencia a todo material de origen humano, vegetal, químico, animal, entre otros, en los que se debe mantener una actividad apropiada para elaborar un medicamento<sup>22</sup>.

#### 2.1.2.7 Principio activo

El principio activo es el componente que es el responsable de la farmacología y del uso como tal a nivel terapéutico de una droga. En algunas ocasiones se pueden observar formulaciones farmacéuticas en las que no solo tenga un principio activo, sino que pueden tener varios, así lo convenga y de acuerdo con necesidades<sup>22</sup>.

#### 2.1.2.8 Fitoquímica

La fitoquímica hace referencia a la ciencia que se dedica al análisis químico y toxicológicos<sup>23</sup>. Es decir, la farmacognosia va a ser relacionado más con el área de farmacología y farmacodinamia, mientras que la fitoquímica corresponde a más análisis de aspectos previos a conocer de la farmacología de una planta.

### 2.1.3 Preparación más frecuente de las plantas medicinales

#### 2.1.3.1 Tisanas

Este tipo de preparación corresponde principalmente a sustancias líquidas de la planta medicinal, en las que se va a encontrar una baja concentración. Estas se presentan principalmente como infusiones y decocciones<sup>22</sup>.

#### 2.1.3.2 Decocción

La decocción forma parte de la clasificación de las tisanas. Esta consiste en utilizar la corteza, raíz, semilla o el fruto de las especies y estas, por medio de acción del calor se obtienen los principios activos. En el caso de este tipo de preparaciones de plantas medicinales, no existe como una guía en la que indique la cantidad exacta que se debe contar de partes de la planta para su preparación, sin embargo, se han establecido posibles rangos en los que se considera que se obtiene una adecuada cantidad correspondiente a los principios activos<sup>22</sup>.

En este caso, se recomienda usar 30-50 gramos del total de la especie y esta se va a someter a un contacto con un diluyente, el cual suele ser agua y de esta, normalmente, es utilizada 1 litro. Debe pasar por un proceso de conservación, para que al tener contacto con la droga-diluyente, se obtenga la suficiente cantidad de sustancia activa, esta espera no debe ser mayor a una semana<sup>22</sup>.

#### 2.1.3.3 Maceración

La maceración forma parte de la clasificación de las decocciones; consiste en triturar la parte que se desea analizar y extraer los principios activos, se utiliza igualmente agua como disolvente, pero esta debe mantenerse a una temperatura ambiente, es decir, no se somete a calor. Se suele recomendar que se pueden utilizar entre 30-50 gramos de planta en 1 litro de agua. En este caso, en comparación con la decocción, se debe permanecer en contacto droga-disolvente por un tiempo que sea superior a un mes<sup>22</sup>.

#### 2.1.3.4 Infusión

Las infusiones también pertenecen a la clasificación de decocción. Estos son preparaciones principalmente líquidas de las plantas en las que se presenta el principio activo a concentraciones bajas<sup>22</sup>.

Para su preparación se debe incorporar la temperatura de ebullición del agua, para poder facilitar la extracción de productos solubles y, a su vez, esto hace que se mantenga un gran porcentaje de sus propiedades curativas. Se recomiendan utilizar 20-30 gramos de la planta o zona en la que se quieran extraer los metabolitos y todo esto debe estar en contacto con 1 litro de agua, conservando en un tiempo no superior a 12 horas<sup>22</sup>.

#### 2.1.4 Usos generales de las plantas medicinales

Una alternativa de los medicamentos que ha tomado fuerza es el uso de plantas medicinales como alternativa o como coadyuvante para tratar diferentes enfermedades desde lo agudo a lo crónico<sup>24</sup>. Se considera que el valor correspondiente de mercado global de los productos que provienen principalmente de lo que son las plantas medicinales, corresponde a los \$ 100 mil millones por año<sup>25</sup>. Pero es importante recordar que, aunque sean de origen natural, al tener un efecto terapéutico, se debe considerar la opinión de un médico para la supervisión de su uso. Lo anterior, sobre todo, porque pueden originarse interacciones planta-fármaco o puede estar produciendo una reacción adversa causada por la planta.

Los principales usos que los humanos le han conferido a estas especies vegetales son principalmente de carácter preventivo, curativo y de tratamiento; inclusive, se han estado creando diferentes estrategias sobre el futuro papel y posicionamiento que tengan las plantas medicinales, por esta razón con el paso el tiempo se va incrementando el interés por conocer sus efectos terapéuticos, dosis máximas, interacciones, entre otros<sup>25</sup>. Algunas de las enfermedades en las que las personas han implementado los remedios naturales son primordialmente para los resfríos, alergias, dolores o afectaciones estomacales y para dolores de la zona bucal como los dientes o encías<sup>26</sup>.

## 2.2 Medicina tradicional

El término de medicina tradicional hace referencia al uso terapéutico de plantas medicinales como sustitución de la medicina convencional, así como los medicamentos sintéticos. A este tipo de medicina natural se le conoce individualmente a cada uno como un fitofármaco. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), considera que la medicina tradicional utilizada por gran cantidad de países en el mundo, si es utilizada correctamente, entonces puede generar un beneficio y acceso a una calidad, seguridad y eficacia de un tratamiento<sup>27</sup>.

La medicina tradicional puede ser considerada ya sea como medicina complementaria, alternativa y no convencional. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la medicina complementaria o alternativa se utilizan para referirse a diferentes técnicas o prácticas utilizadas en la salud, sin ser parte de la norma convencional de un país<sup>28</sup>.

### 2.2.1 Tipos de medicina natural y tradicional

Las plantas medicinales, por ser utilizadas desde la antigüedad, se les ha establecido diferentes prácticas desarrolladas por los humanos en cuanto a los diversos tipos de uso que tiene esta medicina. Entre ellos sobresale la acupuntura, apiterapia, homeopatía, magnetoterapia, ozonoterapia y terapia floral. Existen más tipos, sin embargo, a continuación, serán descritos los más conocidos y utilizados frecuentemente.

#### 2.2.1.1 Acupuntura

La acupuntura es de las más conocidas, mayoritariamente en el área del Oriente, ya que es parte de la medicina tradicional de China. Ha sido de gran importancia como uso coadyuvante en diferentes enfermedades, suele indicarse para cervicalgia, dolores odontológicos, de cabeza, de rodilla y en la región lumbar. Lo anterior, porque sus efectos están relacionados con una liberación de opioides de tipo endógeno y una influencia con el sistema nervioso autónomo<sup>29</sup>.

Esta es una técnica donde se utilizan agujas muy delgadas y son introducidas en la superficie de diferentes zonas del cuerpo dependiendo del área específica del dolor o enfermedad del paciente. Además de las agujas, se han desarrollado otros métodos de

acupuntura como es el caso de la electro-acupuntura con el uso de estímulos eléctricos, la moxibustión con la aplicación de calor, la acupresión con la introducción de presión<sup>29</sup>.

#### 2.2.1.2 Apiterapia

La apiterapia ha presentado un desarrollo socioeconómico, científico y humano en la sociedad. Esta es una aplicación que se le da a la apitoxina o también conocido como veneno de abejas, la cual tiene propiedades antiinflamatorias y analgésicas. Esta ha generado un interés por el estudio de plantas medicinales en combinación con otras técnicas provenientes de colmenas y generar una potenciación de diferentes efectos, haciendo que el paciente tenga beneficios medicinales por parte de dos fuentes naturales. Por lo anterior, a su vez, se han generado diversos estudios sobre aspectos farmacoterapéuticos en cuanto reacciones adversas y efectos toxicológicos<sup>30</sup>.

#### 2.2.1.3 Homeopatía

La homeopatía se basa en una idea de que existe un principio de similitud, en el que toda sustancia similar, cura lo similar. En esta, se utilizan sustancias que son de lo poco diluidas a lo altamente diluidas y agitadas, que provienen de plantas, de animales o de minerales<sup>31</sup>.

#### 2.2.1.4 Magnetoterapia

La fisioterapia física suele usar campos magnéticos en los que permiten generar una restitución del equilibrio bioquímico celular, es decir, normalmente las células se componen de cargas eléctricas y esto ocasiona que la persona, cuando se enferma, genere un desequilibrio energético en el cuerpo, esta técnica lo que trata es de revertir ese proceso y generar el equilibrio adecuado. Su tratamiento está dirigido para la regeneración del tejido óseo, para procesos dolorosos, inflamatorios, lesiones en los músculos, entre otros<sup>32</sup>.

### **2.3 Metabolismo de plantas**

La fotosíntesis es uno de los procesos más importantes que realiza la planta, debido a que permite la realización del metabolismo, el cual es un proceso en el que se comprenden diversas reacciones químicas que ocurren en las células de los seres vivos; y su objetivo es obtener o realizar la síntesis de diferentes compuestos derivados de otros más simples<sup>33</sup>. Existe el metabolismo primario y secundario. En el primario es necesario que la planta lo

realice para que pueda sobrevivir; mientras que el metabolismo secundario, genera productos que no son vitales para la supervivencia de la planta y son denominados metabolitos secundarios.

### 2.3.1 Tipos de metabolismo

#### 2.3.1.1 Metabolismo primario

Las plantas deben de crear cierta cantidad de nutrientes, aminoácidos y carbohidratos para poder subsistir y poder abastecer las necesidades diarias que requiere la especie. En el caso de la fuente principal de energía, corresponde a los carbohidratos los cuales son productos directamente obtenidos a partir de la fotosíntesis; y en el caso de los aminoácidos, representan la forma de nitrógeno presente en las plantas<sup>34</sup>.

Un aspecto relevante por mencionar es la cualidad que tienen los metabolitos primarios de servir como parte funcional de la planta y la capacidad de crear a partir de ellos, los metabolitos secundarios que permitirán una defensa a la especie ante insectos y herbívoros<sup>34</sup>.

#### 2.3.1.2 Metabolismo secundario

La síntesis de metabolitos secundarios principalmente ocurre durante el final o cerca de la fase estacionaria de crecimiento; son derivados del metabolismo primario y algunos son beneficiosos para la planta debido a que le brinda protección ante insectos y plagas<sup>35</sup>. Además, es de suma importancia el papel que desempeñan estas sustancias como medio de defensa para la planta, esto porque les ayuda a adaptarse de diversas variantes del medio en el que se encuentren; y también, no solo es aporte a la planta, sino que, en los humanos, es relevante en la nutrición y por sus propiedades medicinales<sup>36</sup>.

Dentro de los principales componentes que presentan funciones de defensa, con los alcaloides, terpenos y glucosinolatos. En ciertas ocasiones, la respuesta ante la necesidad de producir defensas para la planta se puede hacer de forma constitutiva, es decir de forma esencial o natural; sin embargo, en otras circunstancias este sistema de protección es inducible, por lo que los metabolitos que normalmente se contienen en valores bajos, aumentan ante la respuesta a la alimentación de insectos, esto hace que se cree una dirección

de energía fundamentalmente hacia el crecimiento y reproducción, generando una mejor conservación de las especies<sup>34</sup>.

## **2.4 Aceites esenciales**

### 2.4.1 Características generales de los aceites esenciales

Según Dhifi et al.<sup>37</sup>, los aceites esenciales se pueden considerar como mezclas complejas que se caracterizan por tener compuestos volátiles y que suelen encontrarse principalmente en plantas de tipo aromáticas. Estas moléculas que son volátiles, por lo general de bajo peso molecular, incluyen a los metabolitos secundarios denominados fenoles y terpenos; estos últimos, a su vez, se clasifican en monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y politerpenos. Su composición química, es lo que les permite tener una actividad antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana, entre otros; además, no solamente en la parte terapéutica, sino que también en la alimentación y cosmética.

Además, Assuncao et al.<sup>38</sup>, detallan a los aceites esenciales como sustancias complejas que son originadas a partir del metabolismo secundario de las plantas y, basándose en el funcionamiento directamente para la planta, estas se encargan de generar una mayor protección, supervivencia y resistencia ante el ambiente.

### 2.4.2 Características físicas y químicas de los aceites esenciales

Los aceites esenciales, se encuentran en el citoplasma de plantas específicas y se caracterizan por ser miscibles en alcohol, éter y aceites fijos; sin embargo, en agua son insolubles. Alguna de las características físicas recalcan que suelen ser líquidos e incoloros cuando se encuentran a temperatura ambiente, con un olor determinado. Su densidad, por lo general, corresponde a una menor que la unidad. Respecto a su índice de refracción y actividad óptica, presentan valores muy altos<sup>37</sup>.

Referente a lo anterior, los aceites esenciales pueden encontrarse en las células oleíferas, en los canales secretorios, en las glándulas o en los tricomas. Y menciona que, a partir del material vegetal, si se somete al vapor de agua, esto ocasiona una liberación de una mezcla odorífera líquida, que corresponde al aceite esencial; estos tendrán la peculiaridad de presentar un olor concentrado, de la misma planta<sup>35</sup>.

Los aceites esenciales, son ampliamente utilizados en el sector de industria cosmética, por sus olores los incorporan en ciertos perfumes; y en las terapias aromáticas, tienen un papel fundamental en las técnicas de masajes o inhalaciones. También, sirven en el sector agrícola como ente de atracción de polinizadores, repelentes de diversos depredadores, entre otras<sup>37</sup>.

#### 2.4.3 Usos de los aceites esenciales

Los aceites esenciales suelen tener diferentes usos, entre ellos la aromaterapia, la cual corresponde al uso de fragancias y olores provenientes de especies naturales para utilizarlos en terapia, usualmente se conoce para curar la mente, el cuerpo y el alma de la persona que lo necesite<sup>39</sup>. Adicional a esto, son utilizados en combinaciones como productos de perfumería, en el sector de cosmetología, limpieza y en productos farmacéuticos<sup>40</sup>.

Además, algunos aceites esenciales suelen utilizarse como preservantes de alimentos, debido a que presentan propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Y han tomado mayor relevancia en este aspecto, debido al riesgo tan alto que se ha comprobado por el uso de conservantes sintéticos<sup>41</sup>. Se ha determinado que al ser utilizados como preservantes, también prolongan la estabilidad de los alimentos en su conservación, evitando que se deteriore y pierdan como tal su calidad por alguna oxidación o patógenos microbianos<sup>42</sup>.

#### 2.4.4 Principales propiedades fisicoquímicas

Los aceites esenciales son líquidos aromáticos y se caracterizan por la cualidad de ser volátiles, es decir, sustancias que con facilidad se convierten en vapor en contacto con el aire en condiciones normales. Algunos de estos no presentan olor. Están compuestos principalmente de metabolitos secundarios que son de carácter lipofílico, estos son más que todo monoterpenos y sesquiterpenos<sup>43</sup>.

Lo anterior es importante conocerlo debido a que, por ejemplo, si el aspecto físico de un aceite esencial cambia, quiere decir que probablemente a nivel químico también existió una alteración. Estos cambios pueden darse por temperatura, luz y disponibilidad de oxígeno<sup>44</sup>.

## 2.4.5 Principales componentes de los aceites esenciales

### 2.4.5.1 Alcoholes

Los alcoholes son uno de los tipos de metabolitos secundarios que se pueden encontrar en los extractos de diferentes especies. Estos se caracterizan por ser compuestos principalmente orgánicos en los que contendrán en su estructura un grupo hidroxilo unido a un átomo de carbono<sup>45</sup>.

### 2.4.5.2 Aldehídos

Adicional a los alcoholes, se pueden extraer aldehídos, los cuales corresponden a líquidos, mayoritariamente, que son de origen natural, incoloros e inflamables. Uno de los ejemplos de este grupo es el acetaldehído, el cual se encuentra en varias plantas, frutas, verduras. Esta sustancia, suele utilizarse para la elaboración de perfumes debido a que funciona como un agente aromatizante y, además, como colorante<sup>46</sup>.

### 2.4.5.3 Cetonas

En cuanto a las características de estructura química de las cetonas, estas van a presentar un grupo carbonilo en medio de una cadena de carbonos. Estas suelen ser un líquido incoloro con un sabor y un olor que es característico. Es importante recalcar que son sustancias que se evaporan con facilidad, son inflamables y son solubles en agua<sup>47</sup>.

### 2.4.5.4 Éteres

Los éteres son compuestos que en su estructura química presentan grupos alquilo o arilo. Suelen ser líquidos transparentes e incoloro con olor, son ligeramente solubles en agua y menos densos que el agua<sup>48</sup>.

### 2.4.5.5 Compuestos fenólicos

Uno de los compuestos principales en los extractos son los fenoles, los cuales tienen un grupo hidroxilo, suelen estar presentes como sólidos incoloros o blancos cuando son completamente puros. Son líquidos con un olor dulce característico<sup>49</sup>.

#### 2.4.5.6 Taninos

Los taninos son de gran importancia y suelen utilizarse mucho en las formulaciones con objetivo de prevención de enfermedades degenerativas debido a sus propiedades antioxidantes<sup>50</sup>.

#### 2.4.5.7 Flavonoides

Dentro de los metabolitos secundarios más abundantes en las especies, están los flavonoides, los que se caracterizan por tener estructuras fenólicas y por tener efectos beneficiosos en la salud de las personas. Son considerados como componentes indispensables en una variedad de aplicaciones farmacéuticas y cosméticas, lo anterior debido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimutagénicas y anticancerígenas<sup>51</sup>.

Un aspecto relevante de los flavonoides, es que las investigaciones respecto a estos metabolitos han indicado el descubrimiento de la baja tasa de mortalidad cardiovascular y la prevención de la enfermedad coronaria<sup>52</sup>.

#### 2.4.5.8 Terpenos

Uno de los metabolitos secundarios sintetizados por las plantas y que constituyen al grupo con mayor cantidad de tipos, son los denominados terpenos. Son originados a partir de diferentes metabolitos primarios como lo son: las hormonas como las giberelinas, citoquininas y el ácido abscísico; también provenientes de los carotenoides y clorofilas. En cuanto a sus características, estos mayoritariamente son insolubles en agua y se generan de unidades de isopreno (cinco átomos de carbono). Son muy utilizados por sus cualidades aromáticas y porque han tomado un gran auge en la medicina tradicional, por sus posibles efectos antibacterianos y otros usos farmacéuticos<sup>35</sup>.

En referencia a los diferentes medios de producción de metabolitos secundarios, específicamente los terpenos, presentan distintos precursores metabólicos primarios que se generan por medio de diferentes vías de biosíntesis. Entre algunas de estas rutas, resaltan las vías del mevalonato, esta va a activarse en el citosol de las células y en ese momento, tres moléculas de acetil-CoA se condensan para formar ácido mevalónico que reacciona hasta crear el isopentenil difosfato (IPP) o como es conocida también, la ruta del metileritritol

fosfato (MEP) que esta va a funcionar en cloroplastos; y genera también la ruta de desoxixilulosa del fosfato y pirofosfato de isopentenilo (IPP)<sup>35</sup>.

Entre algunas de las unidades de isopreno bioquímicamente activas, sobresalen el isopentenil difosfato y dimetilalil difosfato, que son moléculas que se generan a partir de las vías mevalonato y desoxixilulosa fosfato. La diferencia de estas dos rutas metabólicas es que la vía del mevalonato va a activarse más que todo en los eucariotas superiores y en muchas bacterias; por otro lado, la vía del fosfato de desoxixilulosa solamente está presente en cloroplastos de algas verdes, de plantas superiores y en algunas bacterias<sup>35</sup>.

#### 2.4.5.8.1 Sesquiterpenos

Referente a los sesquiterpenos, estos son los que están formados por tres unidades de isopreno. Es un grupo que puede estar presente en las hojas, frutos y raíces de plantas angiospermas, algunas gimnospermas y briófitas. Tienen propiedades antifúngicas, antibacterianas y antivirales; estos beneficios que le otorga al hombre han demostrado perspectivas de ser un promotor de la salud contra síndromes de carácter metabólico, como la hiperglucemia, hiperlipidemias, problemas cardiovasculares, diabetes cáncer de mama, colon, páncreas, próstata, entre otros<sup>53</sup>.

#### 2.4.5.8.2 Monoterpenos

Dentro de la clasificación de los terpenos, se encuentran los monoterpenos que constan de dos isoprenos enlazados, pueden ciclarse y oxidarse. Se caracterizan por tener el peso molecular muy bajo y por esta razón, se encuentran mayoritariamente como aceites esenciales. Son muy utilizados para estudios relacionados con su actividad antimicrobiana, hipotensiva, analgésica, antioxidante, antiinflamatoria, entre otros. Algunos de sus ejemplos sobresalen el mirceno, el limonero, mentol y eucaliptol<sup>54</sup>.

#### 2.4.5.8.3 Diterpenos

Los diterpenos, son sustancias terpénicas que pueden estar presentes en plantas, hongos, bacterias; estos muestran variedad de actividades biológicas y son utilizados, algunos de ellos, como medicamentos, aditivos alimenticios, en la perfumería, agricultura, entre otros. Son denominados por definición como compuestos de 20 carbonos, a base de cuatro moléculas de isopreno. Estas moléculas son predominantemente biosintetizados por

la vía del fosfato de desoxixilulosa, sin embargo, también se podría a partir de la vía mevalonato<sup>55</sup>.

#### 2.4.5.8.4 Triterpenos

Los triterpenos, de todos los metabolitos que crea la planta, junto con los polisacáridos, son de los más abundantes. Están compuestos por seis unidades de isopreno y la mayoría de tienen 27 o 30 átomos de carbono. Algunas de las propiedades medicinales que presentan, resaltan la actividad antitumoral, antihepatitis, anti-VIH, antiinflamatoria, antioxidante, entre otros. Y uno de sus ejemplos más significativos por su abundancia, son los ácidos ganodéricos, que presentan cuatro unidades cíclicas y de isopreno tiene dos lineales<sup>56</sup>.

### 2.5 Propiedades fisicoquímicas

#### 2.5.1 Consideraciones generales

Las propiedades fisicoquímicas son un conjunto de cualidades o características que se le otorgan a los materiales o sustancias que corresponden a aspectos como el color, olor, sabor, forma, dureza, densidad, viscosidad, masa, entre otros.

#### 2.5.2 Características fisicoquímicas

##### 2.5.2.1 Color

Propiedad intrínseca a la estructura de la molécula relacionada con el nivel de insaturación y a la presencia de cromóforos. El color puede ser utilizado como indicador para la presencia de solventes o degradación<sup>57</sup>.

##### 2.5.2.2 Olor

Propiedad inherente a los grupos funcionales presentes<sup>58</sup>.

##### 2.5.2.3 Sabor

Es diferenciado en base a la patabilidad. Si el sabor de un principio activo es considerado desagradable, se debe evitar su administración por vía oral para evitar problemas de adherencia al tratamiento<sup>59</sup>.

#### 2.5.2.4 Masa

La masa es la expresión de la cantidad de materia de un material o sustancia y la unidad principal de medida establecida por el Sistema Internacional de Unidades es el kilogramo (Kg)<sup>60</sup>.

#### 2.5.2.5 Solubilidad

Función de la estructura química de cada molécula, su determinación debe ser tomada en cuenta cuando se realice un estudio de preformulación. Se debe tomar en cuenta la solubilidad de las sustancias en distintos solventes, temperaturas, pH, etc<sup>61</sup>.

#### 2.5.2.6 Densidad

La densidad es una relación entre la masa de una sustancia entre el volumen de la misma<sup>60</sup>.

#### 2.5.2.7 Punto de fusión

El punto de fusión como la temperatura a la que las fases sólida y líquida están en equilibrio<sup>62</sup>. El punto de fusión indica la pureza de la sustancia.

#### 2.5.2.8 Punto de ebullición

El punto de ebullición es la temperatura en la que se determina que la sustancia tiene una alteración en cuanto a su fase. Es decir, pasa de estar líquido a gaseoso<sup>63</sup>.

#### 2.5.2.9 Viscosidad

El término consistencia, puede considerarse análogo a la viscosidad. Esta es una propiedad de las sustancias líquidas que describen el comportamiento del líquido al flujo, en este caso van a permitir una resistencia y generan una fricción interna<sup>64</sup>.

#### 2.5.2.10 pH

El pH es el grado de iones hidronio o la ausencia de estos, que se encuentran en un líquido<sup>65</sup>. Entre más iones hidronio presentes, quiere decir que es más ácido; y por su contraparte, entre menos tenga, más basicidad.

## 2.6 Métodos fisicoquímicos

### 2.6.1 Objetivo de los métodos fisicoquímicos

Los métodos fisicoquímicos consisten en estudiar todo lo referente a propiedades físicas y relacionarlos con las interacciones que tienen con componentes químicos<sup>66</sup>. Adicional a esto, permite dar particularidades sobre aspectos importantes de una sustancia, así como lo son las características descritas en el punto 2.5.2.

### 2.6.2 Equipos utilizados en los análisis fisicoquímicos

Los equipos utilizados en los análisis fisicoquímicos, son los que permiten determinar las diferentes propiedades fisicoquímicas de diversas sustancias. En este caso, se desea analizar las características tanto químicas como físicas de los extractos de las hojas y los frutos, en los que se pretende obtener los parámetros descritos en el apartado 2.5.2 por medio de las técnicas que se explicarán a continuación.

#### 2.6.2.1 Viscosímetro

El viscosímetro es el encargado de medir la viscosidad de una sustancia. Esto lo realiza por medio de la utilización de resistencia mecánica en la que mide la fuerza necesaria para convertir la sustancia en estudio en un fluido<sup>67</sup>.

#### 2.6.2.2 Densímetro o picnómetros

La densidad, es otra de las propiedades fisicoquímicas de interés. Esta es medida por medio de un densímetro o popularmente llamado picnómetro, el cual consiste en tomar en cuenta tanto el peso como el volumen de una muestra y establecer este parámetro basándose en el principio de flotabilidad de Arquímedes, es decir, cada objeto presente en una sustancia va a tener un empuje vertical, ya sea hacia arriba o hacia abajo, en el que esa fuerza implicada será igual a la densidad de dicha muestra. Se obtiene mediante cálculos matemáticos<sup>68</sup>.

#### 2.6.2.3 pH-metro

El equipo destinado a la medición del pH es el pH-metro. Este artefacto lo que mide realmente es la cantidad de iones presentes en una sustancia, tanto iones hidronio (H<sup>+</sup>) como iones hidroxilo (OH<sup>-</sup>), en el que a mayor cantidad de iones hidronio más ácido y menor cantidad de iones hidronio, más básico. Se registra en números, indicando que si es mayor a

7 es una sustancia ácida, mientras si es un número menor a 7 es básica. Si es una sustancia con un pH de 7, quiere decir que es neutra<sup>69</sup>.

#### 2.6.2.4 Balanza

Existen dos tipos de balanza, la granataria y la analítica. Ambas sirven para poder obtener por medio de un valor numérico, el peso de una muestra. La balanza granataria es utilizada para realizar mediciones sensibles con rapidez y sencillez, incluso el límite de esta es de 100 gramos<sup>70</sup>. Y, por otro lado, la balanza analítica es útil para muestras pequeñas, con mayor precisión que la granataria<sup>71</sup>.

#### 2.6.2.5 Termómetro

La temperatura es otra propiedad fisicoquímica importante, la cual es medida por un termómetro. A nivel de esta investigación se va a utilizar para identificar los puntos de ebullición y el de fusión de las muestras; son de gran utilidad ya que permiten un alto nivel de exactitud y se utiliza tanto para temperaturas altas como para bajas<sup>72</sup>.

### **2.7 Técnicas de extracción de aceites esenciales**

Para la extracción de los aceites esenciales de las diferentes especies de plantas, en general se pueden utilizar muchos métodos, los cuales serán descritos a continuación.

#### 2.7.1 Destilación por arrastre por vapor

La técnica más común para la obtención de los aceites esenciales corresponde a la destilación por arrastre por vapor. Este consiste en un proceso de separación en el que se utiliza como principal solución el agua, pero esta debe estar en vapor, es decir se someterá a un aumento de la temperatura para que ebulle y se evapore; esto se debe realizar debido a que el agua es el que facilitará la obtención de los componentes volátiles presentes en la parte de la planta que se quiera estudiar<sup>73</sup>.

#### 2.7.2 Disolventes acuosos

Este tipo de extracción, tanto con disolventes orgánicos como acuosos, funciona de la misma manera, su principio es colocar el disolvente en contacto con la parte de la especie que se quiere obtener el extracto, esperar cierta cantidad de tiempo y finalmente se obtiene

el aceite esencial en conjunto con el disolvente. El solvente más utilizado en este caso es el agua<sup>74</sup>.

En este caso, se pueden utilizar con disolventes acuosos dos técnicas, la decocción y la infusión. En primera instancia, la decocción consiste en utilizar temperatura, calentar hasta ebullición el solvente acuoso que se encuentra en contacto con la parte de la planta y obtener por medio de este método el aceite esencial. Es importante recalcar que en este caso, se debe asegurar que los metabolitos no sean termosensibles porque de lo contrario, se evaporan<sup>74</sup>.

Por otro lado, la infusión implica colocar la parte de la planta en un recipiente que contiene agua caliente al punto de ebullición y se deja hervir durante un tiempo de 2 a 5 minutos<sup>74</sup>.

### 2.7.3 Disolventes orgánicos

Entre los solventes orgánicos más utilizados sobresale el éter dietílico, hexano, ciclohexano, acetato de metilo, 1-butanol, 2-butanol, metil etil cetona, diclorometano, metil 1 propanol y propanol<sup>75</sup>. De las técnicas de extracción que utilizan este tipo de disolventes está la maceración y la percolación.

La maceración es un método que obtiene extractos de productos en estado sólido al sumergirlo en un líquido por un tiempo determinado, este puede ser tanto en frío, es decir a temperatura ambiente, o también, puede ser sometido a cierta temperatura<sup>75</sup>.

### 2.7.4 Soxhlet

Otro de los métodos más utilizados para la extracción de aceites esenciales en el soxhlet, el cual es un aparato destinado en obtener sustancias de baja solubilidad en el disolvente de extracción, ya que es una técnica de separación sólido-líquido<sup>76</sup>. El extractor se encuentra en un condensador y matraz, en el que el solvente va a estar en constante reflujo por calentamiento del matraz y este pasa por un sólido que está en el extractor, realizando la separación entre ellos<sup>77</sup>.

### 2.7.5 Extracción por prensado

Esta es una técnica utilizada principalmente para obtener aceites esenciales de plantas que tengan semillas oleosas, por lo que es uno de los métodos en el que se obtiene un porcentaje de rendimiento mayor por la gran cantidad de aceite que se consigue, se menciona que es por encima del 45%<sup>78</sup>.

### 2.7.6 Extracción asistida por ultrasonido

Este tipo de método de extracción permite obtener sustancias bioactivas de los residuos agroindustriales. Una de sus grandes ventajas es que es una técnica que es rápida, limpia y amigable con el ambiente<sup>79</sup>.

### 2.7.7 Extracción asistida por microondas

Este tipo de técnica utiliza recipientes cerrados para poder calentar hasta el punto de ebullición el disolvente que se tendrá para la extracción, esto debido a que la temperatura alta aumenta la solubilidad de los metabolitos de interés y baja la viscosidad haciendo más sencillo la introducción en la matriz<sup>80</sup>.

### 2.7.8 Extracción con fluidos supercríticos

Los fluidos supercríticos hacen referencia a cualquier sustancia que se encuentre en un punto crítico termodinámico tanto en temperatura como en presión. Lo anterior quiere decir, que tiene la capacidad de difundirse a través de sólidos, pero también por medio de gases y disolver muestras como un líquido<sup>81</sup>. La extracción con este tipo de fluidos, utiliza el dióxido de carbono y lo somete a este punto crítico permitiendo la obtención de extractos naturales<sup>82</sup>.

### 2.7.9 Hidrodestilación

Una hidrodestilación consiste en el proceso para obtener el aceite esencial de alguna especie por medio del uso de vapor saturado a presión atmosférica. En este caso, la muestra vegetal está completamente en contacto con el agua y esta debe estar en ebullición constante<sup>83</sup>.

## 2.8 Métodos de identificación y caracterización de metabolitos

### 2.8.1 Cromatografía

Uno de los métodos más utilizados y de los más efectivos, es la cromatografía y sus diferentes tipos. Este es un procedimiento de carácter químico que permite tanto la separación de componentes como la identificación, cuantificación, cualificación y determinación de ellos<sup>84</sup>.

#### 2.8.1.1 Cromatografía de capa fina (TLC)

La cromatografía de capa fina es una técnica que se usa para separar pero a la vez identificar los componentes de las mezclas. Esto lo hace por medio de diferencias de polaridades<sup>85</sup>.

#### 2.8.1.2 Cromatografía de capa fina de alta resolución (HPLC)

Este tipo de cromatografía funciona para separar e identificar componentes por medio de dos fases, una estacionaria no polar que por lo general está elaborada de sílica; y la fase móvil<sup>86</sup>. Es relevante recalcar que en este tipo de cromatografía es para mezclas poco o nada volátiles.

#### 2.8.1.3 Cromatografía de columna

Esta técnica separa componentes de una mezcla por medio de la utilización de columnas, que son tubos cilíndricos de manera vertical, que en su interior están compuestas por la fase estacionaria y por encima de esta pasa la fase móvil<sup>87</sup>.

#### 2.8.1.5 Cromatografía de gases (CG)

La cromatografía de gases, es una de las técnicas de separación e identificación que fue creada y ha sido utilizada desde hace mucho tiempo atrás, esto por su gran efectividad en aislar físicamente las sustancias presentes en mezclas complejas de compuestos que son altamente volátiles<sup>88</sup>. Usualmente se usan gases como el helio, argón, nitrógeno y dióxido de carbono<sup>89</sup>.

## 2.8.2 Métodos espectroscópicos

La espectroscopía es una técnica basada en detectar la absorción o emisión de radiación electromagnética que tiene una muestra<sup>90</sup>.

### 2.8.2.1 Absorción

La espectroscopía de absorción corresponde a los fotones que son absorbidos por una mezcla. Esta muestra una absorbancia a una determinada longitud de onda, temperatura y condiciones de la disolución<sup>91</sup>.

### 2.8.2.2 Espectro UV-Vis

Esta técnica permite determinar una concentración de un compuesto que se encuentra presente en una solución<sup>92</sup>. La absorción de la radiación genera un electrón en estado de excitación, que por lo general estos suelen ser los electrones presentes en los enlaces de las moléculas por lo que genera diferentes picos de absorción que permite determinar los componentes presentes de acuerdo a estos picos<sup>93</sup>.

### 2.8.2.3 IR

La espectroscopía IR se ocupa de la región infrarroja del espectro electromagnético, el cual corresponde a la luz con una longitud de onda más larga y menor frecuencia que la luz visible<sup>94,95</sup>.

### 2.8.2.4 RMN

Esta técnica de identificación se realiza mediante el campo magnético de una partícula de espín que gira alrededor de este. Se mide la fuerza del campo magnético local alrededor de la partícula<sup>96</sup>.

### 2.8.2.5 Espectroscopía de masas

La espectroscopía de masas facilita la identificación de biomoléculas presentes en muestras biológicas y también suele utilizarse para ciertos estudios de interacciones de proteína-proteína. Toma en cuenta la desviación de iones y se basa en la carga, la masa y la velocidad<sup>97,98</sup>.

### 2.8.3 Pruebas cualitativas de identificación

#### 2.8.3.1 Libermann Burchard

Esta es una prueba que se realiza para determinar la presencia de triterpenos y esteroides en el aceite esencial. Lo que se debe realizar es disolver una pequeña cantidad de muestra (1,5 miligramos) en cloroformo para añadir el reactivo que se prepara agregando una gota de ácido sulfúrico concentrado en una mezcla de 1 mL de anhídrido acético con 1 mL de cloroformo. La prueba es positiva con la formación de colores azul o verde para esteroides y rojo, violeta o morado para triterpenos<sup>99</sup>.

#### 2.8.3.2 Reactivo Vainillina-ácido sulfúrico

Para identificar los sesquiterpenos, se deben realizar dos disoluciones, el número I es de ácido sulfúrico al 5% en etanol y la disolución II, es de vainillina al 1 % en etanol. Se asperjan los cromatofolios con la solución I luego con la II se calienta a 110 °C por 5- 10 minutos<sup>100</sup>.

#### 2.8.3.3 Prueba de cloruro férrico al 12,5% (FeCl)

La presencia de taninos condensados y fenoles, se pueden identificar al agregar dos a tres gotas de solución de  $\text{FeCl}_3$  a las soluciones de los extractos acuosos. Si se torna a una coloración de verde oscuro a azul índigo muestra la presencia de fenoles, mientras que el color azul completo indica que los taninos de la muestra son hidrolizables<sup>101</sup>.

#### 2.8.3.4 Reacción de Borntrager

Para identificar quinonas y antraquinonas, se debe colocar en un tubo de ensayo 5 mL del extracto crudo. Añadir 1 mL de peróxido de hidrógeno al 20% y 1 ml de ácido sulfúrico al 50%. Calentar la mezcla en un baño de agua hirviendo durante 15 minutos. Enfriar. Añadir 5 mL de tolueno. Agitar sin emulsionar. Recuperar la fase orgánica (tolueno). Trasvasar 2 mL fase orgánica a un tubo de ensayo. Añadirle 1 mL de una disolución de NaOH al 5% con amoníaco al 2%. Agitar sin emulsionar. Finalmente, si la capa acuosa toma una coloración rosada a roja intensa es prueba positiva<sup>102</sup>.

#### 2.8.3.5 Prueba de Shinoda

Para identificar flavonoides, en un tubo con 1mL de extracto diluido se le agrega un trozo de viruta de magnesio amalgamado, se le debe aplicar calor (60°C) y después cinco gotas de ácido clorhídrico concentrado por las paredes. La aparición de colores que van del rojo al violeta indica la presencia de una flavona o dihidroflavona<sup>103</sup>.

#### 2.8.3.6 Reactivo de KOH

Para la identificación de cumarinas, se deben disolver 100mL de la muestra en una solución de NaOH al 10%, si aparece una coloración amarilla que desaparece al acidular, la prueba es positiva<sup>104</sup>.

### 2.9 Canellaceae

#### 2.9.1 Características generales de la familia Canellaceae

La especie *Pleodendron costaricense* pertenece a la familia Canallaceae, que se caracteriza principalmente por agrupar a árboles de tipo leñosos que se encuentran en las zonas tropicales y subtropicales<sup>105</sup>. Esta contiene 21 especies en cuatro géneros: *Canella*, *Cinnamodendron*, *Pleodendron* y *Warburgia*<sup>38</sup>. La mayoría de las especies que comprenden los cinco géneros suelen encontrarse en el Sur de Florida, las Indias Occidentales, Noroeste de América del Sur, Sureste de Brasil, Sureste de África y Madagascar<sup>106</sup>.

Según Assuncao et al.<sup>38</sup>, en cuanto a los aspectos etnobotánicos, la relación que existe de esta familia con el ser humano resalta el uso popular para tratamientos contra algunas patologías como lo son los dolores musculares, infecciones, cicatrizaciones, estomatitis, antimaláricos, entre otros. Esto se debe a que a partir de las especies que conforman esta familia, pueden utilizarse como aceites esenciales, principalmente extraídos de las hojas y el tallo.

Entre las especies que pertenecen a la familia Canellaceae con más estudios previos, sobresalen la: *Canella winterana*, *Cinnamosmafraganes*, *Cinnamosma madagascariensis*, *Cinnamodendron dinisii*; y estas, al realizar extracciones e investigaciones más específicas,

se han identificado presencia de diferentes componentes que tienen una gran influencia terapéutica, entre ellos: 1,8-cineol, linalool, limoneno, alfa y beta-pineno; con propiedades antifúngicas, citotóxicas, insecticidas, inmunomoduladores, larvicidas, antiinflamatorias, anticonvulsivas, entre otros<sup>38</sup>.

## **2.10 *Pleodendron costaricense***

Al comprender las diferentes características que presenta la familia Canellaceae, en cuanto a su ubicación geográfica, aspectos etnobotánicos de los usos más populares de las plantas por el hombre, los diferentes géneros que presenta, entre otros y al profundizar estos últimos, se puede afirmar que se encuentra dentro del género *Pleodendron* a la especie en estudio, el *Pleodendron costaricense*.

### 2.10.1 Descubrimiento de la especie

Dentro de la biodiversidad que presenta Costa Rica, en el Sur del Pacífico del país, fue descubierta la especie *Pleodendron costaricense*, específicamente en el bosque lluvioso; la cual es la única especie de la familia Canellaceae de América Central<sup>106</sup>. Respecto a la historia de su descubrimiento, fue en agosto del 1998 cuando uno de los árboles de la zona, presentó frutos con muchas semillas pequeñas de color negro; seguidamente, se tomó para poder examinar, diseccionar y analizar el olor de los especímenes, algunos de los botánicos encargados, que pertenecían al Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio), apreciaron una similitud del olor de las frutas y semillas con especies de la familia Myristicaceae<sup>1</sup>.

Después de muchas investigaciones y un periodo de un año, lograron identificar a la especie, lo que resultó complicado por la razón de que en Costa Rica nunca había aparecido alguna planta que se encontrara dentro de la división Canellaceae. Anteriormente, solo se conocía la *Canella winteranades* de Mesoamérica, especialmente en Yucatán que se localiza en México<sup>1</sup>.

### 2.10.2 Descripción física de la especie

Algunas de las características físicas principales que presenta la especie *Pleodendron costaricense*, corresponde a que es un árbol, aproximadamente de 15 a 35 metros de altura, es escamoso, con una corteza externa de una coloración gris y blanca. En cuanto a su corteza interna presenta una coloración rosa pálido y se considera un árbol de tipo aromático; sus

ramas son grises pálidos y sus yemas terminales son de un largo de 9 mm y un ancho de 2 mm. La forma de las hojas es ovadas-falcadas; y las hojas maduras están enrolladas y sus márgenes son ciliados; suelen ser brillantes en la parte superior cuando está seca, se marcan las venas laterales de 12 a 13 pares, de igual manera, unos puntos claros de glándulas son visibles con lupa. Tiene 12 pétalos y su fruto característico es la baya verde y lisa, con un largo de 2,5 y un ancho de 3 cm<sup>1</sup>.

Por otro lado, el árbol mide aproximadamente de 15 m de altura, con la cualidad de ser aromático, con sustancias volátiles en las diferentes glándulas que tiene su corteza y hojas, que permiten la producción de aceites esenciales; además la madera presenta en su estructura una porosidad difusa y que estos poros por lo general son de un diámetro moderado. También, en cuanto a los elementos vasculares de esta especie, son muy largos y que sus vasos son exclusivamente solitarios. Se considera a esta planta con características y rasgos anatómicos primitivos de las plantas angiospermas<sup>106</sup>.

La familia Canellaceae, es reconocida por tener hojas alternas, enteras, estipuladas coráceas y aromáticas; además de las flores con tres sépalos, un ovario con placentación parietal y un fruto que es una baya. La especie *Pleodendron costaricense*, presenta 3 sépalos, 12 pétalos y 6 carpelos<sup>1</sup>.

### 2.10.3 Fenología

La fenología hace referencia al estudio de las etapas o actividades constantes del ciclo de vida de las plantas, considerando la producción de las estructuras vegetativas y reproductivas; además, se relaciona con los factores bióticos y abióticos, que son los que van a determinar el momento correcto para que la planta realice su crecimiento y reproducción<sup>107</sup>.

Por lo general, la especie *Pleodendron costaricense* tiene su proceso de floración en febrero y marzo. No todas las flores de esta planta se abren al mismo tiempo, se debe pasar por un proceso denominado antesis, que es una fase en la que la flor se va a expandir, en el momento de la polinización. Las flores que son maduras tienen principalmente una forma globosa, con los pétalos erectos y con una pequeña abertura circular. En cuanto a los frutos, que son las bayas, a finales de julio y agosto están casi maduros<sup>1</sup>.

#### 2.10.4 Hábitat y distribución

Algunas de las localidades en las que se ha encontrado la especie *Pleodendron costaricense*, ha sido en la Provincia de Puntarenas de Costa Rica, en dos localidades en el Cantón de Osa, en la Península de Osa y en el Cantón de Parrita, en la cuenca del Río Pirrís-Damas. En la Provincia de San José, se localiza en el Cantón de Tarrazú. Estas zonas, se caracterizan por estar en el Pacífico del Sur de Costa Rica, donde se da la formación del bosque húmedo tropical, a una altura aproximada de 200 a 300 m de elevación. Y está a una distancia de 2000 Km del que consideran pariente filogenéticamente más cercano, a la especie *Pleodendron macranthum*, en Puerto Rico<sup>1</sup>.

#### 2.10.5 Principales usos

El *P. costaricense* fue descrita en el 2005, por lo que se ha ido investigado sus posibles usos terapéuticos, según Pillco, López, Álvarez-Alcázar y Whitworth<sup>7</sup> observaron que los primates utilizaban la especie para medicina tópica. Treyvaud et al.<sup>5</sup> analizaron su efecto contra especies fúngicas y cepas de diversos hongos así como la *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Wangiella dermatitidis*, *Alternaria alternata*, entre otras. Por lo anterior, es de interés evaluar si realmente el extracto de las hojas y el de los frutos tienen el efecto sobre la *Candida albicans* para poder generar un posible producto tópico ante este hongo.

#### 2.10.6 Composición química conocida

De acuerdo con el estudio realizado por Treyvaud et al.<sup>5</sup>, se identificaron algunos componentes presentes en el aceite esencial de las hojas y corteza del *P. costaricense*, los cuales se describirán a continuación.

##### 2.10.6.1 Alfa-pineno

El alfa-pineno es un líquido transparente e incoloro. Es menos denso que el agua y se considera insoluble en agua<sup>108</sup>. Tiene un papel como metabolito vegetal y también como metabolito humano<sup>109</sup>.

#### 2.10.6.2 Beta-pineno

El pineno es un hidrocarburo de tipo monoterpenoide bicíclico de doble enlace. Tiene un punto de ebullición entre 163 a 166 °C. Y además, es un líquido orgánico incoloro que es soluble en aceite pero insoluble en etanol y agua<sup>110</sup>.

#### 2.10.6.3 Beta-mirceno

El beta-mirceno es un monoterpeno que como efecto terapéutico beneficioso es que funciona como agente antiinflamatorio, agente anabólico, fragancia, agente saborizante y componente de aceite volátil<sup>111</sup>.

#### 2.10.6.4 Beta-tujeno

El beta-tujeno está sustituido en posiciones 1 y 4 por grupos isopropilo y metilo. Tiene un papel importante como metabolito vegetal<sup>112</sup>.

#### 2.10.6.5 Beta-cariofileno

El beta-cariofileno es un sesquiterpeno bicíclico, genera un aroma distintivo en el aceite esencial y en la planta le facilita una mejor supervivencia en cuanto a protección y evolución<sup>113</sup>.

### **2.11 Aplicación terapéutica**

#### 2.11.1 Consideraciones generales

Una aplicación terapéutica, es todo aquello que es utilizado para curar, diagnosticar, tratar o aliviar alguna patología o síntomas de esta<sup>114</sup>. Es importante recalcar la diferencia entre un efecto farmacológico y uno terapéutico, lo cual se relaciona con su aplicación. En el caso de la primera variable, el efecto farmacológico, se considera cualquier cambio o alteración que se genera en el cuerpo después de administrar una dosis normal de un medicamento o sustancia medicinal. Y, por otro lado, el efecto terapéutico, es el que produce el efecto beneficioso o el esperado por parte del producto.

Es decir, el efecto farmacológico va a generar un cambio ya sea positivo o negativo después de administrar el fármaco, mientras que el terapéutico solamente el positivo, el cual es el esperado y para lo que es destinado el fármaco.

## 2.12 Actividad antimicótica

### 2.12.1 Mecanismo de acción

El mecanismo de acción general de los medicamentos y sustancias con actividad antimicóticas es el realizar daño en la membrana celular y para que, de esta manera, se inhiba la 14 $\alpha$ -desmetilasa<sup>115</sup>.

### 2.12.2 Evaluaciones antimicóticas

Las evaluaciones antimicóticas consisten en análisis que se realizan para comprobar si verdaderamente una sustancia o medicamento presenta el efecto de poder impedir la proliferación de hongos. En la presente investigación, para lo que compete a las evaluaciones antimicóticas, se tomarán en cuenta principalmente métodos que se realizan en forma *in vitro*.

#### 2.12.2.1 Método de difusión en agar

Es un método que en investigaciones anteriores lo han utilizado para evaluar actividades antimicóticas de aceites esenciales de diversas plantas. Este consiste principalmente en poner en contacto a la fase levaduriforme con la micelial, es decir, la del aceite esencial. Para esto, con la utilización de un asa de siembra se transfiere una porción del hongo en un tubo de 4 a 5 mL de solución salina estéril, se intuba el caldo a 35-37°C con una duración entre 2 a 6 horas. Cuando lo anterior esté listo, se pasa en toda la placa utilizando la técnica del hisopo y se colocan pozos de placa que permitan observar el halo que puede generar la sustancia aceitosa. Se deja reposar 30 minutos a temperatura ambiente y se incuban las placas a 37°C durante 7 días<sup>116</sup>.

### 2.12.3 Medidas de esterilización

El proceso de esterilización corresponde al método utilizado en los laboratorios principalmente de microbiología, para poder eliminar toda forma de vida microbiana, para esto existen diversos métodos, sin embargo, el que se tendrá énfasis es el de radiación ultravioleta (UV).

### 2.12.3.1 Radiación UV para desinfección microbiológica

La radiación UV es eficaz para la desactivación de bacterias, virus, esporas, hongos, quistes, entre otros. Forma parte de las desinfecciones químicas y físicas. El tiempo recomendado de exposición es de 4 horas<sup>117</sup>.

## 2.13 Candidiasis

### 2.13.1 Fisiopatología

La candidiasis corresponde a una patología cutánea a causa de una parasitación de hongos o bien conocidos como levaduras. Debido a que la mayor parte de las especies de *Cándida* son saprofitas, es decir, que se alimentan de partículas en descomposición, estos afectan principalmente las mucosas como en el esófago, vagina, en las uñas, a nivel gastrointestinal y en piel, entre otros<sup>118</sup>.

### 2.13.2 Epidemiología

La candidiasis es una enfermedad de carácter mundial, incluso existen registros de que la tasa de mortalidad corresponde a un 50% o más, en terapia intensiva. Entre las especies que son más frecuentes que desarrollen una patología son: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* y *Candida glabrata*<sup>119</sup>.

### 2.13.3 Manifestaciones clínicas

En cuadros de candidiasis usualmente se suelen presentar edemas, piel enrojecida, picazón, sensación de ardor, dolor, molestias vaginales, secreción vaginal espesa y sin olor<sup>120</sup>. Y suelen ser complicaciones graves en los pacientes que son inmunosuprimidos por lo que se debe abarcar lo más antes posible.

### 2.13.4 Diagnóstico

El diagnóstico de la candidiasis es principalmente mediante los signos, síntomas, historia clínica y el examen físico del paciente. Sin embargo, no siempre ocurre de esta manera, sino que puede realizarse mediante exámenes directos por medio de cultivos de hongos<sup>118</sup>.

### 2.13.5 Tratamiento farmacológico

El principal tratamiento consiste en explicar al paciente como corregir ciertos factores de su vida cotidiana que pueden estar facilitando la reproducción del hongo y tratar las enfermedades subyacentes que puedan estar implicando una proliferación de la especie. Adicional a esto, el tratamiento farmacológico para directamente abarcar la patología de candidiasis es el uso de un medicamento tópico o sistémico<sup>118</sup>.

Dentro de los medicamentos que son tópicos, pueden utilizarse el cotrimazol, miconazol, ketoconazol, sertconazol, terbinafina o naftilina. Y de los que son sistémicos los mayormente empleados son el itraconazol o fluconazol<sup>118</sup>.

## 2.14 Formulaciones biofarmacéuticas

### 2.14.1 Objetivo de formulaciones biofarmacéuticas

El objetivo de las formulaciones biofarmacéuticas radica en conseguir una actividad farmacéutica o terapéutica indicada de un medicamento en el aspecto clínico, sin embargo, para esto, se deben tomar en cuenta diversos factores que se mencionarán en el apartado 2.14.2 que son aplicados y estudiados desde el laboratorio de industria farmacéutica para poder lograrlo<sup>121</sup>.

### 2.14.2 Factores biofarmacéuticos por considerar

En las formulaciones se debe considerar aspectos de los excipientes, los cuales permiten mejorar el producto, la aceptabilidad del paciente, una mejoría en la estabilidad y a la vez la calidad. Un factor importante son las incompatibilidades de excipientes con el principio activo, para poder establecer cuáles son los que se pueden utilizar y cuales descartar<sup>122</sup>.

La solubilidad y la permeabilidad son necesarios tomarlos en cuenta ya que en este caso existen cuatro clases establecidas por el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica, la I y IV en la que la sustancia tiene baja solubilidad, I y III con alta solubilidad, II y I con alta permeabilidad y IV y III con baja permeabilidad<sup>123</sup>.

## **CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO**

En el siguiente apartado se estará exponiendo la metodología de esta investigación, que consiste en los procesos, técnicas, reactivos, criterios de exclusión, criterios de inclusión y el análisis de las diferentes variables por utilizar en la sección de búsqueda bibliográfica.

### 3.1 Enfoque

El enfoque de la investigación se refiere a la naturaleza del estudio, existen tres tipos: la mixta, cualitativa y cuantitativa. Es el que se relaciona con la definición del tema, el planteamiento del problema, la técnica metodológica y la recolección de datos junto con su respectivo análisis<sup>124</sup>. Lo anterior, debido a que es el que establece como tal si el estudio obtendrá aspectos informativos teóricos, si se obtienen datos contables o si es de las dos maneras.

En este caso, la investigación tiene un enfoque de tipo mixta, es decir, se utilizan los métodos cuantitativos y cualitativos simultáneamente. En este estudio, la metodología experimental se dividirá en dos partes. La primera corresponde a la sección química, en la que se realizará el extracto del aceite esencial de la especie *P. costaricense*, su identificación de metabolitos por pruebas cualitativas, CG-MS, IR y descripción de propiedades fisicoquímicas de cada uno. La segunda parte, la *in vitro*, en la que se evaluará la actividad antimicótica, tanto en el extracto de hojas como en el de frutos. Adicional a esta última parte, se establecerá una propuesta de producto final en el que se identificarán las cantidades adecuadas de cada excipiente para favorecer la calidad de la formulación.

Corresponde a un enfoque mixto, ya que en la primera parte se estará identificando el grupo de metabolitos mayoritarios presentes en el extracto de aceite esencial de las hojas y frutos por medio de pruebas cualitativas, caracterizar su composición química con el CG-MS y el IR, además de describir las propiedades fisicoquímicas del mismo. En la segunda parte se tendrá un enfoque cualitativo igualmente, debido a que se evaluará un aspecto teórico y visual, en el que, si el extracto disminuye la proliferación de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Candida krusei* entonces se tendrá un poder antimicótico. En la sección de propuesta del producto farmacéutico se identificarán las cantidades adecuadas para una posible formulación y se obtendrán mediciones del halo de inhibición, por lo que también tiene un enfoque cuantitativo.

### **3.2 Tipo de investigación**

La investigación es de tipo experimental EC sin asignación aleatoria, la cual consiste en que, por medio de diversas aplicaciones metódicas con el uso de técnicas experimentales o de campo, se evalúa un producto, sustancia, medicamento, técnica, entre otros<sup>124</sup>. Se considera EC sin asignación aleatoria debido a que no se aplica una técnica al azar, sino que con anterioridad se elige al sujeto que se le quiere aplicar, es importante que tiene un grupo de comparación.

Este estudio corresponde a un alcance de carácter exploratorio, el cual consiste en indagar sobre diversos problemas que son poco analizados y que no presentan muchas investigaciones, para que con este tipo de trabajos se abra espacio en el campo y así obtener nuevos conocimientos<sup>125</sup>. Adicional a esto, se prefiere, principalmente temas en los que se tienen dudas, que no se ha abordado anteriormente y proponer diferentes métodos para conocer al respecto.

Lo anterior, con relación a la presente investigación, consistirá en analizar una especie vegetal, en la que se extraerán sus metabolitos de los frutos y hojas, donde se identificarán estas sustancias y finalmente, evaluar si tienen actividad antimicótica. El grupo o fuente que se tendrá como punto de comparación será las revisiones bibliográficas contra lo obtenido en la sección experimental.

### **3.3 Fuentes de información**

El presente estudio se apoyó en diferentes artículos científicos y bases de datos bibliográficas como Google académico, Scielo, PubMed, Redalyc y Elsevier, basadas en ensayos sobre el *Pleondendron costaricense*, técnicas de extracción aceites esenciales de especies vegetales, métodos de identificación de metabolitos secundarios y pruebas de evaluación antimicótica.

### 3.4 Criterios de búsqueda de la información

**Tabla 1. Criterios de búsqueda utilizados, según objetivos**

<b>Objetivo</b>	<b>Descriptores</b>	<b>Motores de búsqueda</b>	<b>Periodo de estudio</b>	<b>Idioma</b>
1-Realizar la extracción del aceite esencial de las hojas y frutos del <i>Pleodendron costaricense</i> por el método de destilación por arrastre de vapor.	Aceite esencial	Google académico Scielo PubMed Redalyc Elsevier	2018-2023	Español/Inglés
	Técnicas de extracción	Google académico Scielo PubMed Redalyc Elsevier	2018-2023	Español/Inglés
	<i>Pleodendron costaricense</i>	Google académico Scielo PubMed Redalyc Elsevier	2018-2023	Español/Inglés
2-Identificar los metabolitos	Metabolitos secundarios	Google académico	2018-2023	Español/Inglés

secundarios presentes en el extracto del aceite esencial de las hojas y frutos del <i>Pleodendron costaricense</i> por medio de cromatografía de gases.		Scielo PubMed Redalyc Elsevier		
	Extractos	Google académico Scielo PubMed Redalyc Elsevier	2018-2023	Español/Inglés
	Técnicas de identificación de metabolitos	Google académico Scielo PubMed Redalyc Elsevier	2018-2023	Español/Inglés

<p>3-Comparar las propiedades fisicoquímicas de cada metabolito secundario presente en el extracto del aceite esencial de las hojas y frutos del <i>Pleodendron costaricense</i>.</p>	<p>Propiedades fisicoquímicas</p>	<p>Google académico Scielo PubMed Redalyc Elsevier</p>	<p>2018-2023</p>	<p>Español/Inglés</p>
<p>4-Evaluar las posibles aplicaciones terapéuticas del extracto de las hojas y de los frutos mediante pruebas antimicóticas.</p>	<p>Aplicaciones terapéuticas</p>	<p>Google académico Scielo PubMed Redalyc Elsevier</p>	<p>2018-2023</p>	<p>Español/Inglés</p>
	<p>Pruebas antimicóticas</p>	<p>Google académico Scielo PubMed Redalyc Elsevier</p>	<p>2018-2023</p>	<p>Español/Inglés</p>

Fuente: Elaboración propia, 2023.

### 3.5 Criterios de inclusión y exclusión

Tabla 2. Criterios de inclusión y exclusión para la selección de artículos

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Artículos sobre el aceite esencial del <i>Pleodendron costaricense</i> .	Artículos sobre el aceite esencial de otras especies de plantas.
Artículos sobre extracción por la técnica destilación de arrastre por vapor, hidrodestilación o mixta.	Artículos sobre extracción por otras técnicas ajenas a la de arrastre por vapor, hidrodestilación o mixta.
Artículos sobre el método de cromatografía de gases para identificación de metabolitos secundarios.	Artículos sobre otros métodos de identificación de metabolitos secundarios diferente a la cromatografía de gases.
Artículos sobre propiedades fisicoquímicas del extracto del aceite esencial del <i>Pleodendron costaricense</i> .	Artículos sobre características físicas de la planta, frutos u hojas.
Artículos sobre pruebas antimicóticas que se han realizado al extracto del <i>Pleodendron costaricense</i> .	Artículos sobre pruebas antibacterianas que se han realizado al extracto del <i>Pleodendron costaricense</i> .

Fuente: Elaboración propia, 2023.

### 3.6 Análisis de la información

En la búsqueda de información, al aplicar los criterios de exclusión y de inclusión, se obtuvieron 175 artículos, entre el año 2005 y el 2023, en los idiomas inglés y español. Se excluyeron aquellos que no cumplían con el objetivo del tema al ser artículos que abordaban otro tipo información como artículos que mencionaban actividad bacteriana de la especie, sobre la extracción por otras técnicas ajenas a la de arrastre por vapor, hidrodestilación o mixta, entre otros. Estos se utilizaron por ser artículos con mayor nivel de evidencia y con la mayor información disponible sobre el *P. costaricense*, lo cual no hay suficiente información referente a esta especie por ser descrita en el 2005. Los artículos fueron seleccionados de

acuerdo con su contenido y el objetivo de la investigación. En el anexo 1, se aprecia la tabla Sackett.

### 3.7 Variables de la investigación

**Tabla 3. Variables del Método Experimental**

<b>Variable</b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Definición instrumental</b>
Aceite esencial	Sustancias complejas que son originadas a partir del metabolismo secundario de las plantas y basándose, en el funcionamiento directamente para la planta, estas se encargan de generar una mayor protección, supervivencia y resistencia ante el ambiente <sup>38</sup> .	Se obtuvo por medio del método de hidrodestilación.	Se requirió del equipo para la hidrodestilación.
Metabolitos secundarios	Además, es de suma importancia el papel que desempeñan estas sustancias como medio de defensa para la	Se identificaron los metabolitos secundarios mediante espectroscopía infrarroja,	Se utilizó un espectrofotómetro infrarrojo, tubos de ensayo, cromatógrafo de gases acoplado a

	<p>planta, esto porque les ayuda a adaptarse de diversas variantes del medio en el que se encuentren; y también, no solo es aporte a la planta, sino que, en los humanos, es relevante en la nutrición y por sus propiedades medicinales<sup>36</sup>.</p>	<p>cromatografía de gases acoplado a detector de masas y pruebas cualitativas con técnicas colorimétricas para identificación de los grupos funcionales.</p>	<p>detector de masas, biblioteca que permita identificar los posibles metabolitos por medio del cromatógrafo de gases y reactivos necesarios para pruebas de identificación cualitativas.</p>
<p>Propiedades fisicoquímicas</p>	<p>Las propiedades fisicoquímicas son un conjunto de cualidades o características que se le otorgan a los materiales o sustancias que corresponden a aspectos como el color, olor, sabor, forma, dureza, densidad, viscosidad, masa, entre otros<sup>66</sup>.</p>	<p>Se analizó la densidad, peso, volumen y pH del extracto de aceite esencial de las hojas y de los frutos por separado.</p>	<p>Se necesitó de probeta, balanzas granatarias y tiras de pH.</p>

<p>Actividad antimicótica</p>	<p>El mecanismo de acción general de los medicamentos y sustancias con actividad antimicóticas es el realizar daño en la membrana celular y para que, de esta manera, se inhiba la 14<math>\alpha</math>-desmetilasa<sup>115</sup>.</p>	<p>Se midieron los halos de inhibición en un medio de cultivo de agar específico y se comparará la actividad antimicótica del aceite esencial de los frutos y de las hojas.</p>	<p>Se necesitó de una cámara de flujo laminar con luz UV tipo II, un nefelómetro, incubadora, Papel filtro, cepas: ATCC 90028, ATCC 22019 y ATCC 6258, medio cromogénico CAN2, placas de agar SDA, agar RPMI MOPS, hisopos estériles, asas bacteriológicas estériles, pinzas estériles y regla.</p>
-------------------------------	---	---	---

Fuente: Elaboración propia, 2023.

### 3.8 Descripción del procedimiento de recolección y análisis de datos

En esta sección se detallará lo necesario para la ejecución de este experimento, el cual utilizó el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas, Laboratorio de Química de la Universidad Iberoamericana, Laboratorio Clínico y Banco de Sangre de la UCR y, además, se contó con los servicios del Centro de Investigaciones en Productos Naturales de la UCR.

3.8.1 Laboratorio de Química de la Universidad Iberoamericana, Centro de Investigaciones en Productos Naturales de la UCR y Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas

Para la extracción del aceite esencial, se utilizó el sistema de hidrodestilación. A partir de este, se procedió a hacer el análisis del mismo mediante el espectrofotómetro IR, cromatografía de gases acoplado a detector de masas y las pruebas cualitativas.

3.8.2 Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas

En el caso de las pruebas fisicoquímicas, el aceite esencial previamente obtenido, se sometió a pesaje, medición de su volumen, se determinó la densidad y finalmente se midió el pH.

3.8.3 Laboratorio Clínico y Banco de Sangre de la UCR; y Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas

Para las evaluaciones antimicóticas, mediante el uso de diferentes cepas, se analizó el comportamiento del aceite esencial tanto de hojas como de frutos, se midió el halo de inhibición para determinar cuál de los dos tenía mayor efecto.

Como aspecto adicional, se desarrolló una formulación farmacéutica a partir del extracto de aceite esencial con mayor actividad antimicótica, el cual consiste en una propuesta, sin embargo, a la misma no se le realizó el proceso de evaluar su efecto ante las pruebas antimicóticas.

### **3.9 Descripción de instrumentos y técnicas**

En este apartado se describen las técnicas y los instrumentos necesarios para el desarrollo de la investigación, la cual se separa en varias fases.

3.9.1 Fase I. Adquisición y conservación de la materia vegetal

El material, tanto hojas como frutos, fue donado por la organización Osa Conservation ubicada en la Península de Osa de Costa Rica. Este fue enviado mediante el servicio de mensajería de Correos de Costa Rica, empacados en bolsas plásticas y estas envueltas en bolsas negras.

El material tardó en llegar a San José, aproximadamente de 3 a 4 días. Una vez recibido el mismo, de las bolsas plásticas en las que se tenían, se pasaron a bolsas plásticas nuevas, el material húmedo se secó con servilletas asegurando que no hubiera presencia de hongos y se colocaron en refrigeración.

**Figura 1. Árbol *Pleodendron costaricense* en el que Osa Conservation obtuvo el material donado**



Fuente: Fotografía proporcionada por Osa Conservation vía email, 2023.

**Figura 2. Frutos del *Pleodendron costaricense***



Fuente: Fotografía proporcionada por Osa Conservation vía email, 2023.

**Figura 3. Empaque del servicio de mensajería de Correos de Costa Rica**



Fuente: Elaboración propia, 2023.

**Figura 4. Empaque en nuevas bolsas plásticas**



Fuente: Elaboración propia, 2023.

**Figura 5. Almacenamiento en refrigeración del material orgánico**



Fuente: Elaboración propia, 2023.

### 3.9.2 Fase II. Extracción del aceite esencial

La obtención del aceite esencial se realizó mediante el proceso de hidrodestilación, el cual requiere de cierta cristalería y de reactivos los cuales se pueden apreciar en la tabla 5.

Este método de extracción consiste en pesar el material orgánico en una balanza granataria, para ambas partes de la planta; lo utilizado fue de un valor aproximado de 1 Kg en el caso de las hojas y 580 g para los frutos, esto para obtener un volumen apropiado para realizar todas las pruebas requeridas. Se debe colocar en la superficie de la mesa de trabajo, un soporte universal y una plantilla que favorezca la propagación del calor, lo que posteriormente hace que se alcance el punto de ebullición y permita la extracción.

Adicional a eso, junto con una pinza de laboratorio se colocó sobre la plantilla un matraz de fondo plano de 1000mL donde se añadieron 700mL de agua destilada y el material orgánico correspondiente. Sobre esto, se agregó el clevenger, unido a su vez a un condensador, que tiene dos mangueras, una de salida de agua y otra de entrada.

Para los frutos se graduó la temperatura inicialmente a 200 °C y a 190 revoluciones por minuto, posterior a los 20 minutos se cambió a 400°C y a 850 revoluciones por minuto, pasado los 10 minutos comenzó a destilar. Esto se tuvo por un periodo de 4 horas y media. Cada cierto tiempo se debía ir recolectando el agua. Y cuando se detuvo por completo, se procedió a extraer el aceite esencial en un envase recolector diferente al del agua. Para las hojas, la hidrodestilación fue a presión atmosférica, se utilizaron 1000 mL de agua destilada, el tiempo de destilación fue de 3 horas y media, con un inicio de destilación a los 15 minutos.

Este procedimiento se realizó en tres días diferentes. En el caso de las hojas, el cual fue el primer material vegetal que se recibió, se intentó hacer por medio del método de arrastre por vapor en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas, sin embargo, al hacerlo por este método se recolectó el agua en conjunto con el aceite por lo que se debía proceder a separar la fase acuosa de la orgánica por medio de decantación con el reactivo acetato de etilo, posteriormente con el rotavapor evaporar el hexano y secar por completo con MgSO<sub>4</sub> anhidro. También, para la prueba anterior, se intentó evaporar el agua sin necesidad de colocar el hexano ni de utilizar el rotavapor.

El segundo día que se realizó fue por los servicios del Centro de Investigaciones en Productos Naturales de la UCR, el cual utilizaron la hidrodestilación. Y para el tercer día, en el Laboratorio de Química de la Universidad Iberoamericana se realizó por el mismo método.

**Figura 6. Hojas utilizadas para el proceso de arrastre con vapor y su disminución de tamaño de partícula**



Fuente: Elaboración propia, 2023.

**Figura 7. Proceso de arrastre con vapor de las hojas elaborado en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas**



Fuente: Elaboración propia, 2023.

**Figura 8. Temperatura en el que el material empieza a destilar**



Fuente: Elaboración propia, 2023.

**Figura 9. Separación de fases con la incorporación del hexano**



Fuente: Elaboración propia, 2023.

**Figura 10. Uso del Rotavapor**



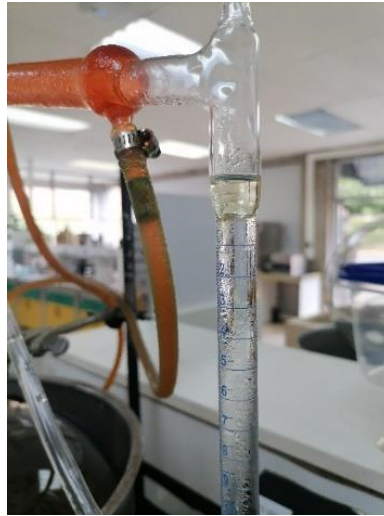
Fuente: Elaboración propia, 2023.

**Figura 11. Proceso de hidrodestilación de las hojas elaborado por los servicios del Centro de Investigaciones en Productos Naturales**



Fuente: Elaboración propia, 2023.

**Figura 12. Recolección del aceite esencial producto de la hidrodestilación de las hojas elaborado por los servicios del Centro de Investigaciones en Productos Naturales**



Fuente: Elaboración propia, 2023.

**Figura 13. Frutos utilizados para el proceso de arrastre con vapor y su disminución de tamaño de partícula**



Fuente: Elaboración propia, 2023.

**Figura 14. Proceso de hidrodestilación de los frutos elaborado en el Laboratorio de Química de la Universidad Iberoamericana**



Fuente: Elaboración propia, 2023.

**Figura 15. Recolección del aceite esencial producto de la hidrodestilación de los frutos elaborado en el Laboratorio de Química de la Universidad Iberoamericana**



Fuente: Elaboración propia, 2023.

### 3.9.3 Fase III. Pruebas cualitativas de identificación

Se realizaron tres pruebas, la de triterpenos con el reactivo de Libermann Burchard, el cual se disolvió una pequeña cantidad de muestra (1,5mg) en cloroformo. La prueba es positiva con la formación de colores azul o verde para esteroides y rojo, violeta o morado para triterpenos.

La segunda prueba fue la de sesquiterpenos, en la cual se usó el reactivo vainillina-ácido sulfúrico: se deben de realizar dos disoluciones, el número I es de ácido sulfúrico al 5% en etanol y la disolución II, es de vainillina al 1 % en etanol. Se asperjaron los cromatofolios con la solución I luego con la II se calienta a 110 °C por 5- 10 min.

Y la tercera prueba fue para la detección de fenoles y taninos, se utiliza el cloruro férrico al 12.5% ( $\text{FeCl}_3$ ), en el que se agregaron dos a tres gotas de solución de  $\text{FeCl}_3$  a las soluciones de los extractos. La transición colorimétrica de verde oscuro a azul índigo indicó la presencia de fenoles, mientras que el color azul completo indica que los taninos de la muestra son hidrolizables. La presencia de taninos condensados en la muestra se confirma por un color verde oscuro.

### 3.9.4 Fase IV. Pruebas fisicoquímicas

Para esta sección se realizó la medición de la masa, volumen, densidad y pH de cada uno de los extractos. Para el caso de la masa, sobre una balanza granataria se colocó una probeta de 5mL, se taró, se vertió el aceite sobre el mismo y se anotó la masa en gramos brindada por el equipo.

En el caso del volumen, en la misma probeta en la que se pesó, se anotó el dato que se apreciaba en el recipiente. Y para la densidad, el dato registrado de masa, se dividió entre el del volumen.

Finalmente, para el pH, se utilizaron las tiras de pH para poder determinar mediante la referencia de colores su valor. De estas tiras, se introdujo una en cada recipiente que contenía el aceite y posterior a ello, se comparó el resultado con la referencia.

### 3.9.5 Fase V. Espectro IR

El espectrofotómetro IR lo que permite es identificar ciertos grupos funcionales, por lo que se realizó como método inicial para después comparar los resultados de este análisis con lo obtenido con el cromatógrafo de gases acoplado a detector de masas que es más específico si se comparan ambas técnicas.

Para este análisis, se empleó el equipo disponible en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas, el cual es un espectrómetro infrarrojo marca Agilent Technologies, modelo: Cary 630 FTIR.

Para su uso, se puso a funcionar el equipo, se dejó calentar la lámpara y se activó el software llamado “Microlab PC” en la computadora acoplada al equipo. Se introdujo la contraseña y el mismo software brindó cada uno de los pasos que se debían realizar,

Se limpió el porta muestras con acetona pura y con “Kleenex” para no rayar el lente. El equipo verifica que el portamuestras se encuentra limpio y seguido a esto, indica que se debe colocar la sustancia a muestrear, lo cual con solo una gota o 50 uL es suficiente. La máquina realizó el escaneo y en la pantalla se presentó el espectro.

Se analizó el espectro, se comparó con los metabolitos secundarios que las referencias bibliográficas indican que son las mayoritarias en la especie y por último, también se comparó con lo obtenido en el cromatógrafo de gases acoplado a detector de masas.

**Figura 16. Espectrofotómetro Infrarrojo IR disponible en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas**



Fuente: Elaboración propia, 2023.

### 3.9.6 Fase VI. Cromatografía de gases acoplado a detector de masas

Inicialmente no se contaba con el equipo correspondiente al cromatógrafo de gases acoplado a detector de masas, sin embargo, durante el proceso del experimento se consiguió uno disponible, lo cual fue de gran beneficio ya que se pudo comparar lo obtenido mediante las pruebas colorimétricas de forma general con el espectro IR y con el espectro del CG.

Para esto, lo que se necesitó fueron 500 microlitros de cada uno de los aceites esenciales, tanto de hojas como de frutos, y programar el equipo en ciertas condiciones. Después de esto, el técnico encargado realizó, con la ayuda de una biblioteca presente en ese sistema, una comparación de las moléculas contenidas en el extracto de aceite y de esta manera, se pudo obtener porcentajes en los que se reflejan los más similares entre sí.

**Figura 17. Cromatógrafo de gases acoplado a detector de masas disponible en el Laboratorio de Química de la Universidad Iberoamericana**



Fuente: Elaboración propia, 2023.

### 3.9.7 Fase VII. Evaluaciones antimicóticas

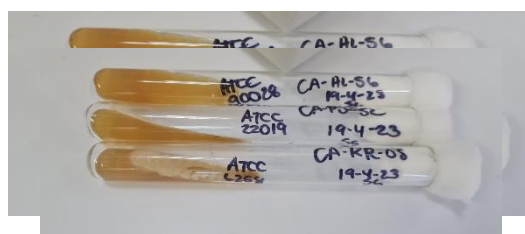
Estas evaluaciones antimicóticas se realizaron en el Laboratorio Clínico y Banco de Sangre de la UCR. Fueron brindadas tres cepas distintas, las cuales son ATCC 90028, ATCC 22019 y ATCC 6258, que respectivamente corresponden a *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*.

El procedimiento del mismo, en los meses de junio y agosto, consistió en replicar las cepas ATCC para tener un cultivo joven, debido a que para las pruebas de sensibilidad se hacen de esta manera y las ATCC se tenían desde abril en el laboratorio. Fueron replicadas en dos medios diferentes, un agar normal y uno cromogénico, para diferenciar por color las cepas que crecen. Se ponen ambos medios en una incubadora a una temperatura aproximada a 33,7°C-34,0°C.

A las 24 horas se revisaron los medios. En el agar normal había crecido lo suficiente para poder montar la prueba de sensibilidad, mientras que en el cromogénico aún no.

Se preparó una suspensión al 0,5 McFarland para asegurar la turbidez y concentración adecuada mediante el nefelómetro. Para poder agregar los discos al aceite y al rayado previamente se tuvo que esterilizar por medio de luz UV durante 10 minutos. Seguido de esto se hizo un rayado específico para la prueba de sensibilidad, se esperó 10-15 minutos para que la placa se adhiriera al rayado, una vez pasado este tiempo se colocaron los discos impregnados del aceite con pinzas estériles. Se colocaron 4 discos separados entre sí por 2 cm, según menciona la técnica del laboratorio, en el caso de las hojas y 2 discos para el de los frutos. Se realizó un control para cada cepa y así se visualizó si verdaderamente el efecto fue creado por el extracto de los aceites esenciales. Se colocaron en una incubadora y se hicieron revisiones a las 24 y 48 horas.

**Figura 18. Cepas ATCC 90028, ATCC 22019 y ATCC 6258 brindadas por el Laboratorio Clínico y Banco de Sangre de la UCR**



Fuente: Elaboración propia, 2023.

**Figura 19. Cámara de flujo laminar con luz UV tipo II para esterilizar círculos que serán impregnados por el aceite, equipo del Laboratorio Clínico y Banco de Sangre de la UCR**



Fuente: Elaboración propia, 2023.

**Figura 20. Nefelómetro disponible en el Laboratorio Clínico y Banco de Sangre de la UCR**



Fuente: Elaboración propia, 2023.

**Figura 21. Incubadora utilizada a una temperatura aproximada de 33,7°C-34,0°C disponible en el Laboratorio Clínico y Banco de Sangre de la UCR**



Fuente: Elaboración propia, 2023.

### 3.9.8 Fase VIII. Elaboración de formulación farmacéutica

Para la elaboración de la crema como opción de una formulación farmacéutica que incluya al aceite esencial con mayor actividad antimicótica entre el extracto de las hojas y de los frutos del *Pleodendron costaricense*, inicialmente se pesaron los materiales: 31,5g de vaselina sólida, 18g de lanolina, 4,5g de alcohol cetílico, 15g de emulgade, 19g de aceite mineral, 0,3g de aceite esencial, 90,5g de agua, 1,2g de borato de sodio y 3 gotas de esencia.

Previo al pesaje y a cualquier procedimiento, se limpiaron todos los recipientes y cristalería, se secaron y se le colocó una etiqueta en la que se identificara fácilmente lo que contenían. Se realizaron dos fases, la fase oleosa y la acuosa. En un beaker de 250mL en baño maría sobre una plantilla se colocó vaselina sólida (punto de fusión: 37-54°C), lanolina (punto de fusión: 38-41°C), aceite mineral (punto de fusión: 40°C), emulgade (punto de fusión: 50-60°C) alcohol cetílico (49-56°C). Para la fase acuosa, igualmente en un beaker de 250mL se agregó el agua y borato de sodio. En este proceso se esperó que cada uno de los componentes se disolvieran y después se agregaba el siguiente, no fueron todos al mismo tiempo.

En todo momento se tuvo un control de la temperatura con el termómetro en ambas fases y se tuvo constante agitación con el mezclador que permite una mejor homogenización. Para el proceso de emulsión cuando ambas fases estaban en la misma temperatura, se vertió lentamente la fase oleosa sobre la acuosa. Se agregó el aceite esencial y posterior a ello, se esperó hasta que la formulación enfriara a temperatura ambiente, se envasó el producto y se etiquetó.

**Figura 22. Mezclador disponible en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas**



Fuente: Elaboración propia, 2023.

### **3.10 Materiales, equipos y condiciones**

Los materiales utilizados en esta investigación son los necesarios para realizar la extracción del aceite esencial, tanto de hojas como de frutos; para la sección de pruebas cualitativas y las evaluaciones antimicóticas.

**Tabla 4. Materiales, equipos y condiciones utilizadas en la sección experimental**

<b>Sección experimental</b>	<b>Materiales</b>	<b>Equipos</b>	<b>Condiciones</b>
Extracción del aceite esencial	1 gramo de material orgánico  Vaso de precipitado/Beaker 1000mL  Matraz de fondo plano 1 000mL  Clevenger  Condensador  Erlenmeyer 250mL  Beaker 500mL  Embudo  Guantes  Recipiente de almacenaje  Pipeta Pasteur  Algodón  Aluminio  Soporte universal	Balanza  Calentadores	Temperatura >93°C  Recipiente ámbar de almacenaje o envuelto en aluminio  Tiempo de extracción superior a 3 horas

	Pinza de laboratorio  Plantilla  Pastilla de agitación		
Pruebas fisicoquímicas	0,5mL de aceite esencial  Tiras de pH  Probeta de 5mL	Balanza granataria	Visualizar el pH con una referencia de identificación por medio de colores
Pruebas cualitativas	1mL de aceite esencial  Probeta de 10mL  Probeta de 5mL  Gotero  Tubos de ensayo  Gradilla	Mechero Bunsen	Prueba de sesquiterpenos- Reactivo Vainillina- Ácido Sulfúrico calentar 110°C por 5-10 minutos
Espectro IR	1 gota de aceite esencial	Espectrofotómetro infrarrojo	Limpiar el equipo antes de utilizar  Agregar el volumen necesario hasta que el equipo lea la muestra correctamente

<p>Cromatógrafo de gases acoplado a detector de masas</p>	<p>Inyector</p> <p>Columna</p> <p>Horno</p> <p>Detector de masas</p>	<p>Cromatógrafo de gases acoplado a detector de masas</p>	<p>Inyector: Modo: Split, temperatura: 270 °C, flujo: 13.9 mL/min</p> <p>Columna: Flujo: 1.0 mL/min. Tipo: Agilent HP-5MS 5% fenil metil siloxano, 30 m x 250 um x 0.25 um nominal.</p> <p>Temperatura máxima: 325 °C</p> <p>Horno: Temperatura: 50 °C. Luego en rampa.</p> <p>Detector: Temperatura fuente: 230 °C.</p> <p>Temperatura cuadrupolo: 150 °C.</p> <p>Modo: SCAN relativo positivo.</p> <p>Lectura masas: Menor: 50 amu / Mayor: 500 amu</p>
---	--	---	---

Evaluaciones antimicóticas	<p>Papel filtro</p> <p>Cepas: ATCC 90028, ATCC 22019 y ATCC 6258</p> <p>Medio cromogénico CAN2</p> <p>Placas de agar SDA</p> <p>Agar RPMI MOPS</p> <p>Hisopos estériles</p> <p>Asas bacteriológicas estériles</p> <p>Pinzas estériles</p> <p>Regla</p>	<p>Cámara de flujo laminar con luz UV tipo II</p> <p>Nefelómetro</p> <p>Incubadora</p>	<p>Temperatura de incubación aproximada a 33,7°C-34,0°C</p> <p>Se realizan lecturas a las 24 horas y 48 horas</p>
----------------------------	--	--	---

Fuente: Elaboración propia, 2023.

### 3.11 Componentes reactivos

**Tabla 5. Reactivos utilizados en la sección experimental**

Sección experimental	Reactivos
Extracción del aceite esencial	<p>Agua destilada</p> <p>MgSO4 anhidro</p>

Pruebas fisicoquímicas	N/A
Pruebas cualitativas	Cloroformo  Reactivo de Libermann Burchard  Reactivo Vainillina-Ácido sulfúrico  Ácido sulfúrico 5% en etanol  Cloruro férrico 12,5%
Espectro IR	Acetona
Cromatógrafo de gases acoplado a detector de masas	N/A
Evaluaciones antimicóticas	Solución salina estéril

Fuente: Elaboración propia, 2023.

## **CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS**

En este apartado del documento, se pretende presentar la información recopilada durante el desarrollo de la investigación, con el propósito de dar respuesta a los objetivos planteados.

Los objetivos para abarcar en esta investigación fueron:

Objetivo 1: Realizar la extracción del aceite esencial de las hojas y frutos del *Pleodendron costaricense* por el método de hidrodestilación.

Para el cumplimiento de este objetivo se llevó a cabo de manera experimental, en el Laboratorio de Química de la Universidad Iberoamericana y mediante los servicios brindados por el CIPRONA, una hidrodestilación para poder extraer el aceite esencial de las hojas y de los frutos de la especie *Pleodendron costaricense*.

Objetivo 2: Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto del aceite esencial de las hojas y frutos del *Pleodendron costaricense* por medio de pruebas cualitativas.

Con el fin de cubrir dicho objetivo, posterior a obtener el extracto del aceite esencial de los frutos y las hojas de manera individual, se realizaron de forma experimental pruebas cualitativas para identificar visualmente los componentes generales que se encontraban en cada una de la muestra en estudio. Por otra parte, se utilizó una gota de aceite, por cada sección de la planta, para poder conseguir el espectro IR que permitió identificar grupos funcionales de los componentes presentes y a la vez, fue fuente de comparación con lo obtenido en el cromatógrafo de gases acoplado a detector de masas y acercarse un poco más a la precisión de los posibles metabolitos secundarios presentes en los extractos.

Objetivo 3: Comparar las propiedades fisicoquímicas del aceite esencial de las hojas y frutos del *Pleodendron costaricense*.

Para abarcar este objetivo, en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas, se realizaron las pruebas experimentales de pH de cada extracto de aceite esencial, volumen, masa y densidad; de esta manera, poder observar sus

posibles diferencias en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas, las cuales son de suma relevancia en el desarrollo de una preformulación que conduce a su vez, a una formulación farmacéutica.

Objetivo 4: Evaluar las posibles aplicaciones terapéuticas del extracto de las hojas y de los frutos mediante pruebas antimicóticas.

El último objetivo se llevó a cabo con el apoyo brindado por el Laboratorio Clínico y Banco de Sangre de la UCR, en el que se permitió el ingreso para poder realizar de manera experimental el ensayo *in vitro* de someter los aceites esenciales puros, tanto de las hojas como de frutos, a pruebas antimicóticas en medios específicos de sensibilidad, medir su halo de inhibición, comparar la actividad desarrollada entre los dos y de esta manera determinar cuál sección de la planta se recomienda para realizar futuras extracciones y desarrollar un producto farmacéutico con base de la misma sustancia activa. Adicional, se realizó una propuesta a un posible producto con dicha actividad terapéutica, sin embargo, para mostrar su efectividad se deben hacer distintas pruebas a diferentes concentraciones, lo cual queda como opción realizar en futuras investigaciones.

#### **4.1 Primer objetivo específico: Realizar la extracción del aceite esencial de las hojas y frutos del *Pleodendron costaricense* por el método de hidrodestilación.**

El análisis de este objetivo permite describir de forma detallada la adquisición del material orgánico que se utilizó, su transporte y almacenamiento previo a realizar el proceso de extracción. Además, se mencionarán sobre los métodos recomendados para extraer aceites esenciales, se identificarán las ventajas, desventajas y usos de cada uno de ellos. Se expondrán los métodos de extracción utilizados en esta investigación, el rendimiento tanto para hojas como frutos, las razones del porqué se escogió la hidrodestilación, posibles errores, limitaciones y desafíos durante el proceso.

De acuerdo con el material vegetal utilizado, correspondió a hojas y frutos de la especie *Pleodendron costaricense* brindados por Osa Conservation, la cual es un área que cubre parcialmente el Pacífico Sur de Costa Rica y forma parte del Sistema Nacional de Áreas de Conservación. Esta zona geográfica se caracteriza por su gran riqueza ecológica, inclusive es considerada una de las más representativas del país y a partir de esto, existen muchos investigadores con interés en ella, por lo que aumenta su valor en investigación científica. Principalmente, se encuentra protegiendo recursos de la selva tropical húmeda, muy húmeda y lluviosa<sup>126</sup>.

Al ser Osa Conservation parte del área que cubre el bosque lluvioso en el Sur del Pacífico del país, hace que en esta zona geográfica la especie *Pleodendron costaricense* se desarrolle, inclusive en esta región fue descubierto este árbol, el cual es la única especie de la familia Canellaceae de América Central<sup>106</sup>. Respecto a la historia de su descubrimiento, fue en agosto del 1998 cuando uno de los árboles de la zona presentó frutos con muchas semillas pequeñas de color negro; seguidamente, se tomó para poder examinar, diseccionar y analizar el olor de los especímenes, algunos de los botánicos encargados, que pertenecían al Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio), apreciaron una similitud del olor de las frutas y semillas con especies de la familia Myristicaceae<sup>1</sup>.

Previo a la presente investigación, en el 2022 se había trabajado con Osa Conservation para un proyecto externo denominado “Preformulación teórica de un producto natural antifúngico a partir de extractos obtenidos de las hojas del árbol *Pleodendron costaricense*”.

La misma, se trabajó en la sección experimental con la Universidad Nacional de Costa Rica, en ese caso, se pidió el material vegetal, en el que las hojas fueron enviadas desde la Península de Osa por medio del sistema de mensajería de Correos de Costa Rica<sup>9</sup>. Al realizar la extracción, sí se observó que en el proceso se estaba recolectando el aceite esencial, por lo que el medio de transporte y su conservación no tuvo afectación significativa sobre ella; por tanto, para este proyecto nuevo, se realizó de la misma manera.

Para esta investigación, en el caso de las hojas, fueron enviadas desde la Península de Osa el 03 de abril y llegaron a San José el 06 de abril del 2023. Y para el caso de los frutos, el trayecto fue del 04 de agosto al 08 de agosto del 2023, esta primera recolección fue el 07 de julio. Adicional a estas fechas, el 09 de agosto del 2023 se hizo entrega personal con una persona miembro de Osa Conservation de otra muestra de frutos que fueron recolectados 08 de agosto del 2023. Lo anterior debido a que la temporada de los mismos es a finales de julio y agosto<sup>1</sup>. El sistema de envíos fue el mismo y fueron empacados en bolsas plásticas las cuales a la vez, estaban envueltas en bolsas negras (ver figura 3).

Una vez llegado a San José el material orgánico, para ambos casos, se cambiaron las bolsas plásticas que lo contenía, se revisó individualmente cada hoja y fruto para verificar que ninguno tuviera algún tipo de hongo debido a la humedad y al tiempo transcurrido de viaje, se pasaron a nuevas bolsas plásticas y finalmente se colocaron en refrigeración hasta ser utilizados para su procesamiento (ver figura 4 y 5).

La forma adecuada de realizar el proceso de adquisición y transporte, debe hacerse inicialmente con una recolección del material vegetal que no esté dañado, para que de esta manera no se contamine el resto; seguidamente, se debe almacenar para su transporte en recipientes limpios y secos, por lo general, lo más recomendado es utilizar recipientes de vidrio, acero inoxidable o plástico de alta calidad que no permita contaminación externa, no se deben utilizar recipientes de metal debido a que los aceites esenciales o componentes presentes en las partes de las plantas puede que reaccionen entre sí causando en la extracción posterior pérdidas o metabolitos dañados<sup>127</sup>.

En algunas ocasiones se recomienda secar el material antes de almacenar. Se debe almacenar una vez llegado al lugar de tal manera que se controle la humedad y la temperatura, puede ser un lugar fresco y se recomienda que sean principalmente oscuros por si hay

componentes fotosensibles. Además, menciona que se debe procesar el material lo más antes posible para evitar la pérdida de calidad, sin embargo, si debe hacerse de forma prolongada, entonces se puede congelar el material<sup>127</sup>.

En el caso de las hojas, fueron entregadas a San José el 06 de abril del 2023, mismo día que se empacaron y almacenaron en refrigeración a 3°C. Sin embargo, debido a limitaciones en cuanto a equipo, se tuvo que procesar el material hasta el 08 de junio del 2023. A lo largo de todo ese periodo se mantuvo en refrigeración, lo cual evitó que se generaran hongos o bacterias en las mismas, que no se perdiera toda la calidad del material y su conservación en general, ya que cuando se procesó mantenían su color verde brillante, sin aspectos visuales que indicaran oxidaciones ni daños.

De acuerdo a lo anterior, se considera que, a pesar de que el medio de transporte de mensajería de Correos de Costa Rica no es el más adecuado, ya que no se tiene un control específico en cuanto a la temperatura y humedad, sí se enviaron en el material correcto el cual corresponde a plástico, las bolsas estaban protegidas además de otra secundaria que era negra, de tal manera protegía de la luz e inmediatamente llegaron a su destino, se revisaron y fueron colocadas en un nuevo empaque y en enfriamiento.

Se determinó realizar el proceso de hidrodestilación debido a diversos factores y pruebas realizadas con anticipación, que serán explicadas a continuación. Los métodos más recomendados para poder realizar los procesos de extracción de aceites esenciales, corresponden al arrastre por vapor, hidrodestilación y la mixta entre ellos dos<sup>128</sup>.

**Tabla 6. Comparación de los métodos recomendados para extracciones de aceites esenciales**

<b>Métodos recomendados</b>	<b>Uso</b>	<b>Funcionamiento</b>
Hidrodestilación	<p>Extracción de aceites esenciales.</p> <p>Adecuada para materiales vegetales que son sensibles al calor y al agua.</p> <p>Material vegetal fresco o con alto contenido de agua.</p>	<p>El material vegetal está en contacto directo con el agua.</p> <p>El vapor de agua arrastra los compuestos que son mayormente volátiles, pasa por un condensador, se recoge la fase líquida (aceite y agua), caen en un recipiente recolector donde por densidades se separa el agua del aceite.</p> <p>Para su separación por lo general se usa un Clevenger que permite su aislamiento por densidades. Al igual que en el caso de la trampa Dean-Stark y si es sin llave, se puede hacer con pipeta Pasteur.</p>
Arrastre por vapor	<p>Extracción de aceites esenciales.</p> <p>Principalmente material vegetal seco.</p> <p>Eficiente para preservar compuestos</p>	<p>El material vegetal no está en contacto directo con el agua.</p> <p>El material vegetal se coloca en un embudo de tres bocas o en una cámara de destilación, el vapor de agua es generado</p>

	<p>volátiles sensibles al calor.</p>	<p>externamente e inyectado donde se encuentra el material. Los compuestos volátiles se vaporizan y por medio del vapor de agua se arrastran los aceites esenciales. Pasan por un condensador dando como resultado la fase líquida que se recolecta en un envase aparte.</p> <p>Por lo general se requiere de separación por medio de decantación y rotavapor.</p>
<p>Mixta</p>	<p>Extracción de aceites esenciales.</p> <p>Para material vegetal difícil de destilar solo por hidrodestilación o arrastre por vapor.</p> <p>Eficiente para material vegetal con contenido de agua intermedio.</p>	<p>Consiste en una combinación del método de hidrodestilación y la de arrastre por vapor. Se utiliza un lecho húmedo, en esta zona es donde se coloca el material vegetal. Este se debe calentar, haciendo a su vez, que dentro se genere el vapor de agua, donde los componentes volátiles se arrastran con el vapor de agua y luego se recolectan y se separan de manera similar al de arrastre por vapor.</p>

Fuente: Elaboración propia con base en la referencia<sup>128</sup>.

De acuerdo con la tabla 6, para una escogencia entre los tres métodos recomendados para la extracción de aceites esenciales depende del tipo de material vegetal que se tenga, su contenido de agua, la composición química, la disponibilidad de los materiales y cristalería o las propiedades de la extracción deseada. Entre las diferencias más marcadas, sobresale que el arrastre por vapor es la técnica más utilizada; en comparación con el método de hidrodestilación, el vapor de agua necesario es generado externamente e ingresa en el matraz donde se encuentra el material vegetal, a través de un tubo que llega hasta el fondo del mismo. De este modo, el vapor se distribuye uniformemente a través de toda la materia prima, arrastrando los aceites esenciales que posteriormente son condensados y separados<sup>128</sup>.

El método de Soxhlet es uno de los más utilizados para hacer extracciones, principalmente de compuestos orgánicos que no tienden a hacer volátiles y las muestras principalmente son sólidas. Se utiliza para extracción de lípidos, análisis de pesticidas, extracción de aceites esenciales no volátiles de materiales vegetales o también para una separación de componentes específicos. No se recomienda para aceites esenciales volátiles porque es una técnica de laboratorio que utiliza temperaturas elevadas que pueden llegar a degradar a los metabolitos secundarios que son sensibles al calor, además, se suelen utilizar solventes para la extracción, que en comparación a la hidrodestilación y arrastre por vapor que por lo general es agua o solventes, se consideran seguros y más limpios en cuanto a calidad del producto final y de la salud<sup>129,130</sup>.

Adicional a lo anterior, aparte de que en esta investigación se quería utilizar procedimientos más recomendados, se eligió el método de arrastre en corriente de vapor, porque, a diferencia del método que emplea el equipo soxhlet, no se extrae una importante cantidad de compuestos no deseados tales como grasas o ceras. Esto lo que permite es que se hagan extracciones que tienen menos impurezas o contaminación en general<sup>129</sup>.

Se inició con el método de arrastre por vapor y no con la hidrodestilación, debido a la disponibilidad de equipo en el laboratorio. Sin embargo, el artículo base de esta investigación que corresponde al de Treyvaud et al.<sup>5</sup>, utilizaron el método de hidrodestilación para hacer sus experimentaciones. Ellos, en cuanto a su metodología, sumergieron 100 gramos de hojas y corteza del *P. costaricense* en 500 mL de agua destilada, hicieron el proceso por 30 minutos. Realizaron extracciones en las que dos veces tomaron la fase acuosa

con 1 mL de hexano y el agua residual se eliminó de la fase de hexano con 0,5 mg de  $\text{MgSO}_4$  anhidro. El destilado se filtró antes del análisis por cromatografía de gases.

Para los días 03, 04 y 05 de mayo del 2023, se realizaron extracciones por medio de arrastre por vapor en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas, para el mismo se utilizaron las hojas como material orgánico, fueron cortadas sin ninguna especificación para que de esta manera se disminuyera su tamaño y así, poder aumentar la superficie de contacto, favoreciendo que el vapor de agua tenga más interacción con el material y facilitando la transferencia de los compuestos volátiles de las células vegetales al vapor, acelerando a su vez, el proceso de extracción, aumentando la eficiencia por uso de menos energía requerida y mejorando la calidad del producto final en cuanto a una concentración mayor de componentes volátiles y de aromas o sabores más intensos (ver figura 6)<sup>131</sup>.

Para realizar el proceso de arrastre por vapor, se debe colocar el material vegetal en un balón de tres bocas y la cantidad de agua que está en contacto con el mismo es mínima, ya que el agua se coloca en un balón de fondo plano externo (ver figura 7). Las condiciones utilizadas fueron de una temperatura de  $450^\circ\text{C}$  reportada en la plantilla y el termómetro colocado en el sistema marcaba un punto de ebullición de  $93^\circ\text{C}$ . Una vez realizadas las extracciones, mediante este método, se recolectó en un envase el agua en conjunto con el aceite esencial, por lo que se debía hacer su separación, por medio de la técnica de decantación (ver figura 9). Para esto, se utilizó acetato de etilo para separar la fase orgánica de la fase acuosa, al ser la densidad del agua ( $997 \text{ Kg/m}^3$ ) superior a la del acetato de etilo ( $902 \text{ Kg/m}^3$ ), la fase que contenía el aceite esencial correspondía a la de arriba.

Se escogió como solvente orgánico el acetato de etilo, debido a que tiene un punto de ebullición de  $77,1^\circ\text{C}$ , lo cual es menor al reportado en el termómetro del aceite esencial, además porque es inmisible en el agua lo que facilita la separación de las fases, es volátil, es seguro de manejar y además, no es un solvente que interaccione con el vidrio<sup>132</sup>. Sin embargo, también se pudieron haber utilizado otros solventes orgánicos, pero, por razones de tiempo, cantidad de muestra y por lo ocurrido con la primera prueba de arrastre de vapor, no se usaron en una segunda prueba; estos son: éter etílico (punto de ebullición:  $35^\circ\text{C}$ ),

hexano (punto de ebullición: 69°C), cloroformo (punto de ebullición: 61°C), benceno (punto de ebullición: 80°C), entre otros.

Durante el proceso una de las observaciones, las cuales son de interés, es que, en el momento de realizar las extracciones por medio de arrastre por vapor, se desprende en el proceso un olor a clavo de olor. Además, se utilizó papel aluminio alrededor del sistema para evitar la diseminación del calor ya que este es un material que permite la conductividad y favorece la concentración del calor facilitando a su vez, una mayor eficacia y eficiencia en el proceso (ver figura 23)<sup>133</sup>.

**Figura 23. Uso del papel aluminio en el sistema del arrastre por vapor del Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas**



Fuente: Elaboración propia, 2023.

**Tabla 7. Condiciones y resultados obtenidos con el método de arrastre por vapor**

	<b>Día 1 03 de mayo del 2023</b>	<b>Día 2 04 de mayo del 2023</b>	<b>Día 3 05 de mayo del 2023</b>
Peso de hojas fraccionadas	42,4737 gramos	42,3622 gramos	42,6305 gramos
Balón con agua	300mL	300mL	300mL

Balón de tres bocas con material vegetal	100mL	100mL	100mL
Peso de lo obtenido (extracto+agua)	29,7830g	47,3392g	27,8933g
Temperatura de ebullición	93°C	93°C	93°C
Temperatura de plantilla inicial	250°C	450°C	450°C
Temperatura de plantilla final	450°C	450°C	450°C
Posibles errores	Posibles fugas, calor muy diseminado, temperatura baja en ambos balones	Poca cantidad de agua en el balón de tres bocas con el paso del tiempo	El condensador no estaba lo suficientemente frío
Cambios implementados	N/A	Se colocó la temperatura inicial de 450°C, se envolvió el balón con papel aluminio, se implementó el uso de parafina en los posibles lugares de fuga	Se colocó la temperatura inicial de 450°C, se envolvió el balón con papel aluminio, se implementó el uso de parafina en los posibles lugares de fuga, revisión constante del agua en los dos balones
Tiempo de inicio de destilación	A las 3 horas	A la hora	A los 45 minutos
Tiempo del sistema en funcionamiento	7 horas	7 horas	4 horas

Fuente: Elaboración propia, 2023.

En la tabla 7 se aprecian las condiciones y resultados obtenidos en el proceso de destilación por medio del método de arrastre por vapor. Se pesó una cantidad aproximada a los 42 gramos para cada uno de los días de extracción, sin ninguna especificidad debido a que se estaban realizando pruebas. El material orgánico total enviado por Osa Conservation corresponde a 1,5 Kg aproximadamente. Se añadió para los tres días la misma cantidad de volumen a los balones, tanto al de la fuente de vapor como al del material vegetal. El peso de lo obtenido en los tres días, se aprecia que el de mayor cantidad fue el del segundo día en el que se habían aplicado la mayor cantidad de cambios propuestos a partir de los fallos del día 1.

El día 1 pudo tener menos cantidad de volumen recolectado debido a las diferentes fallas que se tuvieron, así como posibles fugas, calor muy diseminado debido a que no se estaba utilizando el aluminio, temperatura baja en ambos balones, lo que hacía el proceso más lento, por lo que se aprecia que ese día para comenzar a destilar se tardaron 3 horas. En el día 2, al corregir esto, la destilación comenzó a la hora y en el caso del día 3, la cantidad de volumen obtenida pudo deberse a que las horas en las que estuvo el sistema fue menor, ya que solo estuvo por 4 horas, mientras que los otros dos días fueron de 7 horas.

En el día 3, mientras el sistema estaba en funcionamiento se estaban realizando las pruebas de decantación y uso del rotavapor. Además, con el paso del tiempo el condensador no estaba lo suficientemente frío lo que hace más lento el sistema y que el mismo no funcione de la manera adecuada, esa es otra de las posibles razones del porqué se recolectó menos.

Como se mencionó, en el día 3 se pretendía realizar la separación y recolección de la fase orgánica, para lo cual se debía utilizar el rotavapor (ver figura 10). Se utiliza este equipo para poder evaporar el solvente, en este caso acetato de etilo, que se añadió, para esto se identificó su punto de ebullición, el cual corresponde a 77,1°C. Se colocó a una temperatura de 80°C y a 40 revoluciones por minuto, según lo recomendado por el técnico presente en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas. Sin embargo, al someter el aceite a este proceso, en cuestión de 10 minutos se observó que el aceite esencial se había evaporado por completo junto con el acetato de etilo.

Para el último día de extracción, se intentó como prueba adicional, separar el agua del aceite no por el proceso de decantación, sino que por medio de evaporación (ver figura 24).

Antes de iniciar la prueba, se podía apreciar en el fondo del beaker de recolección, las gotas de aceite presentes en combinación con el agua (ver figura 25). Al someterlo en baño María a una temperatura registrada en la plantilla de 80°C y con termómetro para ir controlando la misma, sucedió lo mismo que en el rotavapor, en cuestión de minutos se evaporó el aceite y no se observaron más las gotas en la parte inferior.

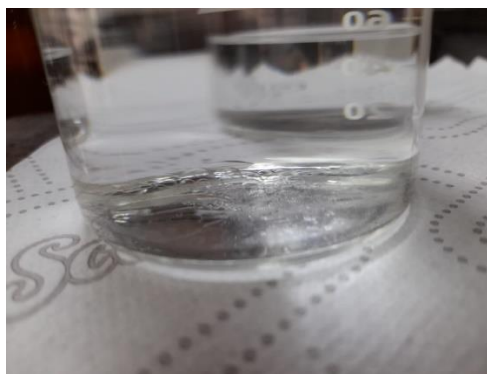
Esto se pudo deber a tres razones, el agua al tener el punto de ebullición de 100°C y el aceite, según el termómetro utilizado en el método de arrastre por vapor, ebulle a los 93°C no se puede eliminar el agua por este método sin antes eliminar el aceite. La segunda posible razón, es que al aumentar la temperatura puede que el aceite se solubilice con el agua como sucedió en la Universidad Nacional, lo cual se explicará más adelante. Y la tercera posible razón, que de acuerdo a lo que sucedió con el rotavapor puede ser la razón más posible, es que se consideró que se estaba frente un aceite ligero, es decir a uno muy volátil, debido que a las dos pruebas sometidas el aceite se evaporó por completo en cuestión de minutos.

**Figura 24. Prueba de evaporación del agua y separarlo del aceite**



Fuente: Elaboración propia, 2023.

**Figura 25. Gotas de aceite observadas en el beaker de recolección**



Fuente: Elaboración propia, 2023.

En el proyecto mencionado anteriormente, el cual se realizó en conjunto con la Universidad Nacional de Costa Rica, se había realizado el proceso de extracción del aceite por medio de una hidrodestilación, lo cual se considera dentro de los métodos recomendados, por lo que era aceptable. Sin embargo, para este método se suele utilizar un Clevenger (ver figura 26), un destilador Dean-Stark o un destilador Dean-Stark sin llave, en el caso de la UNA el equipo disponible en ese momento era el Dean-Stark sin llave (ver figura 27).

**Tabla 8. Diferencias de uso del Clevenger, destilador Dean-Stark y destilador Dean-Stark sin llave**

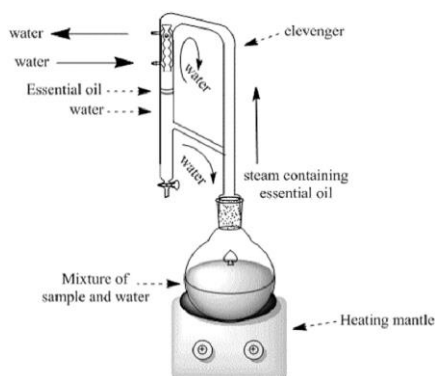
	Clevenger	Dean-Stark	Dean-Stark sin llave
Principio de funcionamiento	Destilación simple con arrastre por vapor o hidrodestilación	Extracción por arrastre con vapor con separación de fases líquidas	Extracción por arrastre con vapor sin separación de fases líquidas, se debe hacer la separación por otros métodos
Utilidad principal	Aislar aceites esenciales y compuestos volátiles	Extracción de agua y compuestos	Extracción de agua y compuestos volátiles, cuando la

		volátiles de una muestra	separación de fases no es necesaria
Aplicaciones comunes	Industria de fragancias, aceites esenciales, aromaterapia	Análisis de contenido de agua en muestras o extracción de compuestos orgánicos	Extracción de compuestos orgánicos, análisis químicos y extracción de aceites
Separación de fases	Permite una separación de fases	Permite una separación de fases	No permite una separación de fases
Tiempo de proceso	Más rápido	Más rápido	Intermedio, sin separación de fases
Tipo de muestra	Aceites esenciales	Muestras que requieren separación de agua y compuestos orgánicos	Muestras que necesiten ser extraídas sin separación del agua
Manejo de muestras sensibles al agua	No se recomienda	Adecuado	Adecuado

Fuente: Elaboración propia con base en la referencia<sup>134,135</sup>.

A partir de lo encontrado para la elaboración de la tabla 8, se determinó que la mejor opción que se adecuaba al trabajo de investigación, era el Clevenger o el Dean Stark con llave. Esto debido a que se descartó el Dean-Stark sin llave porque no permite separaciones, mientras que los otros dos son utilizados para separar el agua de componentes volátiles por la llave que tienen en su diseño.

**Figura 26. Clevenger**



Fuente: imagen tomada de Phenolic Profile, antioxidant and enzyme inhibition properties of the Chilean endemic plant *Ovidia pillopillo* y Meissner (Thymelaeaceae)<sup>136</sup>.

**Figura 27. Equipo utilizado en el Laboratorio de Investigación en Biorefinería de la Escuela de Química de la Universidad Nacional de Costa Rica**



Fuente: Elaboración propia, 2023.

En el caso del proyecto realizado en conjunto con la UNA, sí se observó la recolección del aceite en la trampa Dean-Stark sin llave, sin embargo, la extracción del aceite de la especie *P. costaricense* falló debido a que la temperatura de la columna de recolección aumentó y esto hizo que el aceite se calentara a cierto nivel que llevó a la solubilización de este con el agua. Por esta razón, como equipo se tomó la decisión de realizar una destilación

simple y también, utilizar otro tipo de solventes para obtener un mejor rendimiento en la extracción del aceite, lo cual fue beneficioso. Al concluir esa investigación no se logró en su momento analizar la extracción del aceite debido a factores externos<sup>9</sup>.

A partir de lo mencionado, al no funcionar la primera prueba con el arrastre por vapor para la presente investigación, ya que se consideró un aceite ligero muy volátil, se tomó la decisión de hacer una hidrodestilación. Una de las limitantes y desafíos que se tuvo en el proceso, fue que el equipo y cristalería requerida para su elaboración no se tenía a disposición, por esa razón se alargó el proceso de almacenamiento de las hojas, pero siempre sometidas a refrigeración.

En el proceso de búsqueda de lugares en el que se pudieran hacer colaboraciones para poder llevar a cabo el experimento, muchos laboratorios indicaron que no realizaban el proceso, por lo que no contaban con el equipo necesario; y, por otro lado, se negaban ante la solicitud. Por lo que, por última instancia, se contactó al CIPRONA, el cual brinda servicios de paga en la que realizan estos métodos.

Para el día 08 de junio del 2023, se llevó el material vegetal al CIPRONA para que este fuera procesado el 12 de junio del 2023. La extracción se hizo por medio de una hidrodestilación, se recolectó 2,5 mL de 1 Kg de material procesado (ver figura 11 y 12).

Para determinar el porcentaje de rendimiento obtenido:

$$\text{Porcentaje de rendimiento} = \frac{\text{Aceite obtenido (Kg)}}{\text{Materia prima vegetal (Kg)}} \times 100$$

$$\text{Porcentaje de rendimiento} = \frac{0,0015775 \text{ Kg}}{1 \text{ Kg}} \times 100$$

$$\text{Porcentaje de rendimiento} = 0,15775\%$$

**Tabla 9. Datos y resultados obtenidos a partir del extracto de aceite esencial de las hojas del *P. costaricense* realizado en el Centro de Investigaciones en Productos Naturales en la UCR**

<b>Condiciones y variables medidas</b>	<b>Datos</b>
Material vegetal	<i>Pleodendron costaricense</i>
Parte del árbol utilizado	Hojas
Estado de la parte del árbol utilizada	Frescas en refrigeración
Cantidad procesada	1 Kg
Temperatura utilizada	500 °C
Volumen utilizado	1 000 mL
Tiempo de destilación	3 horas y media
Tiempo de inicio de destilación	15 minutos
Cantidad de aceite esencial recolectado (mL)	2,5
Cantidad de aceite esencial recolectado (g)	1,5775
Porcentaje de rendimiento (%)	0,15775

Fuente: Elaboración propia, con información brindada por parte del CIPRONA vía email, 2023.

En la tabla 9, se aprecian los resultados obtenidos en la primera extracción que corresponde al de las hojas. En este caso, se obtuvo un porcentaje de rendimiento de 0,15775%, tomando en cuenta que se utilizaron 1 Kg de hojas en estado fresco y en refrigeración; y se obtuvo una cantidad de 2,5 mL, que al pesarlo se reportó una masa de 1,5775 gramos o 0,0015775 Kg.

Por lo general, en el caso de los aceites esenciales no se obtiene siempre la misma cantidad de aceite esencial, eso puede variar significativamente debido a diversos factores, así como el tipo de material vegetal y su calidad, el método de extracción, entre otros. Entre una especie y otra, se pueden obtener distintas cantidades de volumen o masa de los aceites esenciales.

Una de las posibles razones del porqué se obtuvo poca cantidad en el caso del *P. costaricense* con las hojas, puede deberse más que todo por el tiempo de conservación del material vegetal, lo que pudo disminuir en gran parte su calidad. Al tenerlo en refrigeración aproximadamente por 2 meses, hace que, si bien se mantiene visualmente intacta, puede que internamente se vayan perdiendo propiedades y componentes con el paso del tiempo. Además que, su porcentaje de rendimiento puede disminuir si se compara con una muestra que se procesa seguido a su recolección. Se considera que se obtuvo lo esperado en cuanto al volumen recolectado y lo necesario para poder desarrollar las pruebas correspondientes al cumplimiento de los objetivos propuestos en la investigación, ya que, en algunos casos, se puede recolectar 1mL o inclusive 1 gota, lo que hubiera imposibilitado el desarrollo del trabajo.

El aceite esencial se debe recolectar en un envase ámbar principalmente, sin embargo, si no se tiene a disposición, se puede utilizar papel aluminio para cubrir y proteger los componentes del extracto, ya que alguno de ellos podría ser fotosensibles o sufrir degradaciones con la luz<sup>137</sup>.

Una vez obtenido el aceite esencial, se procedió a realizar las pruebas antimicóticas en la cual para el caso de las hojas se utilizó 1 mL de aceite esencial y 0,5mL para las pruebas fisicoquímicas, obtención del espectro IR y cromatógrafo de gases, lo cual será explicado en los apartados siguientes.

Para llevar a cabo la extracción de los frutos, se tuvo que esperar a agosto, por lo mencionado de que solo en estas fechas se pueden recolectar. Para este caso, se tuvo el contacto de Douglas José Oviedo Cerdas, quien brindó la ayuda para poder realizar la extracción en el Laboratorio de Química de la Universidad Iberoamericana, lo cual fue beneficioso para poder visualizar mejor el proceso y disminución de costos.

El 12 de agosto del 2023, se realizó el procesamiento del material vegetal. Para esto, se inició disminuyendo el tamaño de partícula de los frutos (ver figura 13). Una vez realizado esto, se inició con el proceso de hidrodestilación con las condiciones establecidas en la tabla 11.

Para determinar su porcentaje de rendimiento, tomando en cuenta que se recolectó 1,5 mL, lo cual corresponde a 1,1763 gramos y el material vegetal utilizado fue de 580 gramos:

$$\text{Porcentaje de rendimiento} = \frac{\text{Aceite obtenido (Kg)}}{\text{Materia prima vegetal (Kg)}} \times 100$$

$$\text{Porcentaje de rendimiento} = \frac{0,0011763 \text{ Kg}}{0,58 \text{ Kg}} \times 100$$

$$\text{Porcentaje de rendimiento} = 0,2028\%$$

**Tabla 10. Datos y resultados obtenidos a partir del extracto de aceite esencial de los frutos del *P. costaricense* realizado en el Laboratorio de Química de la Universidad Iberoamericana**

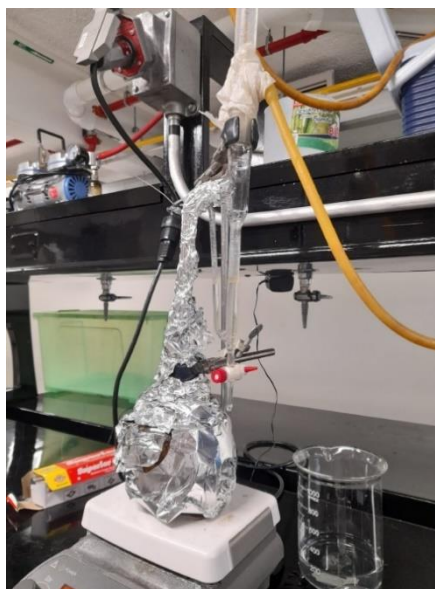
Condiciones y variables medidas	Datos
Material vegetal	<i>Pleodendron costaricense</i>
Parte del árbol utilizado	Frutos
Estado de la parte del árbol utilizada	Frescos en refrigeración
Cantidad procesada	580 g
Temperatura utilizada	400 °C
Volumen utilizado	700 mL
Tiempo de destilación	4 horas y media
Tiempo de inicio de destilación	30 minutos
Cantidad de aceite esencial recolectado (mL)	1,5
Cantidad de aceite esencial recolectado (g)	1,1763
Porcentaje de rendimiento (%)	0,2028

Fuente: Elaboración propia, 2023.

En la tabla 10 se aprecian las condiciones y variables medidas en el proceso de extracción del aceite esencial de los frutos del *P. costaricense*. Se utilizó, al igual que con las hojas, el método de hidroddestilación, en el que se sometió a una temperatura de 400°C para

los dos sistemas colocados y ambos con papel aluminio para concentrar más el calor y evitar su diseminación (ver figura 14 y 28). Se pusieron dos sistemas para acelerar el proceso y a la vez, diferenciar la velocidad de destilación del balón 1, el cual contenía los frutos recolectados con más tiempo; y el balón 2, con los más maduros. En esta prueba inespecífica y solo observacional, se pudo identificar que los maduros permitían una recolección más acelerada y abundante en comparación con los del balón 1. Lo anterior, puede deberse a lo mencionado de que a menos tiempo de almacenamiento y más rápido es su procesamiento seguido a su recolección, mayor calidad y eficacia. Finalmente, lo recolectado en ambos sistemas se mezcló.

**Figura 28. Uso del papel aluminio en el sistema de hidrodestilación del Laboratorio de Química de la Universidad Iberoamericana**



Fuente: Elaboración propia, 2023.

En este caso se utilizaron frutos frescos en refrigeración, una parte de ellos se había recolectado un mes antes y otros unos días antes de ser procesado, por tanto, al igual que las hojas, su calidad pudo verse afectada. Además, los recolectados en julio fueron enviados en agosto abiertos, ya que los de Osa Conservation debían dejarse las semillas para poder replicar la reproducción de esta especie (ver figura 29). Al estar manipulados por tanto tiempo y además, no tener las condiciones de almacenamiento en el proceso de transporte, pudieron existir pérdidas significativas.

**Figura 29. Semillas del *P. costaricense***



Fuente: Elaboración propia, 2023.

Al realizar una comparación de lo obtenido por parte de las hojas y de los frutos, ambos tuvieron porcentajes de rendimiento bajo, que además de la posibilidad de su disminución en la cantidad de aceite por pérdida de calidad al tener periodos prolongados de almacenamiento, también pudo deberse al tamaño de la muestra. La cantidad de la materia vegetal influye directamente en lo obtenido, al tener una mayor proporción de hojas o de frutos puede aumentarse, a su vez, la cantidad de aceite<sup>138</sup>. Si bien es cierto, además del tamaño, se debería prolongar, por lo tanto, el tiempo de destilación, para asegurar que todo el aceite se extraiga. En este caso, se hubiera deseado utilizar la misma cantidad de hojas y de frutos para poder comparar su porcentaje de rendimiento de acuerdo a las mismas especificaciones. Sin embargo, el material total donado por Osa Conservation fue el destinado en el procesamiento.

A pesar de utilizar diferentes equipos de laboratorios, se puede apreciar en la tabla 9 y 10, que el aceite obtenido en mililitros por parte de las hojas fue de 2,5 mL y de los frutos, de 1,5 mL, lo cual corresponde a la mitad. El tamaño de muestra se identifica que efectivamente tiene un impacto significativo en el proceso de recolección del extracto, ya que para las hojas se utilizó 1 Kg de material y para los frutos la mitad aproximadamente, 580 gramos, por lo que se puede evidenciar que al utilizar el doble de materia prima se obtuvo el doble de volumen de aceite esencial.

El tiempo de destilación para las hojas fue de 3 horas, mientras que el de los frutos fue de 4 horas y media. Lo anterior, pudo deberse a que el equipo utilizado por la UCR tiene una capacidad aún mayor, también por eso se utilizó 1 Kg de material. Además, al tener un

equipo más grande hace que la eficiencia de extracción aumente, ya que permite procesar más cantidad de materia prima, controlar la temperatura, reducir el tiempo total de procesamiento, entre otros<sup>138</sup>.

Cabe destacar que los frutos que fueron enviados por Osa Conservation que estaban abiertos, tenían un olor no tan agradable por lo que se colocaron en refrigeración para cumplir los lineamientos de conservación y cuando fueron retirados para ser procesados, se mejoró su olor. Sin embargo, eso pudo también significar que, si físicamente desprendía una característica de baja calidad, entonces en su interior también pudo haber sido afectado.

**Tabla 11. Comparación de la técnica de arrastre con vapor y la hidrodestilación en el proceso de extracción del aceite esencial del *P. costarricense***

<b>Métodos de extracción y condiciones</b>	<b>Arrastre por vapor</b>	<b>Hidrodestilación</b>
Tiempo de inicio de destilación por sistema	Inclusive horas	Minutos
Días de recolección	Tres	Uno
Separación de fases	Difícil por uso de decantación y rotavapor	Por medio del Clevenger y su llave se separó el agua del aceite por densidades
Rendimiento de extracción	No se pudo determinar	Se pudo determinar

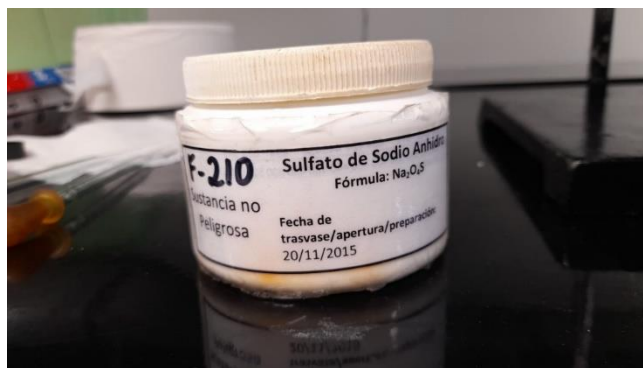
Fuente: Elaboración propia, 2023.

En la tabla 11, se realizó una comparación entre los métodos de extracción de aceites esenciales utilizados durante el proceso de investigación, en el que se determinó que el mejor método para este aceite esencial del *P. costarricense*, el cual se considera ligero, es la hidrodestilación. Esto porque es más rápida en comenzar el proceso, posiblemente porque el agua está en contacto directo con el material vegetal, mientras que, en el arrastre por vapor, el agua se encuentra en otro recipiente externo por lo que debe pasar por un proceso adicional

para que el vapor llegue hasta la muestra. Además, se realizó, en este caso, la extracción por el método de arrastre por vapor por tres días para recolectar lo mínimo necesario para las pruebas totales, sin embargo, para la hidrodestilación en cuestión de un día se obtuvo lo requerido. Y también, como se ha descrito, la separación de fases del método final seleccionado fue más sencilla y en este sí se pudo determinar el rendimiento.

Cabe destacar que para cualquier método que se decida utilizar cuando se estén haciendo extracciones de este tipo, es importante utilizar después de la separación del agua, un secante para que, de esta manera, se asegure que se esté en presencia de solo el aceite y no haya interferencias ni señales alternas en el proceso de realizar el espectro IR o del cromatógrafo de gases<sup>139</sup>. En este caso, el utilizado fue el Sulfato de Magnesio Anhidro (ver figura 30). E igualmente, se utilizó un envase adecuado para almacenar y trasladar el aceite esencial de los frutos (ver figura 31).

**Figura 30. Sulfato de magnesio anhidro utilizado para secar la muestra**



Fuente: Elaboración propia, 2023.

**Figura 31. Recipiente de almacenamiento del aceite esencial de las hojas del *P.costaricense***



Fuente: Elaboración propia, 2023.

**4.2 Segundo objetivo específico: Identificar los posibles metabolitos secundarios presentes en el extracto del aceite esencial de las hojas y frutos del *Pleodendron costaricense* por medio de pruebas cualitativas, uso del espectrofotómetro IR y cromatografía de gases acoplada a detector de masas.**

En este apartado, que corresponde al desarrollo del segundo objetivo planteado en la investigación, se detallarán los resultados obtenidos de los posibles metabolitos secundarios presentes, tanto en el extracto de aceite esencial de las hojas como de los frutos del *P.costaricense*. Esto se llevó a cabo mediante pruebas cualitativas, uso del espectrofotómetro IR para identificar grupos funcionales y el cromatógrafo de gases acoplado a detector de masas para una precisión mayor, sin embargo, cabe recalcar que todo esto se hizo de manera cualitativa debido al equipo disponible.

La composición química conocida de la especie *P.costaricense* corresponde a alfa-pineno, beta-pineno, beta-mirceno, beta-tujeno y beta cariofileno como los mayores constituyentes, sin embargo se tuvo una proporción mínima de linalool. Treyvaud et al.<sup>5</sup> hicieron un análisis por cromatografía de gases del aceite esencial de la corteza y las hojas del árbol en estudio. También, realizaron un análisis fitoquímico en el que, al aislar partes

del delta-tocotrienol, beta-sitosterol, pudieron identificar el cinnamodial, cinnamosmolida, polygodial y el mukaadial. Adicional a estas, dos sustancias nuevas que corresponden a los sesquiterpenos, los cuales son: parritadial y pleodendione<sup>5</sup>. En la tabla 12 se puede apreciar la diferencia de metabolitos identificados en cada proceso y su clasificación. Los equipos que utilizaron para esto, corresponden al FTIR-8400S, NMR y CG con detector FID.

**Tabla 12. Metabolitos conocidos por parte del aceite esencial de hojas y corteza del *P. costaricense* identificados por cromatografía de gases y por análisis fitoquímico de aislamiento**

<b>Metabolito</b>	<b>Clasificación</b>	<b>Método de identificación</b>	<b>Estado de identificación</b>
Alfa-pineno	Monoterpeno	Cromatografía de gases	Conocida
Beta-pineno	Monoterpeno	Cromatografía de gases	Conocida
Beta-mirceno	Monoterpeno	Cromatografía de gases	Conocida
Beta-tujeno	Monoterpeno	Cromatografía de gases	Conocida
Beta-cariofileno	Sesquiterpeno	Cromatografía de gases	Conocida
Linalool	Monoterpeno	Cromatografía de gases	Conocida
Cinnamodial	Sesquiterpeno	Análisis fitoquímico de aislamiento	Conocida
Cinnamosmolida	Sesquiterpeno	Análisis fitoquímico de aislamiento	Conocida
Polygodial	Sesquiterpeno	Análisis fitoquímico de aislamiento	Conocida
Mukaadial	Sesquiterpeno	Análisis fitoquímico de aislamiento	Conocida

Parritadial	Sesquiterpeno	Análisis fitoquímico de aislamiento	Nueva
Pleodendione	Sesquiterpeno	Análisis fitoquímico de aislamiento	Nueva

Fuente: Elaboración propia con base en la referencia<sup>5</sup>.

En la tabla 12, se aprecia que la mayor cantidad de metabolitos conocidos son sesquiterpenos, los cuales están formados por tres unidades de isopreno. Es un grupo que puede estar presente en las hojas, frutos y raíces de plantas angiospermas, algunas gimnospermas y briófitas. Este grupo, tienen propiedades antifúngicas, antibacterianas y antivirales<sup>140</sup>.

En el análisis de Treyvaud et al.<sup>5</sup>, el cual fue el primero en llevarse a cabo para identificar los metabolitos presentes en esta especie, notaron que la principal diferencia entre el aceite esencial de las hojas y de la corteza fue el contenido del beta-cariofileno, el cual fue el segundo componente más abundante en las hojas, pero casi ausente en la corteza.

El extracto obtenido a partir de la planta se caracteriza por tener un olor muy similar a canela y pimienta negra; esto se respalda con el estudio realizado por Treyvaud et al.<sup>5</sup>, en el que compararon estos componentes para determinar si había relación de composición de sustancias de estas dos especies y el *P. costaricense*. Respectivamente, la planta denominada *Cinnamomun zeylanicum* presenta: el  $\beta$ -cariofileno, acetato de cinamilo y linalool. Por otro lado, la especie *Pipper nigrum*, contiene: al  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, limoneno y  $\beta$ -cariofileno. Al realizar los perfiles fisicoquímicos, se obtienen datos relacionados entre las dos especies con el *P. costaricense*, lo cual indica que efectivamente la razón de la fragancia se debe a dichas sustancias.

Para esta investigación, se tomó como base los descubrimientos hechos por Treyvaud et al.<sup>5</sup>, por lo que se realizaron tres procesos, de acuerdo con el equipo disponible, pruebas cualitativas, uso del espectrofotómetro IR y el CG acoplado a detector de masas. Para el caso de las pruebas cualitativas, se hicieron solo tres, en las que se podían identificar triterpenos, sesquiterpenos, fenoles o taninos. En la tabla 13, se aprecian los resultados obtenidos por parte del aceite esencial de las hojas y frutos.

**Tabla 13. Resultados obtenidos de las pruebas cualitativas de los extractos de aceite esencial de las hojas y frutos del *P.costaricense***

Prueba cualitativa	Metabolito por identificar	Reacción en aceite esencial de hojas	Reacción en aceite esencial de frutos
Liebermann Burchard	Triterpenos	Negativa	Negativa
Vainillina-ácido sulfúrico	Sesquiterpenos	Positiva	Positiva
Cloruro férrico	Fenoles y taninos	Negativa	Negativa

Fuente: Elaboración propia, 2023.

En la tabla 13 se aprecia cómo la reacción para identificar sesquiterpenos dio positiva, lo cual evidencia que lo indicado en la teoría y en la experimentación de Treyvaud et al.<sup>5</sup> es correcto. En la figura 32 se aprecia el resultado positivo por parte de las hojas y en la figura 33, se muestra parte del proceso de la prueba realizada con el de los frutos y su cambio de coloración.

**Figura 32. Prueba de vainillina-ácido sulfúrico del aceite esencial de las hojas del *P.costaricense***



Fuente: Elaboración propia, 2023.

**Figura 33. Prueba de vainillina-ácido sulfúrico del aceite esencial de los frutos del *P.costaricense***



Fuente: Elaboración propia, 2023.

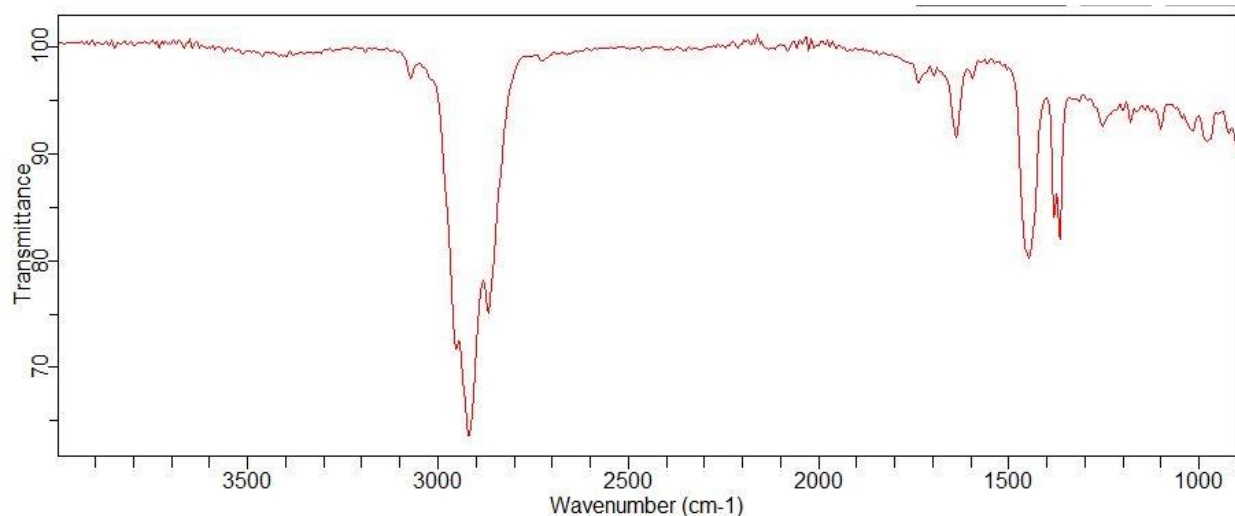
La prueba de identificación de sesquiterpenos, se basa en la condensación de la vainillina con proantocianinas en una solución acidificada, la vainillina protonada, lo cual es un electrófilo débil, reacciona con el anillo del terpeno. El producto de esta reacción se deshidrata fácilmente para dar un color rosa ligero a un intenso rojo cereza. La estabilidad de este color puede aumentar cuando la luz es excluida y la temperatura de reacción es controlada<sup>141,142</sup>.

Adicional a las pruebas cualitativas, se procedió a realizar el análisis por espectroscopía infrarroja utilizando el equipo proporcionado por el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas, marca Agilent Technologies, modelo Cary 630 FTIR. Para el mismo, se necesitó una gota del extracto de aceite esencial de las hojas y de los frutos por separado.

La espectroscopía IR permite realizar análisis cualitativos y cuantitativos. El equipo utilizado para el mismo, proporciona información sobre el contenido de alguna sustancia o compuesto que se quiera analizar, es un método práctico y rápido ya que se puede llevar a cabo con poca cantidad de la muestra, además de que el resultado se obtiene en pocos minutos<sup>143</sup>.

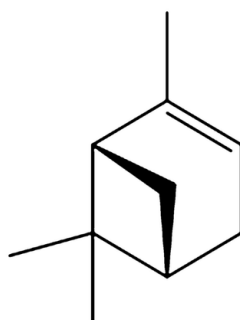
En el caso del aceite esencial de las hojas del *P. costaricense*, el espectro obtenido por parte de las hojas se muestra en la figura 34. Para identificar los posibles grupos funcionales, se usó como base la estructura de la molécula que de acuerdo con Treyvaud et al.<sup>5</sup>, es de las más representativas en el aceite esencial de la especie, esta se observa en la figura 35.

**Figura 34. Espectro del aceite esencial de las hojas del *P.costaricense* obtenido en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas**



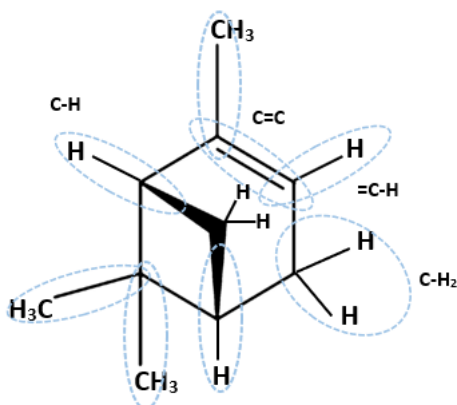
Fuente: Elaboración propia, 2023.

**Figura 35. Estructura del alfa-pineno**



Fuente: imagen tomada de Authenticity control of pine sylvestris essential oil by chiral gas chromatographic analysis of  $\alpha$ -pinene<sup>144</sup>.

**Figura 36. Identificación de los grupos funcionales del alfa-pineno**



Fuente: elaboración propia con base en la referencia<sup>144</sup>.

El alfa pineno, es una estructura compuesta por un ciclohexano, en el que derivan diversos grupos funcionales. En la figura 36 se identificaron los principales de la molécula de alfa-pineno. Para proceder a realizar el análisis del espectro IR, se realizó una búsqueda bibliográfica en la que se establecieron los rangos de señal para cada uno de los grupos funcionales.

**Tabla 14. Rango de señal teórica (cm<sup>-1</sup>) y clasificación de los grupos funcionales presentes en el alfa-pineno**

Grupo funcional	Rango de la señal teórica (cm <sup>-1</sup> )
=C-H	3000-3010
-C-H alqueno	3000-2500
-C=C	1670-1600
-C-H <sub>2</sub> alcano	1465
-CH <sub>3</sub>	1390-1380

Fuente: Elaboración propia con base en la referencia<sup>145</sup>.

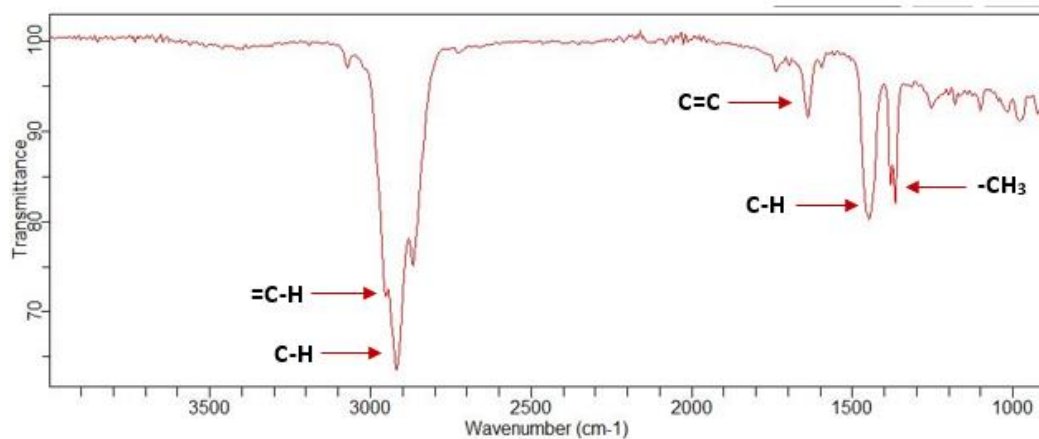
**Tabla 15. Señales detectadas en el espectro del aceite esencial de las hojas del *P.costaricense* obtenido en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas**

<b>Muestra</b>	<b>Rango de señal detectada (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Grupo funcional</b>	<b>Rango de la señal teórica (cm<sup>-1</sup>)</b>
Aceite esencial hojas <i>P.costaricense</i>	2900-3000	=C-H	3000-3010
Aceite esencial hojas <i>P.costaricense</i>	2900-3000	-C-H alqueno	2500-3000
Aceite esencial hojas <i>P.costaricense</i>	1600-1700	-C=C	1600-1670
Aceite esencial hojas <i>P.costaricense</i>	1400-1500	-C-H <sub>2</sub> alcano	1465
Aceite esencial hojas <i>P.costaricense</i>	1300-1400	-CH <sub>3</sub>	1380-1390

Fuente: Elaboración propia con base en la referencia<sup>145</sup>.

Los enlaces más significativos por parte del alfa pineno, corresponden a los dobles enlaces carbono-carbono (C=C) en su estructura. Por lo general puede encontrarse entre 1640-1680 cm<sup>-1</sup> o entre 1600-1670 cm<sup>-1</sup>, esto se debe a la vibración de un estiramiento de estos enlaces<sup>145,146</sup>, así como se muestra en la figura 37.

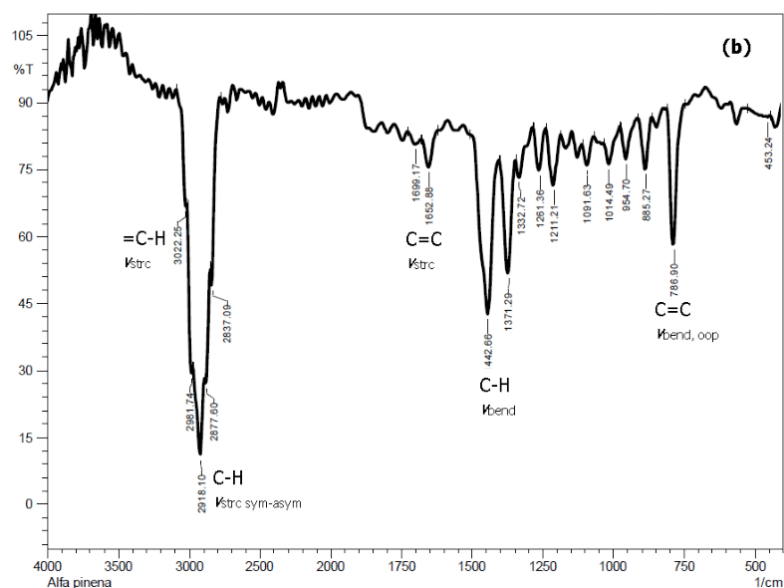
**Figura 37. Identificación de grupos funcionales en el espectro del aceite esencial de las hojas del *P.costaricense* obtenido en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas**



Fuente: Elaboración propia, 2023.

Masruri y Farid<sup>146</sup>, obtuvieron un espectro infrarrojo de una muestra de alfa-pineno al realizar un análisis de aislamientos del aceite de pino y el estudio de la oxidación de este compuesto utilizando peróxido de hidrógeno catalizado por cloruro de hierro (III). Este espectro se muestra en la figura 38, el cual fue de gran utilidad para realizar una comparación de lo obtenido en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas para el presente trabajo.

**Figura 38. Espectro del alfa-pineno conocido**



Fuente: imagen tomada del Estudio de oxidación catalítica de alfa-pineno utilizando cloruro de peróxido de hidrógeno (III)<sup>147</sup>.

**Tabla 16. Comparación de los grupos funcionales obtenidos en el espectro IR del aceite esencial de las hojas del *P. costaricense* y del análisis de la sustancia aislada del alfa-pineno**

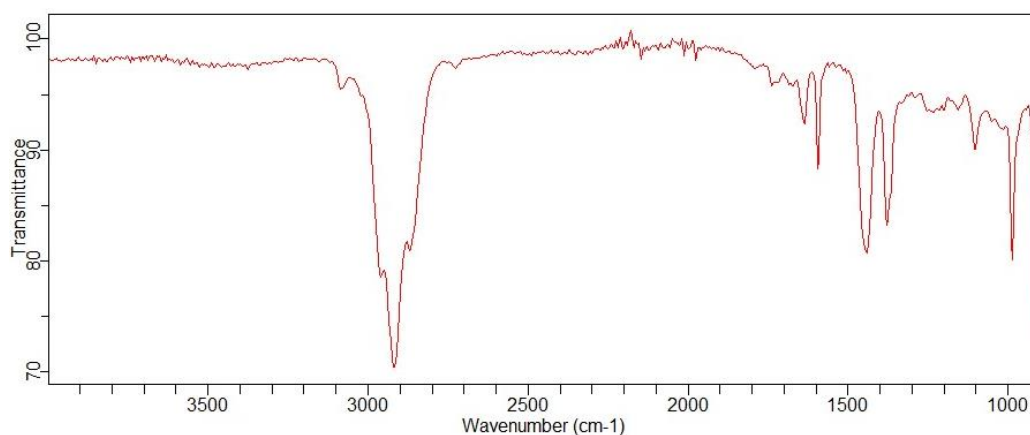
Grupo funcional	Rango de identificación del aceite esencial de las hojas del <i>P. costaricense</i>	Rango de identificación del análisis de la sustancia aislada del alfa-pineno
=C-H	2900-3000	3022
C-H	2900-3000	2918,10
C-C	1600-1700	1652,88
C-H	1400-1500	1442,66

Fuente: Elaboración propia con base en la referencia<sup>147</sup>.

Al realizar la comparación presente en la tabla 16 y tomando en cuenta los rangos de las señales teóricas de la tabla 15, se puede identificar los valores obtenidos tanto de las hojas del *P. costaricense* como el de la sustancia aislada analizada por Masruri y Farid<sup>146</sup>. Los valores principalmente pueden variar debido a que, si se analiza todo el aceite esencial, como

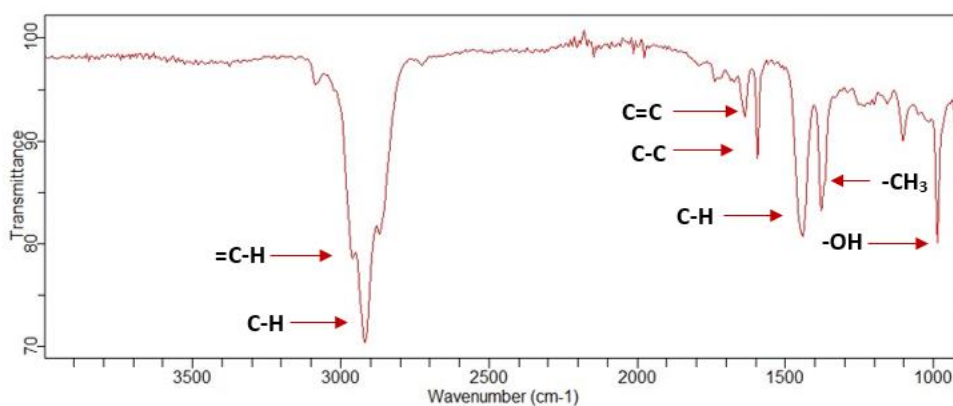
el caso de este trabajo, el espectrofotómetro IR puede captar diversas señales de otros componentes, no solo el del alfa-pineno; mientras que el de la forma aislada solo mostrará el del componente en estudio. Además, al ser un método que identifica grupos funcionales de las moléculas, no todas tendrán el mismo comportamiento, es decir, algunos enlaces pueden sufrir más tensión o estiramiento haciendo que los rangos de referencia se expandan<sup>148</sup>.

**Figura 39. Espectro del aceite esencial de las hojas del *P.costaricense* obtenido en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas**



Fuente: Elaboración propia, 2023.

**Figura 40. Espectro del aceite esencial de los frutos del *P.costaricense* obtenido en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas**



Fuente: Elaboración propia, 2023.

**Tabla 17. Señales detectadas en el espectro del aceite esencial de los frutos del *P.costaricense* obtenido en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas**

<b>Muestra</b>	<b>Rango de señal detectada (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Grupo funcional</b>	<b>Rango de la señal teórica (cm<sup>-1</sup>)</b>
Aceite esencial hojas <i>P.costaricense</i>	2900-3000	=C-H	3000-3010
Aceite esencial hojas <i>P.costaricense</i>	2900-3000	-C-H alqueno	2500-3000
Aceite esencial hojas <i>P.costaricense</i>	1600-1700	-C=C alqueno	1600-1670
Aceite esencial hojas <i>P.costaricense</i>	1600-1700	-C=C alqueno cíclico	1650-1566
Aceite esencial hojas <i>P.costaricense</i>	1400-1500	-C-H <sub>2</sub> alcano	1465
Aceite esencial hojas <i>P.costaricense</i>	1300-1400	-CH <sub>3</sub>	1380-1390
Aceite esencial hojas <i>P.costaricense</i>	1000	-OH	1400-1000

Fuente: Elaboración propia con base en la referencia<sup>145</sup>.

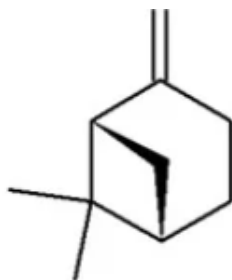
En el caso de los frutos, de la misma manera se utilizó como base la estructura del alfa pineno; si se comparan los valores obtenidos con el espectro IR de las hojas, se identifican picos similares entre sí, sin embargo, en el caso de los frutos, hay dos picos significativos en los intervalos 1600-1700 cm<sup>-1</sup> y en 1000 cm<sup>-1</sup>, los cuales pueden corresponder a otra molécula en particular, que se detallará a continuación. Esto, además de evidenciar los metabolitos presentes y compararlo con la literatura haciendo uso del CG-MS, es útil para aislar físicamente las sustancias presentes en mezclas complejas de compuestos que son altamente volátiles<sup>149</sup>.

Para poder identificar los grupos funcionales del rango de 1600-1700 cm<sup>-1</sup> y 1000 cm<sup>-1</sup>, se debe analizar cada una de las sustancias conocidas presentes en la especie. Además del

alfa-pineno, también según Treyvaud et al.<sup>5</sup> presenta el beta-pineno, beta-mirceno, beta-tujeno y beta-cariofileno; y de distintos aislamientos, identificaron el linalool, cinnamodial, cinnamosmolida, polygodial, mukaadial, parritadial y pleodendione.

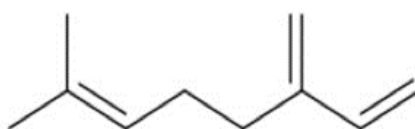
En la figura 41, se aprecia la estructura del beta-pineno que corresponde a un monoterpeno, el cual, al ser un pineno, presenta actividad antifúngica, antiviral, antimicrobiana, además de que se utilizan para generar fragancias o saborizantes<sup>150</sup>. En este caso presenta grupos funcionales similares al alfa-pineno, sin tener el doble enlace en el ciclohexano, por lo que en el espectro IR se pudo identificar, a su vez, los sustituyentes del alfa-pineno como el de esta molécula.

**Figura 41. Estructura del beta-pineno**



Fuente: imagen tomada de Biological Activities of  $\alpha$ -Pinene and  $\beta$ -Pinene Enantiomers<sup>150</sup>.

**Figura 42. Estructura del beta-mirceno**

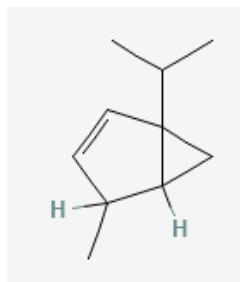


Fuente: imagen tomada de Estudio de la polimerización en emulsión empleando mirceno como monómero natural<sup>151</sup>.

En la figura 42, se muestra la estructura del beta-mirceno, que no presenta diferencias de los grupos funcionales con respecto al alfa-pineno. Este compuesto, tiene como aplicación biomédica la neuro-protección, la regeneración de tejidos y reparación de heridas, además, actúa como anti-inflamatorio, analgésico, hipnótico y relajante muscular. También, al ser parte del grupo de los terpenos, brinda aromas y sabores a las plantas, por lo que es utilizado

en fragancias<sup>151</sup>. La señal reportada entre 1600-1700  $\text{cm}^{-1}$ , puede provocarla el alqueno presente en esta estructura.

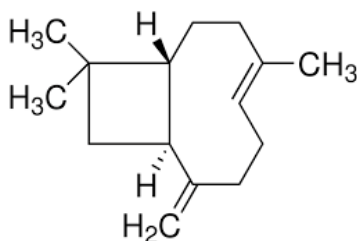
**Figura 43. Estructura del beta-tujeno**



Fuente: imagen tomada de National Library of Medicine<sup>152</sup>.

El beta-tujeno, mostrada su estructura en la figura 43, corresponde a un monoterpene, el cual se ha identificado principalmente su actividad antimicrobiana y antioxidante<sup>153</sup>. No presenta grupos funcionales diferentes al del alfa-pineno.

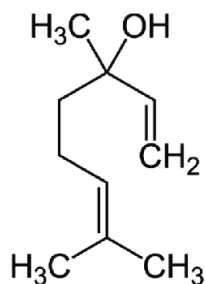
**Figura 44. Estructura del beta-cariofileno**



Fuente: imagen tomada de Sigma Aldrich<sup>154</sup>.

El beta-cariofileno, se muestra su estructura en la figura 44, no presenta grupos funcionales diferentes al del alfa pineno, por lo que lo identificado en el espectro IR igualmente podría deberse a esta molécula. Este presenta una actividad anti-inflamatoria, analgésica, ansiolítica, antifúngico<sup>155</sup>.

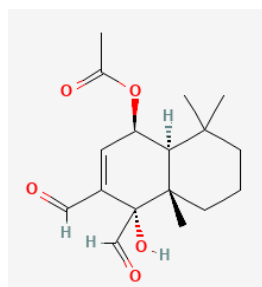
**Figura 45. Estructura del linalool**



Fuente: imagen tomada de Plasma polymerized linalool (ppLin): An antimicrobial and biocompatible coating<sup>156</sup>.

El linalool, es un terpeno, que al realizar la identificación de los grupos funcionales, se identificó como adicional al de la molécula de alfa-pineno, el hidroxilo. En este caso, se analizó el rango de señal teórica, mostrada en la tabla 18 y se pudo identificar que este es uno del posible sustituyente que en el espectro IR genera una señal a los 1000 cm<sup>-1</sup>. Esto mismo ocurre con el cinnamodial, forma parte de los sesquiterpenos del tipo drimano y presenta grupos aldehídos, éster e hidroxilos, como se muestra en la figura 46.

**Figura 46. Estructura del cinnamodial**

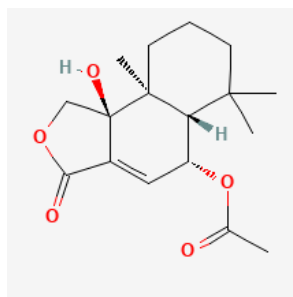


Fuente: imagen tomada de National Library of Medicine<sup>157</sup>.

Otra de las moléculas que Treyvaud et al.<sup>5</sup> mencionan de la especie en estudio, es la cinnamosmolida, esta corresponde a un sesquiterpeno del tipo drimano. En cuanto a sus grupos funcionales, así como se muestra en la figura 47, se aprecia que presenta ésteres e hidroxilos, además de otros grupos que ya contempla la molécula de alfa-pineno utilizada como base para la lectura del espectro IR. El polygodial, es un sesquiterpeno del tipo drimano que presenta una fuerte actividad insecticida y antimicótica, ya que provoca una alteración estructural de las membranas celulares de los hongos, que puede deberse a una inhibición de

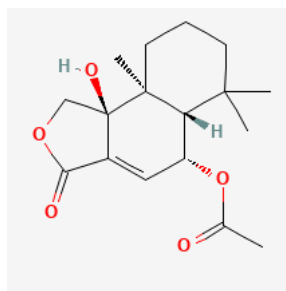
la membrana plasmática H<sup>+</sup>-ATPasa. Y su mayor actividad podría ocasionarse a un equilibrio entre la hidrofilia de la subunidad de aldehído insaturado y la hidrofobicidad de las porciones decalinas de la molécula<sup>9, 159</sup>. Este último, además, presenta grupos aldehídos en su estructura, como se evidencia en la figura 48.

**Figura 47. Estructura del cinnamosmolida**



Fuente: imagen tomada de National Library of Medicine<sup>158</sup>.

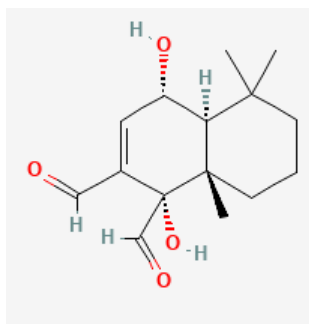
**Figura 48. Estructura del polygodial**



Fuente: imagen tomada de Comprehensive Natural Products II<sup>159</sup>.

Mata y Calvo<sup>9</sup> y Treyvaud et al.<sup>5</sup> mencionan que el mukaadial es inactivo en cuanto a la actividad antimicótica, por lo que no es de relevancia terapéutica para este trabajo. Sin embargo, al estar presente en el aceite esencial, se muestra su estructura en la figura 49, en la que se identifica que presenta en su estructura aldehídos y grupos hidroxilos.

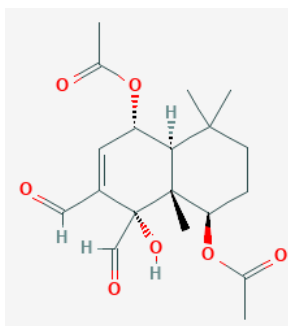
**Figura 49. Estructura del mukaadial**



Fuente: imagen tomada de National Library of Medicine<sup>160</sup>.

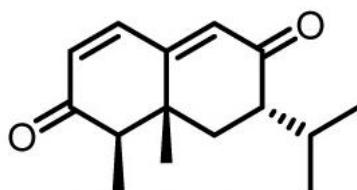
Finalmente, los dos sesquiterpenos nuevos que fueron identificados por Treyvaud et al.<sup>5</sup>, corresponden a parritadial, se aprecia su estructura en la figura 50; y el pleodendione, en la figura 51. Ambos son sesquiterpenos, en el que respectivamente presentan grupos aldehídos y carbonilos.

**Figura 50. Estructura del parritadial**



Fuente: imagen tomada de National Library of Medicine<sup>161</sup>.

**Figura 51. Estructura del pleodendione**



Fuente: imagen tomada de Total Syntheses and Biological Evaluation of (±)-Botryosphaeridione, (±)-Pleodendione, 4-epi-Periconianone B, and Analogues<sup>162</sup>.

Una vez identificados los grupos funcionales adicionales que no presenta la molécula de alfa-pineno, se determinaron los rangos de la señal teórica así como se muestra en la tabla 18. A partir de esto, se tiene como posibilidad que el grupo funcional presente en el espectro IR del aceite esencial de los frutos del *P.costaricense* en la señal marcada cerca de los 1000  $\text{cm}^{-1}$ , puede ser ocasionada por el grupo hidroxilo presente en los sesquiterpenos aislados como lo es el Linalool, cinnamodial, cinnamosmolida, polygodial, mukaadial, parritadial. Cabe recalcar que las señales presentadas en el espectro IR obtenido, pueden marcar grupos funcionales de diferentes compuestos, ya que el análisis se hizo de un aceite esencial completo proveniente de una extracción y no, de un aislamiento específico de compuestos.

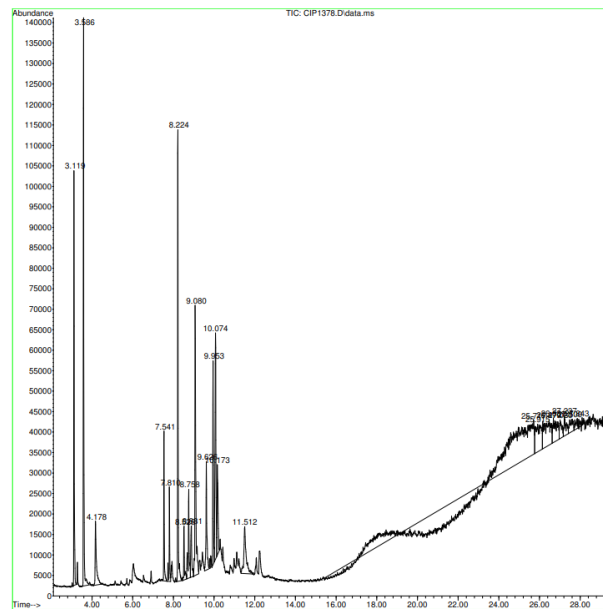
**Tabla 18. Rango de señal teórica ( $\text{cm}^{-1}$ ) de los grupos funcionales, externos al alfa-pineno, de compuestos presentes en el aceite esencial de los frutos del *P.costaricense***

Grupo funcional	Rango de la señal teórica ( $\text{cm}^{-1}$ )
Hidroxilo	1400-1000
Éster	1750-1735 1210-1163
Aldehído	2830-2695

Fuente: Elaboración propia con base en la referencia<sup>145</sup>.

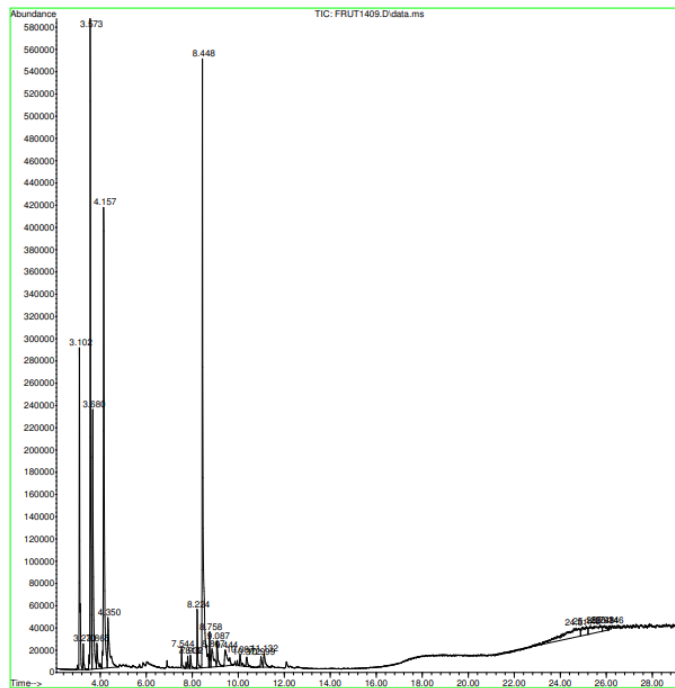
Para identificar los posibles metabolitos de una forma más precisa y a la vez, comparar con la literatura, se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas. En la figura 52 y 53, se puede apreciar los resultados obtenidos por parte del aceite esencial de las hojas y frutos del *P. costaricense*.

**Figura 52. Cromatograma del aceite esencial de las hojas del *P. costaricense***



Fuente: Elaboración propia, 2023.

**Figura 53. Cromatograma del aceite esencial de los frutos del *P. costaricense***



Fuente: Elaboración propia, 2023.

La cromatografía de gases es una de las principales técnicas para la detección, identificación, cuantificación de compuestos no polares o semipolares. Este método consiste en un sistema de gas portador, inyector, columna cromatográfica de gases, detector y unidad de procesamiento de datos. El gas utilizado por lo general es hidrógeno, helio o nitrógeno; estos son considerados como gases permanentes que tienen la facilidad de tener una adsorción baja o insignificante. El equipo utilizado está acoplado a un detector de masas, el cual debe generar especies iónicas y luego separarlas para detectarlas, a partir de la muestra que se desea analizar<sup>89,149</sup>.

En la tabla 19, se colocan los resultados obtenidos del aceite esencial de las hojas del *P. costaricense* a partir del equipo y a su vez, los porcentajes de similitud que proyecta el procesador de datos por el detector de masas.

**Tabla 19. Resultados obtenidos del CG-MS del aceite esencial de las hojas del *P. costaricense***

<b>Metabolito detectado</b>	<b>Porcentaje de similitud (%)</b>
1R-alfa-pineno	97
Alfa-pineno	95
Beta-pineno	95
Cariofileno	99
Alfa-cariofileno	97
Alfa-cubebeno	97
Copaeno	97

Fuente: Elaboración propia, 2023.

De acuerdo a lo obtenido, el que presenta mayor porcentaje de similitud es el cariofileno con un 99%. Seguido a este, el 1R-alfa-pineno y alfa-cariofileno con 97%. Posterior a estos, el alfa-pineno y el beta-pineno con 95%. El beta-mirceno, beta-tujeno, linalool, cinnamodial, cinnamosmolida, polygodial, mukaadial, parritadial, pleodendione no tuvieron señales significativas, sin embargo, hubo un alto porcentaje de similitud en componentes que no se habían reportado anteriormente en la literatura, así como el alfa-cubebeno y copaeno con 97%.

En la tabla 20, se colocan los resultados obtenidos del aceite esencial de las hojas del *P. costaricense* a partir del equipo y a su vez, los porcentajes de similitud que proyecta el procesador de datos por el detector de masas.

**Tabla 20. Resultados obtenidos del CG-MS del aceite esencial de los frutos del *P. costaricense***

Metabolito detectado	Porcentaje de similitud (%)
1R-alfa-pineno	97
Alfa-pineno	94
Beta-pineno	94
Cariofileno	99
Canfeno	95
Alfa-cubebeno	96

Fuente: Elaboración propia, 2023.

De acuerdo a lo obtenido, el que presenta mayor porcentaje de similitud es el cariofileno con un 99%. Seguido a este, el 1R-alfa-pineno con 97%. Posterior a estos, el alfa-pineno y el beta-pineno con 94%. En este caso, el beta-mirceno, beta-tujeno, linalool, cinnamodial, cinnamosmolida, polygodial, mukaadial, parritadial, pleodendione no tuvieron señales significativas, sin embargo, hubo un alto porcentaje de similitud en componentes que no se habían reportado anteriormente en la literatura, así como el alfa-cubebeno con 96% y el canfeno con 95%.

Al realizar una comparación entre los resultados obtenidos de los aceites esenciales de los frutos y las hojas del *P. costaricense*, se identifica que el CG-MS específica para ambos casos el 1R-alfa-pineno, alfa-pineno, beta-pineno, cariofileno; siendo este último componente el de mayor porcentaje de similitud. Los metabolitos secundarios mencionados anteriormente, corresponden a los mismos que describen Treyvaud et al.<sup>5</sup> en su estudio. Sin embargo, entre otros que no se encuentran en la literatura sobre el *P. costaricense* y además, presentaron picos significativos en el cromatograma del presente análisis, con porcentajes de similitud alto, para ambos casos, el alfa-cubebeno. Y adicional a esto, para el caso de las hojas, el procesador señala el copaeno; y para los frutos, el canfeno.

### **4.3 Tercer objetivo específico: Comparar las propiedades fisicoquímicas del aceite esencial de las hojas y frutos del *Pleodendron costaricense*.**

Para este tercer objetivo, una vez finalizada la extracción de los aceites esenciales mediante la hidrodestilación, descrita en el apartado 4.1, por parte de las hojas y de los frutos del *P. costaricense*, se determinó, tomando en cuenta las propiedades fisicoquímicas de ambos, la diferencia existente entre ellos y de esta manera, estos resultados permitieron llevar a cabo la propuesta de un posible producto farmacéutico que será explicado en el apartado 4.4.

Las propiedades fisicoquímicas son de gran importancia en el proceso de preformulación de un producto farmacéutico o en este caso, cuando se pretende generar un producto de origen natural. La preformulación consiste en realizar un análisis y búsqueda bibliográfica sobre diferentes principios activos, excipientes o compuestos recientemente sintetizados o compuestos extraídos de plantas en el que se obtiene información relevante que será útil para generar la formulación<sup>163</sup>. La misma toma en cuenta aspectos como las propiedades farmacodinámicas del principio o metabolito activo, es decir, consideraciones como la finalidad terapéutica, efectos tóxicos, posibles reacciones adversas, dosis y frecuencia requerida para su efecto farmacológico, características farmacocinéticas, entre otros<sup>163</sup>.

Además, en la preformulación también se identifican las características fisicoquímicas y farmacotécnicas como: propiedades organolépticas, tamaño y forma de partícula en caso de productos que tengan sólidos, cristanilidad y polimorfismo, punto de fusión, punto de ebullición, solubilidad, pureza, velocidad de disolución, fluidez, estabilidad, compatibilidad con excipientes; y las características biofarmacéuticas así como la biodisponibilidad y características fisiológicas de la vía de administración<sup>163</sup>.

Por lo general, las pruebas que se realizan en el estudio de preformulación corresponden a un análisis para mostrar su pureza, potencia, calidad o identidad, el cual para este caso se utilizan métodos o equipos como el espectrofotómetro UV, IR, RMN, pruebas de impurezas, pH, humedad, entre otros<sup>164</sup>. Adicional a esto, para las pruebas de solubilidad lo que se pretende determinar es si el mismo se disuelve al ser puesto en contacto con el agua o alguna fase acuosa, verificar su pH, pKa, sales y coeficiente de partición; esto a su vez,

para comprender los posibles métodos de formulación y su comportamiento con otros componentes<sup>165</sup>. Se identifica también su punto de fusión y de ebullición, para conocer sobre la existencia de polimorfismos, hidratos o solvatos<sup>166</sup>. Y, además, la estabilidad que el mismo puede tener tanto en estado sólido como en solución, es decir, comprobar que no haya reacciones de pirólisis, hidrólisis, pH, oxidación, fotólisis, entre otros<sup>167</sup>.

En esta sección experimental de trabajo, a partir del extracto de aceite esencial obtenido por medio de hidrodestilación, para el caso de las hojas se obtuvo un total de 2,5 mL, mientras que de los frutos se obtuvo 1,5 mL de aceite; por lo que para las distintas pruebas realizadas, se dividió esta cantidad entre cada sección, así como se muestra en la tabla 21.

**Tabla 21. Cantidad de aceite esencial de las hojas y frutos del *P. costaricense* utilizada por cada sección experimental**

<b>Sección experimental</b>	<b>Cantidad de aceite esencial de hojas</b>	<b>Cantidad de aceite esencial de frutos</b>
Aceite total obtenido en la hidrodestilación	2,5 mL	1,5 mL
Pruebas cualitativas	1 mL	0,5 mL
Espectrofotómetro IR	1 gota	1 gota
Cromatograma CG-MS	500 µL	500 µL
Pruebas fisicoquímicas	0,5 mL	0,5 mL
Pruebas antimicóticas	1 mL	0,5 mL

Fuente: Elaboración propia, 2023.

En el estudio de las propiedades organolépticas y fisicoquímicas por parte del aceite esencial extraído, se determinaron características organolépticas como: apariencia, color, olor, solubilidad, masa, volumen, pH y densidad.

**Tabla 22. Propiedades fisicoquímicas del extracto de aceite esencial de las hojas del *P. costaricense***

Propiedades fisicoquímicas	Resultado
Aspecto	Ligero
Textura	Oleoso
Color	Ligero amarillo, transparente
Olor	Menta, canela, lavanda y manzanilla
Solubilidad	No polar. Insoluble en agua
Masa	0,31 g
Volumen	0,5 mL
pH	5
Densidad	0,62 g/mL
Punto de ebullición	93 °C

Fuente: Elaboración propia, 2023.

En la tabla 22 se muestran las propiedades fisicoquímicas por parte del extracto de aceite esencial de las hojas del *P. costaricense*, para el caso de la textura, apariencia, color y olor, se realizó una inspección visual de carácter subjetivo para poder determinar los resultados planteados, en la que se determinó que, en cuanto al aspecto se percibía ligero, con textura oleosa, con un color ligeramente amarillo o transparente y su olor, desprendía similitud con la menta, canela, lavanda y manzanilla.

**Figura 54. Aspecto visual del aceite esencial de las hojas del *P. costaricense***



Fuente: Elaboración propia, 2023.

Mata y Calvo<sup>9</sup>, en su estudio, habían realizado una descripción de las propiedades organolépticas propiamente de las hojas, en el que resaltan su forma ovalada, más largas que anchas; de coloración verde y con un brillo en su superficie; y durante el procedimiento de la hidrodestilación, mencionan que las hojas en presencia de agua y con una temperatura elevada, desprendían un olor similar al del clavo de olor. Lo cual, coincide con lo que indica Hammel y Zamora<sup>1</sup> cuando en su investigación sobre esta especie, analizaron estas mismas características. Ellos mencionan que la forma de las hojas es ovadas-falcadas, suelen ser brillantes en la parte superior cuando está seca y presentan un olor a pimienta y clavo de olor por uno de sus componentes. En este trabajo, al realizar la hidrodestilación, se identificó un olor de clavo de olor, pero también de canela.

La solubilidad, es la propiedad que tiene un líquido o un sólido de incorporarse en un solvente<sup>165</sup>. Esta es una magnitud dependiente de la temperatura y el pH. Para este caso, lo que se realizó fue una prueba de mezclar el agua con el aceite obtenido, por lo que, en cuestión de minutos, se separaron entre sí, lo que significa que por su característica oleosa no es soluble en el agua.

La solubilidad es relacionada con el coeficiente de partición, el cual corresponde a una expresión de la solubilidad de una sustancia en un medio no polar con respecto al medio acuoso y es definido como la relación del fármaco ionizado entre las fases orgánicas y acuoso en equilibrio, es decir, entre más es la lipofilia de una combinación mayor, será su capacidad de incorporarse a las membranas lipofílicas del organismo. Esta propiedad se determina mediante el método de agitación en matraz, en la cual, se disuelve una cantidad de un soluto o sustancia de interés en un volumen de n-octanol saturado con agua, se le hace una partición en un embudo de separación, con agua saturada con n-octanol y se determina la relación entre la concentración en ambas fases para determinar su afinidad. En este caso, no se realizó esta prueba, pero se podría creer que el mismo tendría un Log P positivo, la cual no es soluble en agua, ya que en esta prueba se esperaría ser más soluble al n-octanol por su mayor naturaleza hidrófoba<sup>168</sup>.

Para obtener el resultado de la densidad, se debió pesar por medio de una balanza granataria la masa correspondiente al aceite esencial disponible y destinado para estas pruebas y, a su vez, medir el volumen del mismo por medio de una probeta. Una vez

identificados estos datos, se procedió a realizar el cálculo pertinente para la determinación de la densidad del aceite de la siguiente manera:

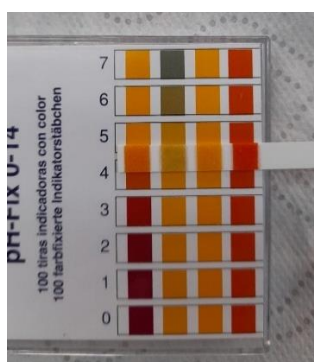
$$Densidad = \frac{Masa (g)}{Volumen (mL)}$$

$$Densidad = \frac{0,31 (g)}{0,5 (mL)}$$

$$Densidad = 0,62 g/mL$$

El pH, es una medida de la concentración o actividad de iones de hidrógeno en una solución. Para determinar el pH del aceite esencial se utilizaron tiras de pH, las cuales por medio de colores y una referencia de la misma, permite identificar el valor de pH entre 0 a 14, en este caso, de 0 y menor a 7 corresponde a un medio ácido, mientras que un valor mayor a 7 a 14, un medio básico. Si el resultado corresponde a 7, se está frente a un pH neutro<sup>169</sup>. En este caso, el aceite esencial de las hojas presentó un pH de 5.

**Figura 55. Determinación del pH del aceite esencial de las hojas del *P.costaricense***



Fuente: Elaboración propia, 2023.

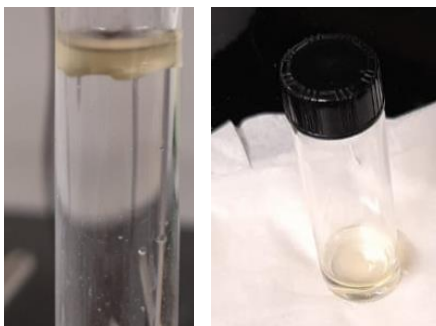
De la misma manera que se realizó la identificación de las propiedades fisicoquímicas del extracto de aceite esencial de las hojas del *P. costaricense*, se hizo para el de los frutos, así como se muestra en la tabla 23.

**Tabla 23. Propiedades y fisicoquímicas del extracto de aceite esencial de los frutos del *P. costaricense***

<b>Propiedades fisicoquímicas</b>	<b>Resultado</b>
Aspecto	Ligero
Textura	Oleoso
Color	Amarillo
Olor	Hierbas naturales
Solubilidad	No polar. Insoluble en agua
Masa	0,39 g
Volumen	0,5 mL
pH	4
Densidad	0,78
Punto de ebullición	93 °C

Fuente: Elaboración propia, 2023.

**Figura 56. Aspecto visual del aceite esencial de los frutos del *P.costaricense***



Fuente: Elaboración propia, 2023.

Para obtener el resultado de la densidad, se debió pesar por medio de una balanza granataria la masa correspondiente al aceite esencial disponible y destinado para estas pruebas y, a su vez, medir el volumen del mismo por medio de una probeta. Una vez identificados estos datos, se procedió a realizar el cálculo pertinente para la determinación de la densidad del aceite de la siguiente manera:

$$\text{Densidad} = \frac{\text{Masa (g)}}{\text{Volumen (mL)}}$$

$$\text{Densidad} = \frac{0,39 \text{ (g)}}{0,5 \text{ (mL)}}$$

**Figura 57. Determinación del pH del aceite esencial de las hojas del *P.costaricense***



Fuente: Elaboración propia, 2023.

Una vez obtenidos los resultados de ambos extractos de aceites esenciales, se realizó una comparación de ambos, en el que se identifica que ambos aceites esenciales comparten propiedades fisicoquímicas, como se muestra en la tabla 24. Sin embargo, la densidad es ligeramente diferente por 0,08 g, siendo el de los frutos el de mayor valor. Cabe recalcar, que a pesar de utilizar una cantidad pequeña de volumen de aceite esencial, esta es una característica intrínseca de la materia, lo cual hace referencia a que es independiente de la masa o volumen que tenga el objeto hecho de ese material, la densidad siempre se mantendrá constante<sup>170</sup>.

**Tabla 24. Comparación de las propiedades fisicoquímicas del extracto de aceite esencial de las hojas y frutos del *P. costaricense***

Propiedad fisicoquímica	Hojas	Frutos
Apariencia	Ligero	Ligero
Textura	Oleoso	Oleoso
Color	Ligero amarillo, transparente	Amarillo
Olor	Menta, canela, lavanda y manzanilla	Hierbas naturales

Solubilidad	No polar. Insoluble en agua	No polar. Insoluble en agua
Masa	0,31 g	0,39 g
Volumen	0,5 mL	0,5 mL
pH	5	4
Densidad	0,62 g/mL	0,78 g/mL
Punto de ebullición	93°C	93°C

Fuente: Elaboración propia, 2023.

Al tener conocimiento de estas propiedades fisicoquímicas, será de utilidad para la elaboración de futuros posibles productos farmacéuticos a partir de este aceite esencial. Esto debido que las características como la apariencia, textura, color y olor son útiles para la identificación, control de calidad, conocer su estabilidad física, seguridad y aceptabilidad del paciente. En el caso de la solubilidad, tener conocimiento previo sobre el comportamiento hidrofílico o hidrofóbico del principio activo o sustancia activa permite identificar las posibles incompatibilidades con otros excipientes que formarán parte tanto del proceso de elaboración como del producto final; además, del posible accionar farmacocinético y biofarmacéutico, ya que la solubilidad forma parte de los criterios del Sistema de Clasificación Farmacéutica<sup>171</sup>.

La masa y el volumen son de importancia en las preformulaciones debido a que al conocerla hace que se pueda calcular una dosificación precisa y correcta. La densidad, es útil para el diseño de formas farmacéuticas líquidas homogéneas y para el cálculo de dosis necesaria para una precisión y efectividad. El pH se considera uno de los factores críticos para los medicamentos o sustancias activas que se encuentran en formas principalmente líquidas, debido a que puede verse afectada la solubilidad, la estabilidad del producto o la compatibilidad con los demás componentes de la forma farmacéutica que se formule. Y el punto de ebullición se debe conocer para la selección de los demás excipientes de la formulación, para identificar el proceso de fabricación más adecuado y para mantener una estabilidad tanto de la sustancia activa como del producto final<sup>171</sup>.

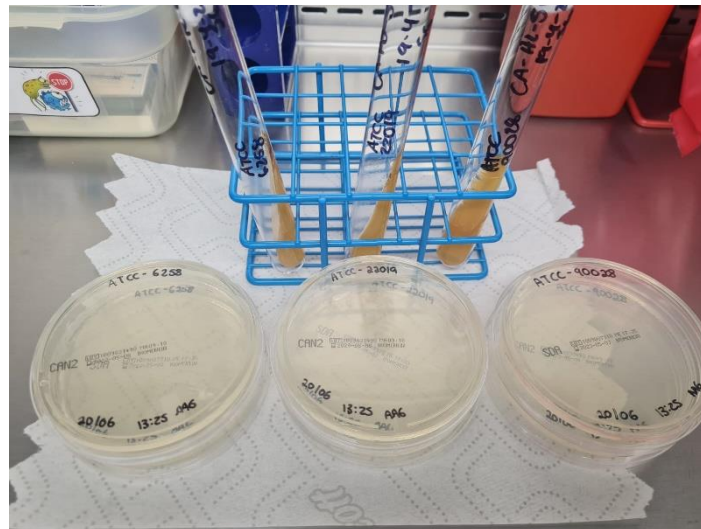
#### **4.4 Cuarto objetivo específico: Evaluar las posibles aplicaciones terapéuticas del extracto de las hojas y de los frutos mediante pruebas antimicóticas.**

El propósito de este objetivo fue evaluar si la especie *P. costaricense* presentaba actividad antimicótica y comparar el comportamiento *in vitro* del aceite esencial de sus hojas y frutos ante las cepas de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Candida krusei*. Se propuso identificar esto debido a que, de acuerdo con la literatura, se conoce el efecto antimicótico de las hojas, sin embargo, no existe estudio sobre los frutos; además, de que en ensayos previos como el de Treyvaud et al.<sup>5</sup>, testearon en *Candida albicans*, *Candida shehatae*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Wangiella dermatitidis*, *Pseudallescheria boydii*. Se quiso ampliar conocimiento sobre otras especies de *Candida*, el cual es común y de los que tienen porcentaje alto de causar enfermedades micóticas en la población<sup>6</sup>.

El procedimiento realizado y explicado en el punto 3.10.7, se tomó como base los conocimientos brindados por la técnica de laboratorio Andreina Angulo Guerrero, del Laboratorio Clínico y Banco de Sangre de la UCR; y del estudio realizado por Mendoza et al.<sup>116</sup>, por lo que se decidió utilizar el método de difusión en agar. Treyvaud et al.<sup>5</sup> describieron el comportamiento de las cepas mencionadas anteriormente por medio de identificar la concentración mínima inhibitoria, en la que utilizaban diferentes concentraciones de los compuestos y calcularon la concentración inhibitoria fraccional.

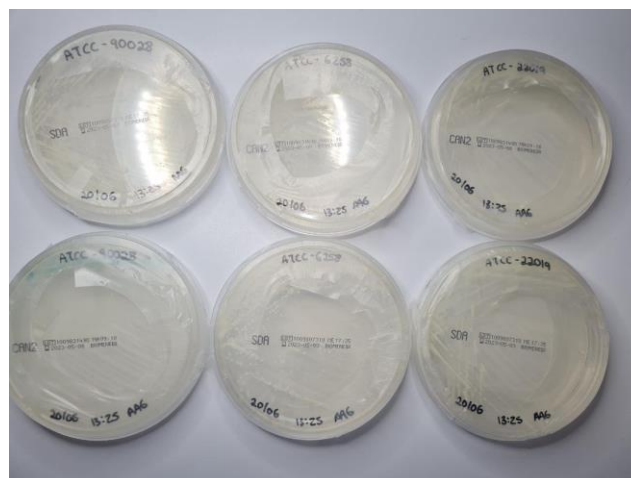
En este caso, para el método de difusión en agar, las cepas se deben reproducir en un medio diferente al de las pruebas de sensibilidad, por lo que las cepas que se aprecian en la figura 18, se colocaron en un agar, como se visualiza en la figura 58. Se dejaron en la incubadora a una temperatura aproximada a 33,7°C-34,0°C. Estas mismas fueron revisadas al pasar las 24 horas, para verificar su crecimiento, así como se muestra en la figura 59 y 60. Y el medio cromogénico, el cual permite visualizar mejor su crecimiento se aprecia en la figura 61.

**Figura 58. Reproducción de las cepas de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*.**



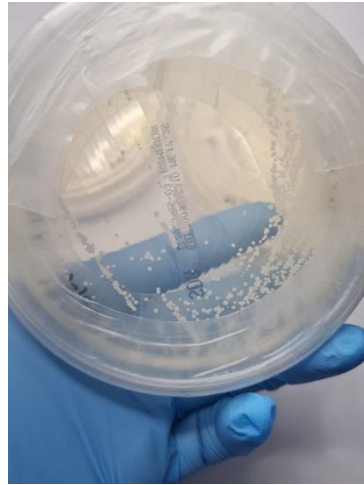
Fuente: Elaboración propia, 2023.

**Figura 59. Crecimiento de cepas de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* a las 24 horas**



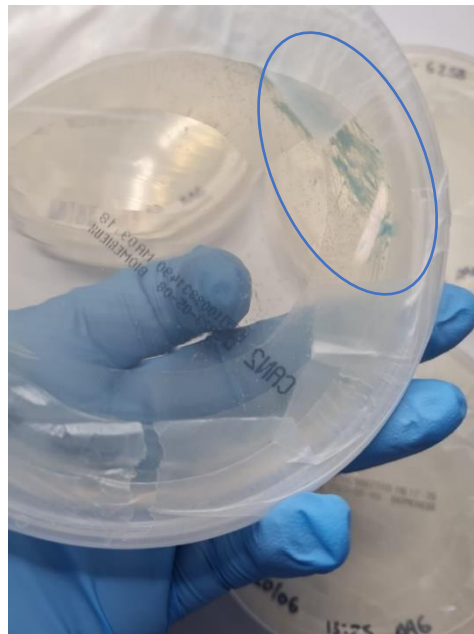
Fuente: Elaboración propia, 2023.

**Figura 60. Vista más de cerca del crecimiento de cepas de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* a las 24 horas**



Fuente: Elaboración propia, 2023.

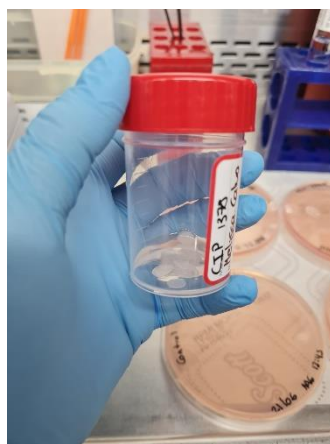
**Figura 61. Crecimiento de cepas a las 24 horas en el medio cromogénico**



Fuente: Elaboración propia, 2023.

Una vez tenido el crecimiento correcto de los agares de crecimiento de las cepas, se utilizó la luz ultravioleta por 10 minutos para esterilizar los discos que se utilizaron. Se colocaron los discos en 1 mL de aceite esencial de las hojas y 0,5 mL de los frutos, así como se muestra en la figura 62. Simultáneamente se preparó la solución McFarland y se realizó el rayado en agares nuevos para la prueba de sensibilidad y el control; se agregaron los discos impregnados con el aceite, utilizando pinzas estériles para su aplicación. En el caso de las hojas, debido a la cantidad de aceite disponible para estas pruebas, se colocaron 4 discos; y en el caso de los frutos, 2 de ellos.

**Figura 62. Contacto de los discos con el aceite esencial de las hojas del *P. costaricense***



Fuente: Elaboración propia, 2023.

**Figura 63. Lectura inicial a las 0 horas de la prueba antimicótica del aceite esencial de las hojas del *P. costaricense***



Fuente: Elaboración propia, 2023.

**Tabla 25. Lectura a las 24 horas y 48 horas de la prueba antimicótica del aceite esencial de las hojas y frutos del *P. costaricense***

<b>Aceite esencial de hojas del <i>P.costaricense</i></b>		
<b>Cepa</b>	<b>Tiempo de lectura</b>	<b>Medición del halo</b>
ATCC 90028 <i>Candida albicans</i>	0 horas	0 mm
	24 horas	3 mm
	48 horas	3 mm
ATCC 6258 <i>Candida krusei</i>	0 horas	0 mm
	24 horas	5 mm
	48 horas	5 mm
ATCC 22019 <i>Candida parapsilosis</i>	0 horas	0 mm
	24 horas	5 mm
	48 horas	5 mm
<b>Aceite esencial de frutos del <i>P.costaricense</i></b>		
ATCC 90028 <i>Candida albicans</i>	0 horas	0 mm
	24 horas	0,5 cm
	48 horas	0,5 cm
ATCC 6258 <i>Candida krusei</i>	0 horas	0 mm
	24 horas	1,5 cm
	48 horas	1,5 cm
ATCC 22019 <i>Candida parapsilosis</i>	0 horas	0 mm
	24 horas	0 mm
	48 horas	1,5 cm

Fuente: Elaboración propia, 2023.

**Figura 64. Lectura a las 24 horas de la prueba antimicótica del aceite esencial de las hojas del *P. costaricense***

**a. ATCC 90028**



a.1



a.2



a.3



a.4

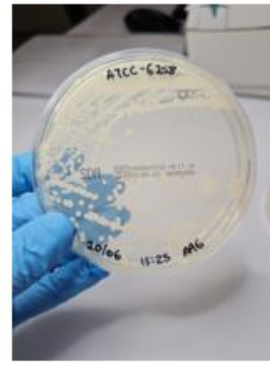
**b. ATCC 6258**



b.1



b.2



b.3



b.4

**c. ATCC 22019**



c.1



c.2



c.3



c.4

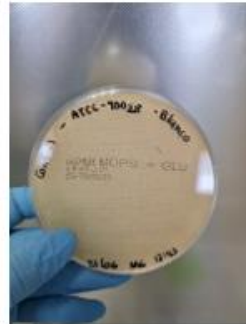
Fuente: Elaboración propia, 2023.

**Figura 65. Lectura a las 48 horas de la prueba antimicótica del aceite esencial de las hojas del *P. costaricense***

a. ATCC 90028



a.1



a.2

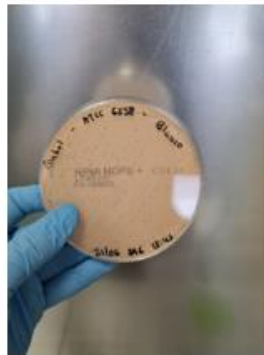


a.3

b. ATCC 6258



b.1



b.2



b.3

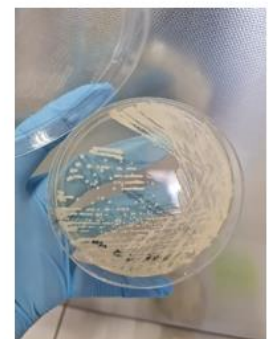
c. ATCC 22019



c.1



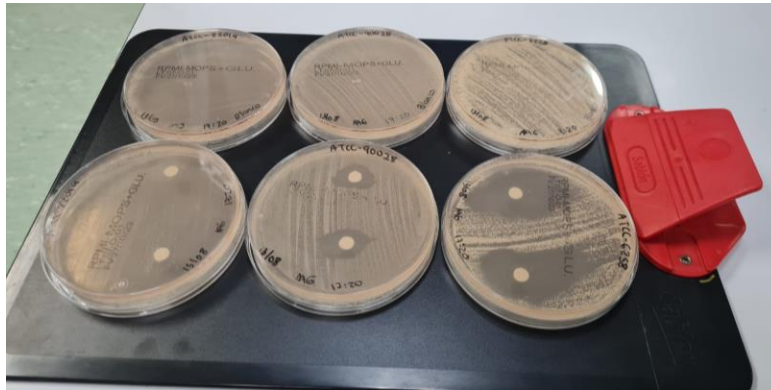
c.2



c.3

Fuente: Elaboración propia, 2023.

**Figura 66. Lectura a las 24 horas de la prueba antimicótica del aceite esencial de los frutos del *P. costaricense***



Fuente: Elaboración propia, 2023.

**Figura 67. Lectura a las 48 horas de la prueba antimicótica del aceite esencial de los frutos del *P. costaricense***



Fuente: Elaboración propia, 2023.

En la tabla 25, se anotaron los resultados obtenidos por ambos aceites esenciales del *P. costaricense*. Se realizaron lecturas a tiempo 0 horas, 24 horas y 48 horas, en las cuales, se evidenció que la especie sí presenta actividad antimicótica. En este caso, no se realizó una cuantificación de la concentración que se le estaba agregando a cada uno de los discos, sin embargo, de forma cualitativa se visualiza en la figura 64 y 65 que para el caso de las hojas, se tuvo un halo de inhibición en los dos tiempos de 24 y 48 horas, obteniendo para el caso del ATCC 90028 *Candida albicans* 3 mm de halo de inhibición, para ATCC 6258 *Candida*

*krusei* 5 mm y para ATCC 22019 *Candida parapsilosis* 5 mm. En este caso, el aceite esencial de las hojas tuvo mayor efecto para las dos últimas cepas mencionadas.

En la figura 64, se aprecia el comportamiento de las cepas y la actividad del aceite esencial en cada una de ellas en la lectura de las 24 horas. En la fila 1, se identifican los discos y el desplazamiento que genera sobre las *Candidas*; en el caso de la fila 2, se observan los blancos; en la 3, los repliques de cada una de las cepas; y en la 4, los medios cromogénicos. En este último, el medio cromogénico, la *Candida albicans* presenta una coloración azulada; mientras que en el caso de las dos cepas restantes, fueron blancas. Los medios cromogénicos diferenciales permiten aislar e identificar las levaduras de una muestra, esto va a verse influenciado por la actividad enzimática o bioquímica de cada una del tipo de hongo, por ejemplo, la *Candida albicans* se torna de color azul, posiblemente a que esta produce una enzima beta-glucosidasa, que descompone ciertos glucósidos presentes en el medio cromogénico, haciendo que esta reacción libere productos que reaccionan con indicadores químicos del medio para producir un color azul o verdoso; sin embargo, pueden ser por otras más enzimas, como la fosfatasa ácida y demás<sup>172</sup>.

En el caso de los frutos, en la tabla 26 se especifican los resultados obtenidos, en los que para el ATCC 90028 *Candida albicans* y ATCC 6258 *Candida krusei* se observó actividad antimicótica a las 24 y 48 horas, como se muestra en la figura 66, obteniendo respectivamente, una medición del halo de inhibición de 0,5 cm y 1,5 cm. El ATCC 22019 *Candida parapsilosis* se pudo determinar su medición hasta las 48 horas debido que a las 24 horas, no había tenido crecimiento y tampoco en el control, sin embargo en su segunda lectura, se identificó un halo de inhibición de 1,5 cm, como se aprecia en la figura 67.

Si se realiza una comparación entre los aceites esenciales de cada parte de la especie, se identifica que ante las 3 cepas, ambos frente a la *Candida albicans* obtuvieron un halo de inhibición menor en comparación a las otras dos levaduras. Además, en ambos casos, se tuvo un comportamiento antimicótico similar ante la ATCC 6258 *Candida krusei* y ATCC 22019 *Candida parapsilosis*, es decir, de forma individual la medición del halo de inhibición para hojas, sobre estas dos especies fue la misma, un valor de 5mm; y ocurrió igual para el de los frutos con 1,5 cm.

Entre los dos aceites esenciales, el que tuvo mayor actividad antimicótica correspondió a la extracción de los frutos, esto debido a que, al identificar sus halos de inhibición, en el caso de las hojas la unidad en que se midió fue en milímetros, mientras que en el caso de los frutos, en centímetros. Los frutos, en este caso, son los que presentan mayor actividad antimicótica, esto posiblemente porque presentan metabolitos con mayor actividad antimicótica que los que presenta el de hojas, en cuanto a cantidad o ya sea porque contienen diferentes compuestos; para poder determinar esto, se recomienda hacer aislamientos y cuantificar cada uno de los metabolitos por medio de un HPLC para poder identificar realmente a qué se debe este comportamiento.

Lo anterior, es de interés debido a que, anteriormente, solo se habían estudiado las hojas y corteza, no obstante, Pillco, López, Álvarez-Alcázar y Whitworth<sup>7</sup>, realizaron un estudio en Perú en el que detectaron cinco animales mamíferos que se alimentaban de los frutos del *P. costaricense* y uno de ellos, el cual correspondía a un primate, utilizaba la especie para medicina tópica. Y tomando como base, el estudio de Treyvaud, et al.<sup>5</sup> que es un análisis a partir de las hojas y corteza de la especie, indican que los compuestos cinnamodial y cinnamosmolida son las sustancias extraídas que muestran actividad contra varias especies de hongos, entre estas incluida el *Candida albicans*. También mencionan que las sustancias parritadial y pleodendiona muestran actividades débiles.

El cinnamodial y cinnamosmolida, además del *Candida albicans*, tienen una alta actividad contra *Alternaria alternate*. El compuesto cinnamosmolida en el estudio elaborado por Treyvaud, et al.<sup>5</sup>, mostró tener actividades antifúngicas menos potentes que cinnamodial, sin embargo, fue más efectivo contra *C. albicans*. Además de su uso antimicótico, las plantas que pertenecen a la familia Canellaceae, como el *P. costaricense*, se caracterizan por tener una gran cantidad de sesquiterpenos del tipo drimano en sus cortezas, hojas y raíces, presentan propiedades antifúngicas, antibacterianas y antivirales; además, se usan comúnmente, según Alfaro, et al.<sup>173</sup>, como remedios tradicionales para efectos tóxicos en plagas de insectos. En el caso del metabolito cinnamodial, ha tenido evidencia de que es uno de los principales impulsores de la actividad adulticida; sin embargo, también presenta actividad larvicida junto con la cinnamosmolida y el poligodial.

El modo de acción de los sesquiterpenos escasamente se conoce, pero los dialdehídos como el poligodial provoca una alteración estructural de las membranas celulares de los hongos, que puede deberse a una inhibición de la membrana plasmática H<sup>+</sup>-ATPasa. Y su mayor actividad podría ocasionarse a un equilibrio entre la hidrofilia de la subunidad de aldehído insaturado y la hidrofobicidad de las porciones decalinas de la molécula. El mukaadial no posee este equilibrio debido a su mayor hidrofilia y por esta razón es inactivo<sup>5</sup>.

Además, determinar cuál aceite esencial presentaba mayor actividad se deseaba conocer para ampliar los conocimientos, con la finalidad de realizar una propuesta de un producto farmacéutico de origen natural de posible interés comercial, el cual su fórmula cuali-cuantitativa se detalla en la tabla 26.

**Tabla 26. Fórmula cuali-cuantitativa de la propuesta de producto farmacéutico a base del aceite esencial del *P.costaricense* para un lote de 6 cremas**

Excipiente	Cantidad por lote (g)	Cantidad unitaria (g)
Vaselina sólida	31,5	5,25
Lanolina	18	3
Alcohol cetílico	4,5	0,75
Emulgade	15	2,5
Aceite mineral	19	3,16
Aceite esencial	0,3	0,05
Esencia	3 gotas	0,5 gotas
Agua	90,5	15,08
Borato de sodio	1,2	0,2
Total	180	30

Fuente: Elaboración propia, 2023.

En el proceso de llenado, como se muestra en la figura 68, se realizó con una jeringa y no se llenó por completo para que de esta manera no se saturara y no existieran posibilidades de que el producto se vierta.

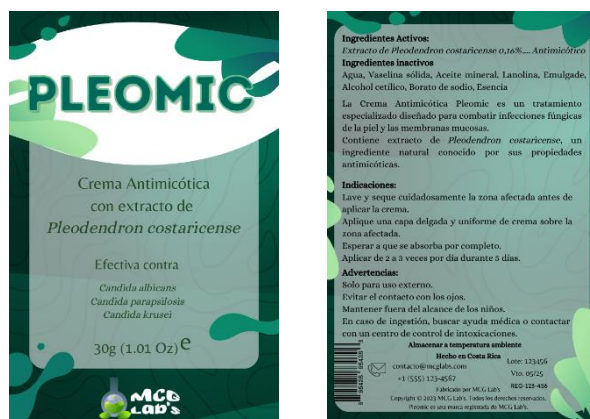
**Figura 68. Proceso de llenado del envase del producto**



Fuente: Elaboración propia, 2023.

Se realizó una etiqueta para el empaque primario, el cual cumple con los lineamientos brindados por el RTCA de etiquetado de productos naturales<sup>174</sup>, la misma se puede visualizar en la figura 69.

**Figura 69. Etiqueta de la propuesta de producto natural**



Fuente: Elaboración propia, 2023.

Se realizó la prueba de pH y de peso promedio. Para el caso del pH, como se aprecia en la figura 70, se obtuvo un valor de 5, lo cual se considera adecuado ya que lo recomendado para cremas es de 5,5-7 de manera general, para piel grasa de 4,9-5, piel normal 5,2-5,5 y piel seca de 5,7 a 5,9<sup>175</sup>. El peso promedio fue de 29,81 g, por lo que se reporta para cada uno

de las cremas, un peso de 30 gramos, lo que corresponde a 1,01 onzas. Esto a partir de un lote de 6 envases, en el que el total correspondía a 180 gramos.

**Figura 70. Prueba de pH a propuesta de producto farmacéutico**



Fuente: Elaboración propia, 2023.

**Tabla 27. Resultados de prueba de peso promedio de la propuesta del producto farmacéutico**

Número de envase	Peso del producto
1	29,31
2	30,25
3	29,53
4	30,45
5	29,73
6	29,58
Peso promedio	29,81

Fuente: Elaboración propia, 2023.

## **CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## 5.1 Conclusiones

Con respecto al objetivo 1: “**Realizar la extracción del aceite esencial de las hojas y frutos del *Pleodendron costaricense* por el método de hidrodestilación.**”, se concluye que:

- Se identificó que el extracto del aceite esencial en estudio correspondía posiblemente a lo que se considera como un aceite ligero, esto por las pruebas realizadas en el proceso del uso de arrastre por vapor en el que, en el paso de evaporización del agua y del uso del rotavapor, se volatilizaba al instante mientras que el solvente utilizado en la decantación era el que se esperaba eliminar para obtener solo el aceite.
- A partir de los resultados y la información analizada en el proceso, se determina que el método más adecuado para extraer este aceite esencial correspondiente al *P. costaricense* es el de hidrodestilación, esto debido a que es un proceso más rápido, implica menos cantidad de pasos y menos reactivos; se obtiene mayor cantidad de aceite en menos tiempo, es fácilmente identificable ya que por el uso del cleveger al separarse las fases se aprecia de manera sencilla; y por el uso de esta trampa, hace que sea más eficiente y con pocas pérdidas, comparado con el arrastre por vapor.
- Se evidenció a partir de referencias bibliográficas y a lo experimental, que al utilizar máquinas más grandes, se acelera el proceso y hay un mejor control de las mismas, además de que siempre se debe realizar el secado pertinente previo al uso del IR o CG para evitar señales o lecturas incorrectas del espectro. Y también, de la importancia de conservar el aceite esencial obtenido en recipientes ámbar para proteger a metabolitos que pueden ser fotosensibles.

Con respecto al objetivo 2: “**Identificar los posibles metabolitos secundarios presentes en el extracto del aceite esencial de las hojas y frutos del *Pleodendron costaricense* por medio de pruebas cualitativas, uso del espectrofotómetro IR y cromatografía de gases acoplada a detector de masas.**”, se concluye que:

- Se obtuvo un resultado positivo para la prueba cualitativa de vainillina-ácido sulfúrico, lo que permitió identificar que en el aceite esencial tanto de hojas como de frutos del *P. costaricense*, existe la presencia de sesquiterpenos.

- Se identificó, por medio de un análisis de espectro IR y tomando como base la estructura del alfa-pineno, los posibles grupos funcionales como el =C-H, -C-H, C=C, C-H<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> para el caso de las hojas; mientras que con los frutos se señalaron los mismos grupos funcionales pero con dos picos adicionales, los cuales pueden corresponder a partes de la estructura del linalool, cinnamodial, cinnamosmolida, polygodial, mukaadial, parritadial como lo es el grupo hidroxilo y el alqueno cíclico.
- Se mostraron los porcentajes de similitud obtenida en el cromatograma brindado por el equipo de CG-MS, en el que se determinó que para el caso de las dos partes de la planta, coinciden con la literatura en cuanto sus componentes principales así como lo es el 1R-alfa-pineno, alfa-pineno, beta-pineno, cariofileno; y se conoció sobre otros tres componentes que no se mencionan en estudios previos, pero que en esta investigación tuvieron significancia porcentual de similitud, así como lo es el alfa-cubebeno para ambas partes; el copaeno en el caso de las hojas y el canfeno en frutos.

Con respecto al objetivo 3: “**Comparar las propiedades fisicoquímicas del aceite esencial de las hojas y frutos del *Pleodendron costaricense*.**”, se concluye que:

- Se compararon las propiedades fisicoquímicas del aceite esencial de las hojas y frutos de la especie, en la que se identificó que entre sí tenían características similares en cuanto a la apariencia, textura, color, olor y solubilidad.
- Se identificó que la diferencia entre cada uno de los aceites correspondió a su densidad, por una diferencia de 0,08 gramos, siendo el aceite de los frutos el de mayor valor.
- Se mostró la importancia de conocer sobre estas propiedades fisicoquímicas para el posible desarrollo de futuros productos farmacéuticos, ya que permiten identificar las sustancias activas, conocer sobre su estabilidad, la esperable aceptabilidad del paciente, compatibilidades con excipientes y dosificar de forma adecuada el producto.

Con respecto al objetivo 4: “**Evaluar las posibles aplicaciones terapéuticas del extracto de las hojas y de los frutos mediante pruebas antimicóticas.**”, se concluye que:

- Se evaluó la actividad antimicótica de los aceites esenciales de las hojas y de los frutos del *P.costaricense* por medio de agares de sensibilidad, en los frutos se obtuvo

halos de inhibición con unidades de centímetros, mientras que en las hojas con unidades de milímetros, por lo que se identifica que el que tiene mayor actividad antimicótica corresponde al de los frutos.

- Se evidenció que entre las tres cepas de *Candidas* analizadas, en las que los aceites esenciales tuvieron mayor actividad antimicótica fue en la ATCC 6258 *Candida krusei* y ATCC 22019 *Candida parapsilosis* ya que con ellas se obtuvo halos de inhibición de 5 mm en el caso de las hojas y 0,5 cm en el de frutos; mientras que con la *Candida albicans*, respectivamente, se obtuvo 3 mm y 1,5 cm.
- Se identificó que el posible efecto antimicótico se debe a la presencia de sesquiterpenos en la especie, en la que principalmente el cinnamosmolida y cinnamodial podrían ser relevantes. Sin embargo, el árbol al tener numerosos tipos de sesquiterpenos, lo ideal sería realizar el aislamiento de cada una de ellas y probar el procedimiento in vitro realizado en los mismos, así como el estudio de la actividad antimicótica de los metabolitos identificados en el objetivo 2.

## 5.2 Recomendaciones

- Interesados en el análisis de metabolitos presentes del *P. costaricense*: Realizar pruebas sobre aislar, estudiar e identificar por separado cada uno de los metabolitos presentes, con técnicas como el UV, IR, CG, HPLC y descubrir los metabolitos, de forma experimental, que brinda el efecto terapéutico o de lo contrario, identificar si trabajan en sinergia.
- Interesados en la creación del producto farmacéutico propuesto: Realizar las pruebas antimicóticas o antibacterianas tomando en cuenta la cuantificación del extracto de aceite esencial, por medio de HPLC, necesario para poder alcanzar la inhibición mínima de microorganismos. Y realizar distintas técnicas de identificación del efecto terapéutico, así como comparar su rendimiento, de esta manera se tiene más información y se puede identificar cuál es la más viable de realizar.
- Interesados en dar continuidad al trabajo en general: Extraer el aceite esencial por medio de diferentes técnicas de extracción, comparar su rendimiento e identificar metabolitos. Realizar este proceso de diferentes partes de la especie, así como la corteza, las flores o frutos, los cuales no se encuentra información disponible o la misma es muy escasa. Además, realizar pruebas físicas y químicas correspondientes al tipo del producto para validar sus características de calidad y a su vez, validar el método de extracción más adecuado según corresponda.
- COLFAR: Brindar conocimiento, oportunidades de actualización y mejora a los agremiados sobre medicina proveniente de las plantas. Así como, incentivar a los farmacéuticos a proponer sus propios productos e innovar en los mismos, para plantear el uso de las especies presentes en Costa Rica y, a su vez, aprovechar los recursos presentes para posicionarse a nivel internacional.
- Ministerio de Salud: Abrir espacios en conjunto con Universidades o el COLFAR para la educación de estudiantes de farmacia sobre los distintos temas relacionados con asuntos regulatorios, mercadeo, administración y los permisos necesarios para que su producto pueda tener crecimiento en el mercado.
- Universidad Internacional de las Américas: Realizar alianzas con otras Universidades en cuanto al tema de investigación, para que los estudiantes puedan tener distintas

opciones de trabajos experimentales por préstamo de equipo disponible en ellas y viceversa, para que de esta manera se pueda enriquecer el conocimiento científico, alianzas entre las instituciones, tener una constante actualización de los participantes y posicionar a la UIA como parte de las academias de alto calibre reconocida por sus aportes en investigación.

- Estudiantes de farmacia: Aumentar el deseo por la investigación en los diversos temas de interés propio o colectivo, ampliar conocimientos y mostrar lo nuevo a los demás estudiantes o público en general.
- Profesionales en farmacia: Mantenerse actualizados sobre los distintos productos naturales que son nuevos en el mercado, además de recomendar al público interesado en esas nuevas medicinas, las que han sido aprobadas por el Ministerio de Salud.
- Osa Conservation: Establecer acuerdos con las Universidades, para que de esta manera los estudiantes de Farmacia y carreras afines, puedan tener la oportunidad de tener giras o acceso al lugar para que comprendan sobre la manera correcta de recolectar las especies, su cuidado, replicación, almacenamiento y a su vez, la importancia de conservar de manera correcta las especies de Costa Rica, haciendo uso de las mismas para investigación, pero con un uso racional y controlado.

## **CAPÍTULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Hammel B, Zamora N. *Pleodendron costaricense* (Canella Ceae), a new species for Costa Rica. *Lankasteriana*. 2005; 5 (3): 211-218.
2. Kant R, Kumar A. Review on essential oil extraction from aromatic and medicinal plants: Techniques, performance and economic analysis. *Sustain Chem Pharm* [Internet]. 2022 [citado el 31 de enero del 2023]; 30. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100829>
3. Lebanov L, Tedone L, Kaykhaii M. Multidimensional Gas Chromatography in Essential Oil Analysis. Part 2: Application to Characterisation and Identification. *J Sep Sci* [Internet]. 2018 [citado el 31 de enero del 2023]; 82: 399-414. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10337-018-3651-9>
4. Igual M, Martínez J. Physicochemical Properties and Structure Changes of Food Products during Processing. *Foods*.2022; 11 (15): 2365.
5. Treyvaud V, Petit P, Anh Chieu, Núñez R, Sánchez P, Poveda L, Smith M, Thor J, Durst T. Phytochemistry and Antifungal Properties of the Newly Discovered Tree *Pleodendron costaricense*. *J. Nat. Prod*. 2006; 69: 1005-1009.
6. Talapko J, Juzbasic M, Matijevic T, Pustijanac E, Bekic S, Kotris I, Skrlec I. *Candida albicans*-The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. *J. Fungi*. 2021; 7 (2): 79.
7. Pillco R, López M, Álvarez-Alcázar L, Whitworth A. The First Ex-Situ Germination and Dispersal Mechanisms of the Rare, Critically Endangered Tree, *Pleodendron costaricense*. *Trop Conserv Sci* [Internet]. 2022 [citado el 31 de enero del 2023]; 15. DOI: 10.1177/19400829221104572
8. Zimmer E, Suh Y, Karol K. Phylogenetic placement of a recently described taxon of the genus *Pleodendron* (Canallaceae). *Phytologia* [Internet]. 2012 [citado el 31 de enero del 2023]; 94: 404-412. URL: [http://www.phytologia.org/uploads/2/3/4/2/23422706/943404-412zimmerpleodendron--checked\\_over\\_by\\_eaz.pdf](http://www.phytologia.org/uploads/2/3/4/2/23422706/943404-412zimmerpleodendron--checked_over_by_eaz.pdf).
9. Mata M, Calvo M. Preformulación teórica de un producto natural antifúngico a partir de extractos obtenidos de las hojas del árbol *Pleodendron costaricense*. *Revista Ciencia y Salud* [Internet]. 2022 [citado el 11 de febrero del 2023];6(6):83–90.

- Disponible en: <https://revistacienciaysalud.ac.cr/ojs/index.php/cienciaysalud/article/view/554>
10. Jamshidi F, Lorigooini Z y Amini H. Medicinal plants: Past history and future perspective. *J. HerbMed Pharmacol* [Internet]. 2018 [citado el 11 de febrero del 2023]; 7: 1-7. Disponible en: <http://herbmedpharmacol.com/Article/jhp-1198>
  11. García R. Medicina tradicional o complementaria: pacientes que lo usan al mismo tiempo que su tratamiento farmacológico. *Ciencia y Desarrollo* [Internet]. 2019 [citado el 18 de febrero del 2023]; 22(1):25–30. Disponible en: <http://revistas.uap.edu.pe/ojs/index.php/CYD/article/view/1735>.
  12. Food and Drug Administration [Internet]. Estados Unidos; 2017 [consultado el 18 de febrero del 2023]. What is a Botanical Drug? [2 pantallas aprox.] Disponible en: <https://www.fda.gov/aboutfda/center-drug-evaluation-and-research-cder/what-botanicaldrug#:~:text=A%20botanical%20drug%20product%20is,macroscopic%20fungi%2C%20or%20combinations%20thereof>.
  13. Organización Mundial de la Salud [Internet]. Geneva, Suiza; 2021 [Consultado el 18 de febrero del 2023]. Medicina tradicional: definiciones [3 pantallas aprox.]. Disponible en: [https://www.who.int/topics/traditional\\_medicine/definitions/es/](https://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/).
  14. Castiñeira E. Etnobotánica Aplicada a la Conservación en el Parque Regional Quebradas del Norte, Rivera, Uruguay [Tesis de doctorado en Ciencias Naturales]. Buenos Aires, Argentina: Universidad Nacional de la Plata; 2017.
  15. Cussy-Poma V, Fernández E, Rondevaldova J, Foffová H, y Russo D. Inventario etnobotánico de plantas medicinales utilizadas en el distrito de Qampaya, Bolivia. *B LATINOAM CARIBE PL* [Internet]. 2017 [citado el 18 de febrero del 2023]; 16(1): 68-77. Disponible en: <https://blacpma.ms-editions.cl/index.php/blacpma/article/view/156>.
  16. Chaguturu R, Patwardhan B. Drug Discovery Impasse: Pharmacognosy Holds the Key. En: Chaguturu R, Patwardhan B, editores. *Innovative Approaches in Drug Discovery*. 1a ed. Holanda: Elsevier; 2016.

17. Rodríguez Y, Valdés M, Hernández H, Soria S. Guía metodológica para estudio etnobotánico de especies forestales en comunidades amazónicas y afines. *Rev. Cuba. Cienc. For* [Internet]. 2019 [citado el 18 de febrero del 2023]; 7(1): 98-110. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2310-34692019000100098](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-34692019000100098).
18. Peredo S, Barrera C. Usos etnobotánicos, estrategias de acción y transmisión cultural de los recursos vegetales en la región del Maule, zona centro sur de Chile. *B LATINOAM CARIBE PL* [Internet]. 2017 [citado el 18 de febrero del 2023]; 16 (4): 398-409. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85651256005>.
19. Gamarra GZ. Estudio etnobotánico de especies medicinales en tres comunidades asháninkas y su tendencia al deterioro [Tesis de magíster en Recursos Vegetales y Terapéuticos]. Buenos Aires, Argentina: Universidad Nacional de la Plata; 2017.
20. Heneidy S, Waseem M, Bidak L. The ethnobotanical importance and conservation value of native plants in eastern Arabian Peninsula. *Feddes Repert* [Internet]. 2018 [citado el 18 de febrero del 2023]; 128: 105–128.
21. Alberto S. Manual de conocimientos básicos de farmacología. 1a ed. México: Profocie; 2015. Capítulo 1, Conceptos básicos de farmacología; 7-14.
22. Torres V, Castro A. Fitoterapia. *Rev. Act. Clin. Med* [Internet]. 2014 [citado el 11 de febrero del 2023]; 42: 2304-3768. Disponible en: [http://www.revistasbolivianas.ciencia.bo/scielo.php?pid=S2304-37682014000300001&script=sci\\_arttext&tlng=es](http://www.revistasbolivianas.ciencia.bo/scielo.php?pid=S2304-37682014000300001&script=sci_arttext&tlng=es).
23. Enriquez C, del Carmen B. Actualización y fortalecimiento de la enseñanza experimental de las asignaturas: fitoquímica y Farmacognosia y Fitofármacos de la licenciatura en Química Industrial. 2018 [citado el 11 de febrero del 2023]; Disponible en: <http://innovacioneducativa.unam.mx:8080/jspui/handle/123456789/7035>.
24. Elsevier Connect [Internet]. España: Equipo Editorial Elsevier; 2015 [consultado el 11 de febrero del 2023]. Hablando sobre fitoterapia [2 pantallas aprox.]. Disponible en: <https://www.elsevier.com/es-es/connect/medicina/hablando-sobre-fitoterapia>.

25. Sofowora A, Ogunbodede E, Onayade A. The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention. *Afr J Tradit Complement Altern Med* [Internet]. 2013 [citado el 11 de febrero del 2023]; 10 (5): 210-229. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24311829/>.
26. Kumar A. Medicinal plants: Future source of new drugs. *Int. J. Herb. Med* [Internet]. 2016 [citado el 11 de febrero del 2023]; 4 (4): 59-64. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/305305647\\_Medicinal\\_plants\\_Future\\_source\\_of\\_new\\_drugs](https://www.researchgate.net/publication/305305647_Medicinal_plants_Future_source_of_new_drugs).
27. Gallegos M. Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *An. Fac. med* [Internet]. 2016 [citado el 11 de febrero del 2023]; 77 (4): 327-332. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1025-55832016000400002&script=sci\\_abstract#:~:text=La%20poblaci%C3%B3n%20rural%20utiliza%20las,atenci%C3%B3n%20de%20los%20'curanderos](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1025-55832016000400002&script=sci_abstract#:~:text=La%20poblaci%C3%B3n%20rural%20utiliza%20las,atenci%C3%B3n%20de%20los%20'curanderos).
28. Gobierno de México [Internet]. México: Secretaría de Salud; 2022 [consultado el 11 de febrero del 2022]. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/medicinas-complementarias-313623#:~:text=Seg%C3%BAn%20la%20OMS%20medicina%20%22complementaria,en%20su%20sistema%20sanitario%20prevaliente>.
29. Garrido R. Acupuntura y dolor. *Rev. Méd. Clín. Las Condes* [Internet]. 2019 [citado el 11 de febrero del 2023]; 30 (6): 487-493. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-medica-clinica-las-condes-202-articulo-acupuntura-y-dolor-S071686401930094X>.
30. González E, Pérez No, Valle R, Ramírez E, Falcón A. La superación en Fitoterapia y Apiterapia: su importancia social como herramientas terapéuticas en la Atención Primaria de Salud. *MediCiego* [Internet]. 2014 [citado el 11 de febrero del 2023]; 20 (2): 1-6. Disponible en: <https://revmediciego.sld.cu/index.php/mediciego/article/view/142/3542>.
31. Ortiz N, Tovar D, Abasolo F, Mazón J. Homeopatía, una alternativa para la acuicultura. *Rev. Médica de Homeopat* [Internet]. 2017 [citado el 11 de febrero del

- 2023]; 10 (1): 18-24. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1888852617300061>.
32. Kanat E, Alp A, Yurtkuran M. Magnetotherapy in hand osteoarthritis: A pilot trial. *Complement Ther Med* [Internet]. 2013 [citado el 11 de febrero del 2023]; 21 (6): 603-608. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096522991300126X>.
33. Li X, Zhang L, Jalal G, Li Z, Wei J, Shen C, Yan P, Zhanng LP, Yan W. Stimulation in primary and secondary metabolism by elevated carbon dioxide alters green tea quality in *Camellia sinensis* L. *Scientific Reports* [Internet]; 2017 [citado el 18 de febrero del 2023]; 7 (7937): 1-12.
34. Zhou S, Ru Y, Tzin V, Jander G. Alteration of Plant Primary Metabolism in Response to Insect Herbivory. *Plant Physiol* [Internet]. 2015 [citado el 11 de febrero del 2023]; 169 (3): 1488-1498. Disponible en: <https://academic.oup.com/plphys/article/169/3/1488/6113875?login=false>.
35. Sierra M, Barros R, Gómez D, Mejía A, Suarez D. *Productos Naturales: Metabolitos Secundarios y Aceites Esenciales* [Internet]. Bogotá, Colombia: Creative Commons; 2018 [consultado el 18 de febrero del 2023]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/329197168\\_PRODUCTOS\\_NATURALE\\_S\\_METABOLITOS\\_SECUNDARIOS\\_Y\\_ACEITES\\_ESENCIALES](https://www.researchgate.net/publication/329197168_PRODUCTOS_NATURALE_S_METABOLITOS_SECUNDARIOS_Y_ACEITES_ESENCIALES).
36. Bhattacharya A. *Effect of high temperature on crop productivity and metabolism of macro molecules*. 1a ed. India: Academic Press; 2019.
37. Dhifi W, Bellili S, Jazi S, Bahloul N, Mnif W. Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. *Medicines* [Internet]. 2016 [citado el 18 de febrero del 2023]; 3 (4): 25. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28930135/>.
38. Assuncao J, Karin R, Alves E, Losada M. Phytochemical aspects and biological activities of essentialoil of species of the family Canellaceae: A review. *Plant Sci. Today* [Internet]. 2019 [citado el 18 de febrero del 2023]; 6 (3): 315-320. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/334548033\\_Phytochemical\\_aspects\\_and\\_](https://www.researchgate.net/publication/334548033_Phytochemical_aspects_and_)

biological\_activities\_of\_essential\_oil\_of\_species\_of\_the\_family\_Canellaceae\_A\_review.

39. Ali B, Al-Wabel N, Shams S, Ahamad A, Alam S, Anwar F. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. *Asian Pac. J. Trop. Biomed* [Internet]. 2015 [citado el 18 de febrero del 2023]; 5 (8): 601-611. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2221169115001033>.
40. Zuzarte M, Salgueiro L. *Bioactive Essential Oils and Cancer: Essential Oils Chemistry* [Internet]. 1a ed. Suiza: Springer Nature; 2015 [consultado el 18 de febrero del 2023]. Disponible en: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-319-19144-7>.
41. Tongnuanchan P, Benjakul S. *Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation*. *J. Food Sci* [Internet]. 2014 [citado el 18 de febrero del 2023]; 79 (7): 1231-1249. Disponible en: <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1750-3841.12492>.
42. Ribeiro R, Andrade M, Ramos de Melo N, Sanches A. Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. *Trends Food Sci. Technol* [Internet]. 2017 [citado el 18 de febrero del 2023]; 61: 132-140. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224416303521>.
43. Ríos J. Chapter 1- Essential Oils: What They Are and How the Terms Are Used and Defined. *Essent. Oils in Food Preserv., Flavor and Saf* [Internet]. 2016 [citado el 18 de febrero del 2023]; 3-10. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124166417000018?via%3Dihub>.
44. Turek C, Stintzing F. Stability of Essential Oils: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf* [Internet]. 2013 [citado el 18 de febrero del 2023]; 12 (1): 40-53. Disponible en: <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1541-4337.12006>.
45. Wade LG. *Química orgánica*. 7a ed. México: Pearson educación; 2012.
46. PubChem. Acetaldehyde. Nih.gov [Internet]. 2020 [citado el 18 de febrero del 2023]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetaldehyde>.
47. PubChem. Acetone. Nih.gov [Internet]. 2020 [citado el 18 de febrero del 2023]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetone>.

48. PubChem. Diethyl ether. Nih.gov [Internet]. 2020 [citado el 18 de febrero del 2023]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diethyl-Ether>.
49. PubChem. Phenol. Nih.gov [Internet]. 2020 [citado el 18 de febrero del 2023]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenol>.
50. Olivas-Aguirre F. Hydrolyzable tannins: biochemistry, nutritional and analytical aspects and health effects. *Nutr. Hosp.* [Internet]. 2015 [citado el 18 de febrero del 2023]; 31 (1): 55-66. Disponible en: [https://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0212-16112015000100005&script=sci\\_abstract&tlng=en](https://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0212-16112015000100005&script=sci_abstract&tlng=en).
51. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci* [Internet]. 2016 [citado el 18 de febrero del 2023]; 5 (47). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5465813/#:~:text=Flavonoids%2C%20a%20group%20of%20natural,the%20ingredients%20so%20called%20flavonoids>.
52. Ullah A, Munir S, Lal S, Khan N, Ghani L, Gabriel B, Abdul-Hamid E, Jaremko M. Important Flavonoids and their role as a therapeutic agent. *Molecules* [Internet]. 2020 [citado el 18 de febrero del 2023]; 25 (22): 5243. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7697716/#:~:text=Flavonoids%20are%20phytochemical%20compounds%20present,%20inflammatory%2C%20and%20antiviral%20properties>.
53. Abu-Izneid T, Rauf A, Shariati MA, Khalil AA, Imran M, Rebezov M, Uddin MS. Sesquiterpenes and their derivatives-natural anticancer compounds: An update. *Pharmacol Res* [Internet]. 2020 [citado el 18 de febrero del 2023]; 161: 105165. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32835868/#:~:text=Sesquiterpenes%20and%20their%20allied%20derivatives,have%20been%20documented%20to%20date>.
54. Zielinska-Blajet M, Feder-Kubis J. Monoterpenes and Their Derivatives—Recent Development in Biological and Medical Applications. *Int. J. Mol. Sci* [Internet]. 2020 [citado el 18 de febrero del 2023]; 21(19):7078. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32992914/>.

55. Pontes I, Sousa MV, Jacometti N. An Overview of Biotransformation and Toxicity of Diterpenes. *Molecules* [Internet]. 2018 [citado el 18 de febrero del 2023]; 23(6):1387. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/325657535\\_An\\_Overview\\_of\\_Biotransformation\\_and\\_Toxicity\\_of\\_Diterpenes](https://www.researchgate.net/publication/325657535_An_Overview_of_Biotransformation_and_Toxicity_of_Diterpenes).
56. Bhardwaj A, Misra K. *Ganoderma sp.: The Royal Mushroom for High-Altitude Ailments*. London: Academic Press; 2018.
57. Del Río L. Estudio de preformulación para el desarrollo de comprimidos de indometacina como sustancia policristalina. *Ars Pharm* [Internet]. 2013 [citado el 18 de febrero del 2023]; 43(1-2):147-71. Disponible en: <https://revistaseug.ugr.es/index.php/ars/article/view/5679>.
58. Raguso RA. Wake Up and Smell the Roses: The Ecology and Evolution of Floral Scent. *Annu Rev Ecol Evol Syst* [Internet]. 2008 [citado el 18 de febrero del 2023]; 39:549–569. Disponible en: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095601>
59. Gomez C, Drewnowski A. Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2000 [citado el 18 de febrero del 2023]; 72 (6):1424–1435.
60. Centro Español de Metrología [Internet]. Madrid, España: Centro Español de Metrología; 2021 [consultado el 18 de febrero del 2023]. El Sistema Internacional de Unidades, SI [4 pantallas aprox.]. Disponible en: <https://www.cem.es/es/cem/metrologia/sistema-internacional-unidades-si#:~:text=Las%20siete%20unidades%20b%C3%A1sicas%20del,productos%20de%20potencias%20de%20estas>.
61. Fernández-Mazarambroz BC. *Nuevas tendencias en la predicción de la estabilidad de medicamentos* [Tesis de grado en Farmacia]. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid; 2017.

62. Amela J, Valero E. Estudios de preformulación. En: Salazar R. Gestión de la Calidad en el Desarrollo y Fabricación Industrial de Medicamentos. Barcelona, España: Glatt LaborTecnica; 2001. 95–160.
63. Saldarriaga J, Pablos A, Aguayo A, Aguado R, Olazar M. Determinación de la densidad de partícula mediante porosimetría de mercurio para el estudio fluidodinámico de biomasa en lechos móviles. *Acta [Internet]*. 2014 [citado el 18 de febrero del 2023]; 5 (2): 63-71. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/3236/323631115005.pdf>.
64. Cardona LF. Cálculo de la viscosidad de hidrocarburos a partir de la ecuación cúbica de estado de Jarrhian-Heidaryan. *Rev. Mex. Ing. Quim [Internet]*. 2016 [citado el 18 de febrero del 2023]; 15 (3): 1019-1025. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/620/62048168030.pdf>.
65. Canela M. Potencial de Hidrogeniones-pH. *Rev. Act. Clin. Med [Internet]*. 2014 [citado el 18 de febrero del 2023]; 40 (40): 2076-2082. Disponible en: [http://www.revistasbolivianas.ciencia.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2304-37682014000100001&lng=es&nrm=iso](http://www.revistasbolivianas.ciencia.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-37682014000100001&lng=es&nrm=iso).
66. Chibinda C, Arada MA, Pérez N. Caracterización por métodos físico-químicos y evaluación del impacto cuantitativo de las aguas del Pozo la Calera. *Rev Cub Quim [Internet]*. 2017 [citado el 18 de febrero del 2023]; 29 (2): 303-321. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/4435/443551310010.pdf>.
67. Casas-Augustench P, Salas-Salvado J. Viscosidad y flujo de caída libre de tres fórmulas de nutrición enteral ricas en energía y fibra. *Nutr. Hosp [Internet]*. 2009 [citado el 18 de febrero del 2023]; 24 (4): 492-497. Disponible en: [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0212-16112009000400015](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0212-16112009000400015).
68. Talens P. Determinación experimental de densidad y porosidad en alimentos sólidos y líquidos. 2020 [citado el 5 de marzo de 2023]; 1444. Disponible en: <https://riunet.upv.es/handle/10251/144736>.
69. Cuñé J, Fernández X, Carné X, Pérez JMB, Garganta R. Estudio piloto de la usabilidad y la funcionalidad de un pH-metro inteligente y una aplicación móvil de salud para la monitorización del pH urinario. *Arch Esp Urol [Internet]*. 2021 [citado

- el 18 de febrero del 2023]; 74 (7): 692-698. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8041613>.
70. Zumbado H. Análisis químico de los alimentos: métodos clásicos [Internet]. 1a ed. Cuba: Editorial Universitaria; 2008 [consultado el 18 de febrero del 2023]. Disponible en: [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=GI\\_zDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP2&dq=balanzas+quimica&ots=BBYoLj3MvR&sig=kZROyQFgCs-sHWPPAf4Z01Vipyo#v=onepage&q&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=GI_zDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP2&dq=balanzas+quimica&ots=BBYoLj3MvR&sig=kZROyQFgCs-sHWPPAf4Z01Vipyo#v=onepage&q&f=false).
71. Chen Y, Valle M, Valdebenito N, Zacconi F. Mediciones y métodos de uso común en el laboratorio de química [Internet]. 2a ed. Chile: Editorial Universidad Católica; 2014 [consultado el 18 de febrero del 2023]. Disponible en: [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=9-1TDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA79&dq=balanza+anal%C3%ADtica+y+granataria+usos&ots=rv5u68Iu\\_1&sig=zUxEwSgZXVDIBRYevLFQ6BakK8o#v=onepage&q=balanza%20anal%C3%ADtica%20y%20granataria%20usos&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=9-1TDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA79&dq=balanza+anal%C3%ADtica+y+granataria+usos&ots=rv5u68Iu_1&sig=zUxEwSgZXVDIBRYevLFQ6BakK8o#v=onepage&q=balanza%20anal%C3%ADtica%20y%20granataria%20usos&f=false).
72. Cromer A, Vázquez J. Física para las ciencias de la vida [Internet]. España: Reverté; 2019 [consultado el 18 de febrero del 2023]. Disponible en: <https://books.google.co.cr/books?id=XYfyDwAAQBAJ&pg=PA183&dq=term%C3%B3metro+en+laboratorio&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwi51-v7vsP9AhXFQTABHXXiD30Q6AF6BAgJEAI#v=onepage&q=term%C3%B3metro%20en%20laboratorio&f=false>.
73. Hidalgo GL, Romero AB. Diseño de una planta piloto para la extracción de aceites esenciales mediante destilación por arrastre por vapor [Tesis para optar el título de Ingeniero Industrial y de Sistemas]. Piura, Perú: Universidad de Piura; 2016.
74. Molina E, Pallarés A. Extracción y purificación de productos naturales de interés industrial [Tesis de maestría en Biotecnología industrial y agroalimentaria]. Almería, España: Universidad de Almería; 2015.
75. Romero W. Estudio comparativo químico de extractos de *Corynaea crassa* por los métodos de maceración y percolación [Tesis de grado de Químico Farmacéutico]. Guayaquil, Ecuador: Universidad de Guayaquil; 2018.

76. López MA, Luque de Castro MD. Liquid-Phase Extraction [Internet]. 1a ed. Elsevier; 2020 [consultado el 18 de febrero del 2023]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128169117000116>.
77. Tesfaye B, Tefera T. Extraction of essential oil from neem seed by using Soxhlet extraction methods. *Ijaems* [Internet]. 2017 [citado el 18 de febrero del 2023]; 3 (6): 646-650. Disponible en: <https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/>.
78. Gómez D, Pita V, Zumalacárregui B. Caracterización de aceites de las semillas de *Moringa oleífera* a partir de la extracción por diferentes métodos. *Rev. Colomb. Biotecnol* [Internet]. 2016 [citado el 18 de febrero del 2023]; 18 (2): 106-111. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v18n2/v18n2a14.pdf>.
79. Rojas T, Fuentes M, Contreras-López E, Gómez S, Muñoz AM. Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de la cáscara de *Sanky*. *Rev Soc Quím Perú* [Internet]. 2019 [citado el 18 de febrero del 2023]; 85 (6): 259-267. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v85n2/a12v85n2.pdf>.
80. Hernández M, Hernández-Soto J, Rojo F, Robles C, Vanegas C, Ponce de León C. Extracción asistida por microondas y limpieza en fase sólida como método de análisis para la determinación de plaguicidas organofosforados en *Ambystoma mexicanum*. *Rev. Int. Contam. Ambient* [Internet]. 2013 [citado el 18 de febrero del 2023]; 29 (2): 189-200. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v29n2/v29n2a5.pdf>.
81. Barberio R. Fluidos supercríticos y líquidos iónicos: ventajas y aplicaciones a bajo impacto ambiental. Repositorio Digital de la Universidad Politécnica de Cartagena; 2019.
82. Marín EM, Reyes MG, Audisio MC, Zacur JL, Uriburu ML, Nicotra VE. Selective extraction of antimicrobial agents from *Jodina rhombifolia* by supercritical fluid carbon dioxide: phytochemical profile. *Nat Prod Res* [Internet]. 2022 [citado el 18 de febrero de 2023]; 36(24):6279–85. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35073793/>.
83. Cerpa M. Hidrodestilación de aceites esenciales: Modelo y caracterización [Tesis de doctorado en Ciencia]. Valladolid, España: Universidad de Valladolid; 2007.

84. Sgariglia M, Soberon J, Sampietro D, Vattuone M. Cromatografía: conceptos y aplicaciones. Arakuku [Internet]. 2010 [citado el 18 de febrero del 2023]; 2 (1): 1-6. Disponible en: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/75465>.
85. Martínez I, Padrón MA, Acosta M, Cabrera R, González Y, Martínez M, et al.. Aplicación de métodos bioquímicos en la caracterización de antígenos vacunales, alérgenos y otras biomoléculas de origen bacteriano [Internet]. Redalyc [citado el 1 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181220525052.pdf>.
86. Swartz M. Hplc detectors: A brief review. J Liq Chromatogr Relat Technol [Internet]. 2010 [citado el 18 de febrero del 2023]; 33(9–12):1130–50. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/10826076.2010.484356>.
87. Binnie SA, Dunai TJ, Voronina E, Goral T, Heinze S, Dewald A. Separation of Be and Al for AMS using single-step column chromatography. Nucl Instrum Methods Phys Res B [Internet]. 2015; 361:397–401. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168583X15003043>.
88. Poole C. Gas Chromatography [Internet]. Reino Unido: Elsevier; 2021 [consultado el 18 de febrero del 2023]. Disponible en: <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=Hx39DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=gas+chromatography&ots=CEjo8D3CAL&sig=qv1dwdsDLdcL2y8OEcIMkc4wtS0#v=onepage&q=gas%20chromatography&f=false>.
89. McNair H, Miller J, Snow N. Basic gas chromatography [Internet]. 2a ed. Reino Unido: Wiley; 2019 [consultado el 18 de febrero del 2023]. Disponible en: [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=VimjDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=gas+chromatography&ots=QmJMYfFj8\\_&sig=inGWOZ9KFhx96F5wzJvBbWkg05Y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=VimjDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=gas+chromatography&ots=QmJMYfFj8_&sig=inGWOZ9KFhx96F5wzJvBbWkg05Y#v=onepage&q&f=false).
90. Guillermina M, Quiroga P. Análisis farmacéutico. 1a ed. Argentina: La Plata: Universidad Nacional de La Plata; 2013.
91. Wilma G, Noriega M. Espectroscopía de absorción atómica con llama y su aplicación para la determinación de plomo y control de productos cosméticos la granja. Lgr [Internet]. 2012 [citado el 18 de febrero del 2023]; 15 (1): 18-25. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/4760/476047399003.pdf>.

92. Workman J, Springsteen A. *Applied Spectroscopy*. 1a ed. Estados Unidos: Elsevier;1998.
93. Cosimo AC, Haller C. *UV/VIS Spectrophotometry- Fundamentals and Applications*. Estados Unidos: Mettler Toledo;2015.
94. Wu Y. Preparation of ultrafine powders by reaction–precipitation in impinging streams iv: Nano hydroxyapatite. En: *Impinging Streams*. Elsevier; 2007. p. 317–27.
95. American Chemical Society [Internet]. Madrid, España: American Chemical Society; [consultado el 18 de febrero del 2023]. *Infrared Spectroscopy* [3 pantallas aprox.]. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsreagents.2008>.
96. Kumar M, Singh A. *Nuclear magnetic resonance spectroscopy* [Internet]. 1a ed. Países bajos: Elsevier; 2021 [consultado el 18 de febrero del 2023]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/topics/materials-science/nuclear-magnetic-resonance-spectroscopy>.
97. Rajawat J, Jhingan G. *Mass spectroscopy* [Internet]. 1a ed. Reino Unido: Academic Press; 2019 [consultado el 18 de febrero del 2023]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128165485000010>.
98. Singh U, Singh A, Singh D, Sinha M. *Application of mass spectroscopy in pharmaceutical and biomedical analysis*. 1a ed. Croacia: IntechOpen; 2017.
99. Bejarano Navas DA, Armenta Roncancio JE, López Muñoz LG, Cruz Domínguez MA. Evaluación cualitativa de extractos macerados con diferentes solventes para la extracción de glicoalcaloides y flavonoides de dioscórea bulbifera en condiciones estándar obtenidos en los llanos orientales de Colombia. *Rev Cienc Ing* [Internet]. 2020 [consultado el 18 de febrero de 2023];14(28):59–65. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1909-83672020000200059](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1909-83672020000200059)
100. Pino N, Álvarez R, Prado G. Determination of secondary metabolites by thin layer chromatography on species with ethnomedicinal use as a pedagogical strategy in the classroom. *Rev ACCB* [Internet]. 2017 [citado el 18 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://revistaaccb.org/r/index.php/accb/article/download/138/133/543>

101. García-Granados RU, Cruz-Sosa F, Alarcón-Aguilar FJ, Nieto-Trujillo A, Gallegos-Martínez. ME. Análisis fitoquímico cualitativo de los extractos acuosos de *Thalassia testudinum* de la localidad de champotón, campeche, méxico, durante el ciclo anual 2016-2017. Polibotanica [Internet]. 2019 [consultado el 18 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/polib/n48/1405-2768-polib-48-151.pdf>
102. Barrese Pérez Y, Hernández Jiménez E, García Pulpeiro O. Desarrollo de una técnica analítica para cuantificar las antraquinonas presentes en la *Senna alata* (L.) Roxb. (Guacamaya francesa). Rev Cubana Plant Med [Internet]. 2005 [consultado el 18 de febrero de 2023]; 10 (3-4). Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v10n3-4/pla103-405.pdf>
103. Vásquez S, Roxana M. Estudio Fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *Piper peltatum* L. y *Piper aduncum* L. procedente de la región Amazonas. UCV-Scientia [Internet]. 2015 [consultado el 18 de febrero de 2023]; 7 (2). Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/6181512.pdf>
104. Morales N, Cardona-Castro N. Métodos de diagnóstico en micología. CES Med [Internet]. 2018 [consultado el 18 de febrero de 2023]; 32 (1). Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-87052018000100041](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-87052018000100041)
105. Brotto ML, Voltz RR. New records of four tree species in the state of Paraná, southern Brazil: Canellaceae, Lauraceae, Melastomataceae, and Myristicaceae. Biodivers. Data J [Internet]. 2021 [citado el 18 de febrero del 2023]; 17(3): 859–872. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/352063067\\_New\\_records\\_of\\_four\\_tree\\_species\\_in\\_the\\_state\\_of\\_Parana\\_southern\\_Brazil\\_Canellaceae\\_Lauraceae\\_Melastomataceae\\_and\\_Myristicaceae](https://www.researchgate.net/publication/352063067_New_records_of_four_tree_species_in_the_state_of_Parana_southern_Brazil_Canellaceae_Lauraceae_Melastomataceae_and_Myristicaceae).
106. Moya R, Morales M, Wiemann MC, Poveda L. Wood anatomy of *Pleodendron costaricense* (Canellaceae). Brenesia [Internet]. 2007 [citado el 18 de febrero del 2023]; 26: 25-28. Disponible en:

<https://www.tec.ac.cr/publicaciones/wood-anatomy-pleodendron-costaricense-canellaceae-southern-pacific-costa-rica>.

107. Casiano-Dominguez M, Paz-Pellat F. Patrones espectrales de la fenología del desarrollo vegetativo y reproductivo de arboles de huizache (*Acacia farnesiana* (L.)). *Terra Latinoam* [Internet]. 2018 [citado el 18 de febrero del 2023]; 3(4): 393-409. Disponible en: [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-57792018000400393](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792018000400393).
108. PubChem. Alpha-pinene. Nih.gov [Internet]. 2020 [citado el 18 de febrero del 2023]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/alpha-Pinene>.
109. PubChem. (+)-Alpha-pinene. Nih.gov [Internet]. 2020 [citado el 18 de febrero del 2023]. Disponible en: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1R\\_-\\_-alpha-Pinene](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1R_-_-alpha-Pinene).
110. Salehi B, Upadhyay S, Erdogan Orhan I, Kumar Jugran A, L D Jayaweera S, A Dias D, et al.. Therapeutic potential of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene: A miracle gift of nature. *Biomolecules* [Internet]. 2019 [citado el 5 de marzo de 2023]; 9(11): 738. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2218-273X/9/11/738>.
111. PubChem. Myrcene. Nih.gov [Internet]. 2020 [citado el 18 de febrero del 2023]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Myrcene>.
112. PubChem. Beta-thujene. Nih.gov [Internet]. 2020 [citado el 18 de febrero del 2023]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/beta-Thujene>.
113. Scandiffio R, Geddo F, Cottone E, Querio G, Antoniotti S, Gallo MP, et al.. Protective effects of (E)- $\beta$ -caryophyllene (BCP) in chronic inflammation. *Nutrients* [Internet]. 2020 [citado el 5 de marzo de 2023];12(11):3273. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33114564/>.
114. Vargas I, Martínez H, Froján M. An extensión of the concept of rule and its application to therapy. *Clínica y Salud* [Internet]. 2018 [citado el 18 de febrero del 2023]; 29 (2): 63-70. Disponible en: [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1130-52742018000200003](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-52742018000200003).

115. López K, Dzúl Karla, Lugo C, Arias J, Zavala J. Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Una revisión. Rev. Biomédica [Internet]. 2016 [citado el 18 de febrero del 2023]; 27 (3): 127-135. Disponible en: [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-84472016000300127#:~:text=La%20enzima%2014%20alfa%2Dlanosterol,14%20alfa%2Ddesmetilaci%C3%B3n%20del%20lanosterol](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-84472016000300127#:~:text=La%20enzima%2014%20alfa%2Dlanosterol,14%20alfa%2Ddesmetilaci%C3%B3n%20del%20lanosterol).
116. Mendoza M, Pino J, Solís L, Espinoza H, Ramírez M. Análisis del aceite esencial de muña (*Minthostachys acris* Schmidt-Leb.) y evaluación de su actividad antimicótica sobre *Sporothrix schenckii*. Rev. CENIC. Cien. Quim [Internet]. 2019 [citado el 18 de febrero del 2023]; 50 (1): 22-30. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/1816/181662291002/181662291002.pdf>.
117. Rossel LJ, Rossel LA, Mayhua F, Ferro A, Zapana R. Radiación ultravioleta-c para desinfección bacteriana (coliformes totales y termotolerantes) en el tratamiento de agua potable. Rev. Investig. Altoandin [Internet]. 2020 [citado el 18 de febrero del 2023]; 22 (1). Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2313-29572020000100068](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2313-29572020000100068)
118. Gil P. Cancer Center Clínica Universidad de Navarra [Internet]. España: Clínica Universidad de Navarra; 2022 [consultado el 18 de febrero del 2023]. Candidiasis [4 pantallas aprox.]. Disponible en: <https://www.cun.es/enfermedades-tratamientos/enfermedades/candidiasis#:~:text=Afectando%20a%20la%20mucosa%20est%C3%A1,una%20mucosa%20roja%20y%20congestiva>.
119. Aguilar G, Araujo P, Lird G, Insaurralde S, Kawabata A, Ayala E, Irala J, Arguello R. Identificación y perfil de sensibilidad de *Candida* spp. Aisladas de hemocultivos en hospitales de Paraguay. Rev. Panam. Salud Publica [Internet]. 2020 [citado el 18 de febrero del 2023]; 44 (34): 1-6. Disponible en: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52267/v44e342020.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
120. Panizo M, Reviákina V. *Candida albicans* y su efecto patógeno sobre las mucosas. Rev. Soc. Ven. Microbiol [Internet]. 2021 [citado el 18 de febrero del 2023]; 21 (2): 38-45. Disponible en:

- [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562001000200011](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562001000200011).
121. Delgado FM. Enfoque para la gestión de la I+D+i en la Industria Biofarmacéutica cubana. *Acimed* [Internet]. 2017 [citado el 18 de febrero del 2023]; 28 (3): 1-16. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=76618>.
  122. Elder D, Kuentz M, Holm R. Pharmaceutical excipients- quality regulatory and biopharmaceutical considerations. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2016 [citado el 18 de febrero del 2023]; 87 (25): 88-99. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0928098715300920>.
  123. Baena Y, Ponce LF. Importancia y fundamentación del sistema de clasificación biofarmacéutico, como base de la exención de estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia in vivo. *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm* [Internet]. 2018 [citado el 18 de febrero del 2023]; 37 (1): 18-32. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-74182008000100002](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74182008000100002).
  124. Hernández R, Méndez S, Mendoza C, Cuevas A. *Fundamentos de Investigación*. 1a ed. México: Mc Graw Hill; 2017.
  125. Azuero E. Significatividad del marco metodológico en el desarrollo de proyectos de investigación. *Rev. Arbitr. Interdiscip. Koinonía* [Internet]. 2019 [citado el 25 de febrero del 2023]; 4 (8):110-127. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7062667>.
  126. Osa Conservation [Internet]. Península de Osa, Costa Rica: 2023 [consultado el 09 de setiembre del 2023]. *Pleodendron costaricense*- Canelillo [2 pantallas aprox.]. Disponible en: <https://osa-arboretum.org/plant/pleodendron-costaricense/>
  127. Navarrete Carolina, Gil Jesus, Durango Diego, García Carlos. Extracción y caracterización del aceite esencial de mandarina obtenido de residuos agroindustriales. *Dyna Rev.Fac.Nac.Minas* [Internet]. 2010 [citado el 20 de marzo del 2023]; 77 (162): 85-92. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0012-73532010000200010&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0012-73532010000200010&lng=en&nrm=iso&tlng=es)

128. Almeida-Couto J, Ressutte J, Cardozo-Filho L, Cabral V. Current extraction methods and potential use of essential oils for quality and safety assurance of foods. *An Acad Bras Cienc* [Internet]. 2022 [citado el 20 de marzo del 2023]; 94 (2). Disponible en: <https://www.scielo.br/j/aabc/a/x9Y74GcRLJkLpyGTppqdNQN/?lang=en>
129. Kumar R, Prasad P, Shang X, Keum Y. Advances in lipid extraction methods-A review. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 [citado el 20 de marzo del 2023]; 22 (24). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8704327/>
130. Hewavitharana G, Perera D, Navaratne S, Wickramasinghe I. Extraction methods of fat from food samples and preparation of fatty acid methyl esters for gas chromatography: A review. *Arab. J. Chem* [Internet]. 2020 [citado el 20 de marzo del 2023]; 13 (8): 6865-6875. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535220302458>
131. Fernández F, Marín-Morán J, Teixeira Z, Carvallo-Queiroz M, Escalona-Arranz J. Evaluación de las condiciones de extracción por hidrodestilación-cohobación del aceite esencial del follaje de *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea* (droga seca). *Rev Cub Quim* [Internet]. 2013 [citado el 20 de marzo del 2023]; 15 (1): 100-108. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/291522059\\_Evaluacion\\_de\\_las\\_condiciones\\_de\\_extraccion\\_por\\_hidrodestilacion-cohobacion\\_del\\_aceite\\_esencial\\_del\\_follaje\\_de\\_Pinus\\_caribaea\\_Morelet\\_var\\_caribaea\\_droga\\_seca](https://www.researchgate.net/publication/291522059_Evaluacion_de_las_condiciones_de_extraccion_por_hidrodestilacion-cohobacion_del_aceite_esencial_del_follaje_de_Pinus_caribaea_Morelet_var_caribaea_droga_seca).
132. Lafont J, Páez M, Portacio A. Extracción y caracterización fisicoquímica del aceite de la semilla (almendra) del marañón (*Anacardium occidentale L*). *Inf. Tecnol* [Internet]. 2011 [citado el 20 de marzo del 2023]; 22 (1): 51-58. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v22n1/art07.pdf>
133. Kahveci O, Cadirlil E, Art M, Tecer H, Gunduz M. Measurement and Prediction of the Thermal and Electrical Conductivity of Al-Zr Overhead Line Conductors at Elevated Temperatures. *Mater. Res* [Internet]. 2018 [citado el 20 de marzo del 2023]; 22 (1). Disponible en: <https://www.scielo.br/j/mr/a/KR7RPVZjXJpCMzXvzjWy5ph/?format=pdf&lang=en>

134. Aular Y, Villamizar M, Pérez Y, Pérez V. Composición química y toxicidad aguda oral del aceite esencial de *Lippia alba* en ratones. *Salus* [Internet]. 2016 [citado el 24 de marzo del 2023]; 20 (1). Disponible en: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1316-71382016000100008](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-71382016000100008)
135. Robles E, Sánchez C, Urbina-González J. A mild procedure for the synthesis of allyl and benzyl  $\alpha$ -hydroxyesters using *O*-allyl (benzyl)-*N,N'*-dicyclohexylisourea. *Rev. Soc. Quím. Perú* [Internet]. 2017 [citado el 24 de marzo del 2023]; 38 (2). Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1810-634X2017000200002](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2017000200002).
136. Cortés C, Gonzáles D, Barrientos R, Parra C, Romero J, Pertino M, Areche A, Sepúlveda B, Bórquez J, Torres A, Simirgiotis M. Phenolic Profile, antioxidant and enzyme inhibition properties of the Chilean endemic plant *Ovidia pillopillo* y *Meissner* (Thymelaeaceae). *Metabolites* MDPI [Internet]. 2023 [citado el 24 de marzo del 2023]; 12 (90): 1-20. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/357989267\\_Phenolic\\_Profile\\_Antioxidant\\_and\\_Enzyme\\_Inhibition\\_Properties\\_of\\_the\\_Chilean\\_Endemic\\_Plant\\_Ovidia\\_pillo\\_pillo\\_Gay\\_Meissner\\_Thymelaeaceae](https://www.researchgate.net/publication/357989267_Phenolic_Profile_Antioxidant_and_Enzyme_Inhibition_Properties_of_the_Chilean_Endemic_Plant_Ovidia_pillo_pillo_Gay_Meissner_Thymelaeaceae)
137. González R, Hurtado A. Primeros ensayos para el cultivo y caracterización del aceite esencial de *Conochea scoparioides* (Cham. & Schltdl.) Benth. Para el Pacífico colombiano. *Entramado* [Internet]. 2011 [citado el 23 de agosto del 2023]; 7 (2). Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1900-38032011000200011](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1900-38032011000200011).
138. Casado I. Optimización de la extracción de aceites esenciales por destilación en corriente de vapor [Tesis de grado en Ingeniería en Tecnologías Industriales]. Madrid, España: Universidad Politécnica de Madrid; 2018.
139. Guarino S, Kim D. Thermally Induced Silane Dehydrocoupling: Hydrophobic and Oleophilic Filter Paper Preparation for Water Separation and Removal from Organic Solvents. *Materials* [Internet]. 2021 [citado el 23 de agosto del 2023]; 14 (19). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8510372/>
140. Abu-Izneid T, Rauf A, Shariati MA, Khalil AA, Imran M, Rebezov M, y Uddin MS. Sesquiterpenes and their derivatives-natural anticancer compounds: An update.

- Pharmacol Res [Internet]. 2020 [citado el 23 de agosto del 2023]; 161: 105165. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1043661820314730>
141. Sánchez V. Polifenoles y capacidad antioxidante *in vitro* de extractos provenientes de los frutos de *Acacia farnesiana* [Tesis de grado en Químico en Alimentos]. Zacatecas, México: Universidad Autónoma de Zacatecas “Francisco García Salinas”; 2016.
142. García R, Cruz F, Alarcón F, Nieto A, Gallegos ME. Análisis fitoquímico cualitativo de los extractos acuosos de *Thalassia testudinum* Banks ex Köning et Sims de la localidad de Champotón, Campeche, México, durante el ciclo anual 2016-2017. Polibotánica [Internet]. 2019 [citado el 23 de setiembre del 2023]; 48. Disponible en: [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-27682019000200151](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682019000200151)
143. Cahyati E, Lestari K, Muchtaridi M. Técnica de espectroscopía infrarroja para cuantificación de compuestos en medicina y suplementos de origen vegetal. J Adv Pharm Technol Res [Internet]. 2021 [citado el 23 de setiembre del 2023]; 12 (1): 1-7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7832193/>
144. Allenspach M, Valder C, Flamm D, Steuer C. Authenticity control of pine sylvestris essential oil by chiral gas chromatographic analysis of  $\alpha$ -pinene. Sci Rep [Internet]. 2021 [citado el 23 de setiembre del 2023]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structures-of-the-two-enantiomers--a-pinene-1-and-a-pinene-2\\_fig2\\_354004312](https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structures-of-the-two-enantiomers--a-pinene-1-and-a-pinene-2_fig2_354004312)
145. Merck KGaA [Internet]. Darmstadt, Alemania; 2023 [consultado el 23 de setiembre del 2023]. Disponible en: [https://www-sigmaaldrich-com.translate.google.de/de/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/photometry-and-reflectometry/ir-spectrum-table?\\_x\\_tr\\_sl=de&\\_x\\_tr\\_tl=es&\\_x\\_tr\\_hl=es&\\_x\\_tr\\_pto=wapp&\\_x\\_tr\\_hist=true](https://www-sigmaaldrich-com.translate.google.de/de/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/photometry-and-reflectometry/ir-spectrum-table?_x_tr_sl=de&_x_tr_tl=es&_x_tr_hl=es&_x_tr_pto=wapp&_x_tr_hist=true)
146. Sarria R, Gallo JA. Caracterización de los aceites esenciales del *Pinus oocarpa* por cromatografía de gases-espectrometría de masas (Gc-Ms) aceites esenciales by Gc-Ms. EIA [Internet]. 2021 [consultado el 23 de setiembre del 2023]; 18 (35): 1-11. Disponible en: [www.scielo.or-g.co/pdf/eia/v18n35/2463-0950-eia-18-35-209.pdf](http://www.scielo.or-g.co/pdf/eia/v18n35/2463-0950-eia-18-35-209.pdf)

147. Masruri M, Farid M. Estudio de oxidación catalítica de  $\alpha$ -pineno utilizando cloruro de peróxido de hidrógeno (III). CTSA [Internet]. 2015 [consultado el 23 de setiembre del 2023]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/316643390\\_Study\\_Catalytic\\_Oxidation\\_of\\_a-Pinene\\_Using\\_Hydrogen\\_Peroxide-IronIII\\_Chloride](https://www.researchgate.net/publication/316643390_Study_Catalytic_Oxidation_of_a-Pinene_Using_Hydrogen_Peroxide-IronIII_Chloride)
148. Bikmurzin R, Bandzeviciute R, Marsalka A, Maneikis A, Kalediene L. FT-IR Method Limitations for  $\beta$ -Glucan Analysis. *Molecules* [Internet]. 2022 [consultado el 23 de setiembre del 2023]; 27 (14): 4616. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/14/4616>
149. McSweeney P, McNamara J. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 3a ed. Irlanda: Academic Press; 2022.
150. Rivas A, Monteiro P, Barros M, Machado D, Sales C, Alviano D. Biological Activities of  $\alpha$ -Pinene and  $\beta$ -Pinene Enantiomers. *Molecules* [Internet]. 2012 [consultado el 24 de setiembre del 2023]; 17 (6). Disponible en: <https://www.mdpi.com/1420-3049/17/6/6305>
151. Cepeda V, Farías L, Rubio A, Sáenz A. Estudio de la polimerización en emulsión empleando mirceno como monómero natural. *Rev. Iberoam. Polim* [Internet]. 2019 [consultado el 24 de setiembre del 2023]; 20 (4): 146-155. Disponible en: <https://reviberpol.org/2019/07/01/estudio-de-la-polimerizacion-en-emulsion-empleando-mirceno-como-monomero-natural/>
152. National Library of Medicine [Internet]. Rockville, Estados Unidos: PubChem; 2023 [consultado el 24 de setiembre del 2023]. Beta-tujene [2 pantallas aprox.]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/beta-Thujene>
153. Torres S, Tovar M, García V, Lucena M, Araujo L. Composición química del aceite esencial de las hojas de *Hedyosmum luteynii* Todzia (Chloranthaceae). *Rev. Peru. Biol* [Internet]. 2018 [consultado el 24 de setiembre del 2023]; 25 (2): 173-178. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v25n2/a12v25n2.pdf>
154. Sigma Aldrich [Internet]. Alemania: ; 2023 [consultado el 24 de setiembre del 2023]. Beta-Caryophyllene [2 pantallas aprox.]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/search/beta->

caryophyllene?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=beta-caryophyllene&type=product

155. Zapata D, Wixsan J, Hinostroza K, Justo S, Gonzales H. Effects of  $\beta$ -cariofylene of *Piper nigrum* extract in the sperm hyperactivation and in the fertilizing capacity of *Tetrapygyus niger* (molina, 1782) "black sea urchin". Biotempo [Internet]. 2019 [consultado el 24 de setiembre del 2023]; 16 (2): 187-193. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/338151713\\_efectos\\_del\\_extracto\\_de\\_b\\_cariofileno\\_de\\_piper\\_nigrum\\_en\\_la\\_hiperactivacion\\_espermatologica\\_y\\_en\\_la\\_capacidad\\_fecundante\\_de\\_tetrapygyus\\_niger\\_molina\\_1782\\_\"erizo\\_negro\\_de\\_mar\"](https://www.researchgate.net/publication/338151713_efectos_del_extracto_de_b_cariofileno_de_piper_nigrum_en_la_hiperactivacion_espermatologica_y_en_la_capacidad_fecundante_de_tetrapygyus_niger_molina_1782_\)
156. Cakmak K, Bayram O, Solak K, Kaban G, Simsek O, Mavi A. Plasma polymerized linalool (ppLin): An antimicrobial and biocompatible coating. Turk. J. Chem [Internet]. 2019 [consultado el 24 de setiembre del 2023]; 43 (1): 323-334. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/330890129\\_Plasma\\_polymerized\\_linalool\\_ppLin\\_An\\_antimicrobial\\_and\\_biocompatible\\_coating](https://www.researchgate.net/publication/330890129_Plasma_polymerized_linalool_ppLin_An_antimicrobial_and_biocompatible_coating)
157. National Library of Medicine [Internet]. Rockville, Estados Unidos: PubChem; 2023 [consultado el 24 de setiembre del 2023]. Cinnamodial [2 pantallas aprox.]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cinnamodial>
158. National Library of Medicine [Internet]. Rockville, Estados Unidos: PubChem; 2023 [consultado el 24 de setiembre del 2023]. Cinnamosmolide [2 pantallas aprox.]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cinnamosmolide>
159. Chappel J, Coates R. Comprehensive Natural Products II. 1a ed. Elsevier Science; 2010.
160. National Library of Medicine [Internet]. Rockville, Estados Unidos: PubChem; 2023 [consultado el 24 de setiembre del 2023]. Mukaadial [2 pantallas aprox.]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/159088>
161. National Library of Medicine [Internet]. Rockville, Estados Unidos: PubChem; 2023 [consultado el 24 de setiembre del 2023]. Parritadial [2 pantallas aprox.]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Parritadial>
162. Handore KL, Jadhav PD, Hazra B, Basu A, Reddy DS. Total Syntheses and Biological Evaluation of ( $\pm$ )-Botryosphaeridione, ( $\pm$ )-Pleodendione, 4-epi-Periconianone B, and Analogues. ACS Med. Chem. Lett [Internet]. 2015 [consultado

- el 24 de setiembre del 2023]; 6 (11): 1117-1121. Disponible en: <https://europepmc.org/article/med/26617964>
163. Kumar P, Vaishnavi G, Divya K, Lakshmi. An overview on preformulation studies. IAJPR [Internet]. 2019 [consultado el 25 de setiembre del 2023]; 2 (10). Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/330193840\\_AN\\_OVERVIEW\\_ON\\_PRE\\_FORMULATION\\_STUDIES](https://www.researchgate.net/publication/330193840_AN_OVERVIEW_ON_PRE_FORMULATION_STUDIES).
164. Ostrozka A, Maciazek M, Pozycka J, Solinska B. Pre-Formulation Studies: Physicochemical Characteristics and In Vitro Release Kinetics of Insulin from Selected Hydrogels. Pharmaceutics [Internet]. 2021 [consultado el 25 de setiembre del 2023]; 13 (8): 1215. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8398322/>
165. USP-NF [Internet]. Estados Unidos: The United States Pharmacopeial Convention; 2016 [consultado el 25 de setiembre del 2023]. Solubility Measurements [3 pantallas aprox.]. Disponible en: <https://www.uspnf.com/notices/solubility-measurements>
166. Young J. True Melting Point Determination. Chem. Educator [Internet]. 2013 [consultado el 25 de setiembre del 2023]; 18: 203-208. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/271513918\\_True\\_Melting\\_Point\\_Determination](https://www.researchgate.net/publication/271513918_True_Melting_Point_Determination)
167. Sutar S, Yeligar V, Patil S. A Review: Stability Indicating Forced Degradation Studies. Research J. Pharm. And Tech [Internet]. 2019 [consultado el 25 de setiembre del 2023]; 12 (2): 885-890. Disponible en: <https://www.proquest.com/openview/537a54b311dec3e3f781b2d31db80158/1?pq-origsite=gscholar&cbl=1096441>
168. Qureshi N. Biorefineries, Integrated Biochemical Processes for Liquid Biofuels. Estados Unidos: Elsevier; 2014. Capítulo 5, Integrated Processes for Product Recovery; 101-118.
169. Ahmad J, Mansoor S, Fayaz R, Nissa N. Basic Life Science Methods, A Laboratory Manual for Students and Researchers. India: Elsevier; 2023. Capítulo 3, pH meter: Its use and calibration; 9-10.

170. Fischer E. The Definition of Density in General Relativity. *Int. j. Astron. Astrophys. Res* [Internet]. 2017 [consultado el 26 de setiembre del 2023]; 7 (4): 303-312. Disponible:  
[https://www.researchgate.net/publication/322066885\\_The\\_Definition\\_of\\_Density\\_in\\_General\\_Relativity](https://www.researchgate.net/publication/322066885_The_Definition_of_Density_in_General_Relativity)
171. Olaya E, García R, Torres N, Ferro D, Torres S. Caracterización del proceso productivo, logístico y regulatorio de los medicamentos. *Vitae* [Internet]. 2006 [consultado el 26 de setiembre del 2023]; 13 (2). Disponible en:  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-40042006000200009](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042006000200009)
172. Ruiz J, García P, Puerto J, Marín P, Saldarreaga A, Moya P. Evaluación de un nuevo medio CHROMagar Candida para la identificación presuntiva de levaduras. *Rev Diagn Biol* [Internet]. 2003 [consultado el 27 de setiembre del 2023]; 52 (1). Disponible en: [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-79732003000100002](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-79732003000100002)
173. Alfaro E, Nguyen B, Manwill PK, Benatrehina A, Kweka E, Wu S, et al.. Insecticidal and Antifeedant Activities of Malagasy Medicinal Plant (*Cinnamosma* sp.) Extracts and Drimane-Type Sesquiterpenes against *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Insects* [Internet]. 2019 [consultado el 27 de setiembre del 2023]; 10(11):373. Disponible en:  
<https://www.mdpi.com/2075-4450/10/11/373>
174. Sistema Costarricense de Información Jurídica [Internet]. San José; 2016 [consultado el 27 de setiembre del 2023]. Publica Resolución N° 16-2006 (COMIECO XLIX) Reglamento Técnico Centroamericano N° RTCA 11.01.02:04 Productos Farmacéuticos Etiquetado de Productos Farmacéuticos para Uso Humano [4 pantallas aprox.]. Disponible en:  
[http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm\\_texto\\_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=58413&nValor3=64716&strTipM=TC](http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=58413&nValor3=64716&strTipM=TC)
175. Tronsoco A. Diseño experimental para evaluar el efecto de algunos preservantes sobre la viscosidad y pH en una crema capilar. *Rev Virtual Pro* [Internet]. 2022 [consultado el 27 de setiembre del 2023]. Disponible en:  
[https://www.researchgate.net/publication/361097407\\_Diseno\\_experimental\\_para\\_e](https://www.researchgate.net/publication/361097407_Diseno_experimental_para_e)

valuar\_el\_efecto\_de\_algunos\_preservantes\_sobre\_la\_viscosidad\_y\_pH\_en\_una\_crema\_capilar

## **CAPÍTULO VII. ANEXOS**

### Anexo 1. Tabla resumen de nivel de evidencia

Autor/Revista/Año	Re	Título del artículo	Tipo de estudio	Nivel de evidencia	Resultados/conclusiones
Hammel B, Zamora N. Lankasteriana. 2005.	1	Pleodendron costaricense (Canella Ceae), a new species for Costa Rica	Estudio cualitativo, observacional, descriptivo, transversal, retrospectivo	4	En su estudio describen las principales características físicas de la especie <i>P. costaricense</i> , la historia de su descubrimiento, su biogeografía, hábitat, distribución y conservación. Recalcan los problemas relacionados con la reproducción de la planta y la poca variedad que existe de ella debido a sus condiciones necesarias de reproducción.
Treyvaud V, Petit P, Anh Chieu, Núñez R, Sánchez P,	5	Phytochemistry and Antifungal Properties of	Estudio cuasi experimental	4	En su análisis determinaron que mayoritariamente, los compuestos presentes

Poveda L, Smith M, Thor J, Durst T. J. Nat. Prod. 2006.		the Newly Discovered Tree <i>Pleodendron costaricense</i> .			en el <i>P. costaricense</i> son los sesquiterpenos y en su investigación, descubrieron dos nuevos sesquiterpenos.
Mata M, Calvo M. Revista Ciencia y Salud. 2022.	9	Preformulación teórica de un producto natural antifúngico a partir de extractos obtenidos de las hojas del árbol <i>Pleodendron costaricense</i> .	Revisión bibliográfica	5	Obtuvieron características fisicoquímicas de carácter cualitativo mediante fuentes bibliográficas y establecieron diferentes excipientes que se podrían utilizar en una formulación a futuro.
Almeida-Couto J, Ressutte J, Cardozo-Filho L, Cabral V. An Acad Bras Cienc. 2022.	12 8	Current extraction methods and potential use of essential oils for quality and safety assurance of foods.	Revisión bibliográfica	5	En este estudio se obtuvo una recopilación de avances y tecnologías utilizadas en el desarrollo de diferentes productos alimenticios, en el que mencionan diferentes técnicas

					para realizar sus extracciones.
--	--	--	--	--	---------------------------------

Fuente: Elaboración propia, 2023.