

**ESTUDIO DE ESTABILIDAD Y PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE UNA
MICROEMULSIÓN QUE INCORPORA EXTRACTOS Y ACEITES ESENCIALES DE
PLANTAS AROMÁTICAS QUE CRECEN EN SANTANDER**

Juan Camilo HENRÍQUEZ SANABRIA

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

MAESTRÍA EN QUÍMICA

BUCARAMANGA

2022

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

**ESTUDIO DE ESTABILIDAD Y PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE UNA
MICROEMULSIÓN QUE INCORPORA EXTRACTOS Y ACEITES ESENCIALES DE
PLANTAS AROMÁTICAS QUE CRECEN EN SANTANDER**

Trabajo de investigación para optar al título de Magíster en Química

Juan Camilo HENRÍQUEZ SANABRIA

DIRECTORA:

Elena E. STASHENKO, QUÍMICA, Ph. D.

CODIRECTOR:

Jairo R. MARTÍNEZ MORALES, QUÍMICO, Ph. D.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

MAESTRÍA EN QUÍMICA

BUCARAMANGA

2022

Agradecimientos

A mi hermosa familia David y Angely, por brindarme su amor y compañía durante este proceso; a mi madre Eddy por su amor infinito y por alentarme en los momentos más difíciles; a mis hermanos Jonatan, Oscar y Felipe, de quienes me siento siempre muy orgulloso.

A los profesores Elena Stashenko y Jairo René por sus observaciones, sugerencias y comentarios durante el desarrollo de esta investigación. Además, por su valiosa gestión para buscar fuentes de financiación para el desarrollo de la ciencia y del campo en Colombia.

A mis amigos Roger, Leonardo, Jessica, Cristian y Hernando, por su amistad inquebrantable. A mis compañeros y amigos del CENIVAM Nelson, Sheila, Félix, Lady, Laisha, Silvia, Julián, Felipe, Héctor y Josa, y a todos los demás compañeros, por hacer del CENIVAM nuestro segundo hogar.

A la Universidad Industrial de Santander, al laboratorio CROM-MASS y al grupo CIBIMOL por permitirme desarrollar esta investigación en sus instalaciones. A William Salgar y a su equipo de trabajo, por toda la colaboración para las corridas cromatográficas de las muestras.

A Minciencias, Mineducación, Mincomercio e ICETEX, Convocatoria Ecosistema Científico - Colombia Científica, Fondo Francisco José de Caldas, Contrato RC-FP44842-212-2018, Programa Bio-Reto XXI-15:50 por la financiación de esta investigación.

Y por supuesto, a los campesinos y al personal de salud de Colombia por su labor tan importante, en especial durante la pandemia del COVID-19.

Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN	19
2. MARCO REFERENCIAL	22
2.1 MARCO TEÓRICO	22
2.1.1. La piel y el estrés oxidativo.....	22
2.1.2. Metabolitos secundarios de plantas como fuente de antioxidantes	24
2.1.2.1 <i>Calycolpus moritzianus</i>	29
2.1.2.2 <i>Piper marginatum</i>	29
2.1.2.3 <i>Psidium sartorianum</i>	30
2.1.2.4 <i>Varronia curassavica</i>	30
2.1.2.5 <i>Wedelia calycina</i>	31
2.1.3. Sinergismo	32
2.1.4 Métodos para la determinación de la actividad antioxidante	32
2.1.5 Análisis químico de metabolitos secundarios.....	36
2.1.6 Productos cosméticos	37
2.1.6.1 Microemulsiones	39
2.1.6.1 Pruebas de estabilidad	41
2.2 MARCO DE ANTECEDENTES	41
2.2.1. Panorama general de las investigaciones en productos cosméticos	41
2.2.2 Uso de microemulsiones como prototipos cosméticos.....	44
3. MATERIALES Y MÉTODOS	49
3.1 REACTIVOS.....	51
3.2 MATERIALES	52
3.3 OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES	52
3.4 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS.	53
3.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	53
3.5.1 Ensayo de decoloración de ABTS ⁺⁺	54
3.5.2 Ensayo de decoloración del β -caroteno.	55
3.6 DISEÑO DE MEZCLAS BINARIAS DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS	56

3.7 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS INGREDIENTES NATURALES ...	56
3.7.1 Análisis por GC/MS del aceite esencial de <i>Piper marginatum</i>	57
3.7.2 Cuantificación de los componentes del aceite esencial de <i>Piper marginatum</i> por cromatografía de gases con detector de ionización en llama.....	59
3.7.3 Análisis por HPLC-DAD del extracto de <i>Psidium sartorianum</i>	60
3.7.4 Análisis por UHPLC-ESI-HRMS del extracto de <i>Psidium sartorianum</i>	60
3.7.5 Análisis por GC/MS del extracto de <i>Psidium sartorianum</i>	62
3.8 PREPARACIÓN DE LA MICROEMULSIÓN	62
3.8.1 Pruebas de estabilidad de las microemulsiones.....	64
3.8.2 pH de las microemulsiones.....	65
3.8.3 Viscosidad de las microemulsiones.....	65
3.8.4 Conductividad de las microemulsiones	66
3.8.5 Actividad antioxidante de la microemulsión.	66
3.8.6 Extracción y cuantificación del ácido elágico en las microemulsiones.....	67
3.8.7 Caracterización de la fracción volátil de las microemulsiones.....	68
4. RESULTADOS.....	70
4.1 SELECCIÓN DEL INGREDIENTE ACTIVO PARA LA MICROEMULSIÓN	70
4.1.1 Rendimientos de los aceites esenciales y los extractos.	70
4.1.2 Actividad antioxidante de aceites esenciales y extractos hidroalcohólicos.....	70
4.1.3 Actividad antioxidante de ácidos fenólicos y flavonoides.	75
4.2 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS INGREDIENTES NATURALES SELECCIONADOS	77
4.2.1 Caracterización química por GC/MS del aceite esencial de <i>Piper marginatum</i> . .	77
4.2.2 Caracterización química por UHPLC-ESI ⁺ -Orbitrap-HRMS del extracto de <i>Psidium sartorianum</i> , después de la destilación de la planta.	87
4.2.3 Caracterización química por HPLC-DAD del extracto de <i>Psidium sartorianum</i> . .	97
4.2.4 Caracterización química por GC/MS del extracto de <i>Psidium sartorianum</i>	101
4.2.5 Cuantificación del ácido elágico en el extracto de <i>P. sartorianum</i> , obtenido de la planta después de su destilación.	104
4.3 DESARROLLO DE LA MICROEMULSIÓN	105
4.3.1 Diagrama de fases pseudoternarias.....	105
4.3.2 Caracterización química de la fracción volátil de la microemulsión antioxidante.	108

4.4 ESTABILIDAD DE LA MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE.....	113
5. DISCUSIÓN	121
6. CONCLUSIONES	134
7. DIVULGACIÓN DE RESULTADOS	136
8. RECOMENDACIONES.....	137
9. REFERENCIAS.....	138
9. ANEXOS	168
Anexo 1. Curvas de calibración para la cuantificación de la actividad antioxidante por los métodos ABTS ⁺ y β -caroteno de AE y extractos.	
Anexo 2. Actividad antioxidante medida por el ensayo de ABTS ⁺ de las mezclas binarias..	168
Anexo 3. Perfil cromatográfico obtenido por GC/FID y espectros de masas de los componentes mayoritarios obtenidos por GC-TOF-HRMS del AE de <i>Piper marginatum</i>	172
Anexo 4. Curvas de calibración para la cuantificación de los compuestos presentes en el AE de <i>Piper marginatum</i>	176
Anexo 5. Espectros de masas obtenidos por GC/MS del extracto hidroalcohólico de <i>Psidium sartorianum</i> , obtenido del material vegetal después de su destilación.	179
Anexo 6. Corrientes iónicas extraídas (EIC) obtenidas por UHPLC-ESI ⁺ -Orbitrap-HRMS de los compuestos identificados de manera confirmatoria en el extracto de <i>Psidium sartorianum</i> , después de la destilación de la planta.	180
Anexo 7. Espectros de masas obtenidos por [ESI ⁺ -HRMS] de los flavonoides identificados en el extracto de <i>Psidium sartorianum</i> , después de la destilación de la planta.	185
Anexo 8. Máximos de absorción de los picos cromatográficos obtenidos en el análisis por HPLC-DAD del extracto de <i>Psidium sartorianum</i> , después de la destilación de la planta. Columna C ₁₈ Gemini.	193

Lista de Figuras

Figura 1. <i>Representación de la piel. Tomado de Nagula y Wairkar (2019), con modificaciones.</i>	23
Figura 2. <i>Estructuras químicas de los fenoles terpénicos carvacrol, timol y eugenol.</i>	26
Figura 3. <i>Estructura general de los flavonoides.</i>	27
Figura 4. <i>Estructura química del ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS).</i>	33
Figura 5. <i>Estructura del β-caroteno.</i>	36
Figura 6 <i>Países en donde se ha investigado y publicado sobre productos cosméticos. Base de datos Scopus (Elsevier, 2021). Periodo de observación 1847-2020. Palabra-clave: “Cosmetics”. Fecha de consulta: 9 de abril de 2021.</i>	43
Figura 7. <i>Número de publicaciones sobre microemulsiones que incorporan AE o extractos. Base de datos Scopus, ecuaciones de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (microemulsion AND “essential oil”) y TITLE-ABS-KEY (microemulsion AND extract); periodo de observación: 2000-2021; fecha de consulta 12 de abril de 2021.</i>	45
Figura 8. <i>Esquema general de la metodología usada en el presente trabajo de investigación....</i>	50
Figura 9. <i>Mezclas realizadas para la formación de microemulsiones con aceite vegetal de aguacate, agua: propilenglicol, y Tween[®] 80. Relación aceite vegetal: Tween[®] 80 a. 5:95; b. 10:90; c. 17:83; d. 25:75; e. 50:50; f. 75:25; g. 95:5. Fotos tomadas por Juan Camilo HENRÍQUEZ SANABRIA, en el Centro de Investigación CENIVAM, UIS, Bucaramanga. Fecha: 25 de enero de 2021.</i>	63
Figura 10. <i>Medición de la viscosidad de las microemulsiones con viscosímetro rotacional con husillo R2 (Fungilab ONE SERIES, Barcerlona, España). Fotografía tomada por Juan Camilo HENRÍQUEZ SANABRIA, en el Centro de Investigación CENIVAM, UIS, Bucaramanga. Fecha: 29 de marzo de 2021).</i>	66

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

Figura 11. Actividad antioxidante medida por el ensayo de decoloración del catión-radical $ABTS^{+}$ de las mezclas A : Binaria-1 y B : Binaria-2. ECM. Extracto de <i>Calycolpus moritzianus</i> ; EPS. Extracto de <i>Psidium sartorianum</i> ; AEPM. Aceite esencial de <i>Piper marginatum</i> ; AEVC. Aceite esencial de <i>Varronia curassavica</i>	74
Figura 12. Protección contra la oxidación del β -caroteno ejercida por los compuestos fenólicos, los ácidos trans-cinámico y p-hidrobenczoico y el extracto de <i>Psidium sartorianum</i> (EPS), todos evaluados a una concentración de 1 g/L.	76
Figura 13. Espectros de masas de: A . trans-Nerolidol presente en el AE de <i>P. marginatum</i> ; B . Sustancia patrón, trans-nerolidol Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). y C . Espectro de masas de trans-nerolidol reportado en literatura (Adams, 2007). GC/MS (EI, 70 eV). Columna apolar DB-5MS.	79
Figura 14. Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (modo full scan) del AE de <i>Piper marginatum</i> . Columna DB-5MS (60 m). Inyección split 1:30. MSD (EI, 70 eV); ISTD: n-tetradecano (1,9 g/L). Véase la identificación de los picos en la Tabla 6.	80
Figura 15. Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (modo full scan) del AE de <i>Piper marginatum</i> . Columna DB-WAX (60 m). Inyección split 1:30. MSD (EI, 70 eV). Véase la identificación de los picos en la Tabla 6.	81
Figura 16. Espectro de masas obtenido por GC-ToF-HRMS (columna Rxi-5MS) del compuesto N° 17 (Véanse Figuras 14-15 y Tabla 6) del AE de <i>Piper marginatum</i>	86
Figura 17. Espectro de masas obtenido por GC-ToF-HRMS (columna Rxi-5MS) del compuesto N° 37 (Véanse Figuras 14-15 y Tabla 6) del AE de <i>Piper marginatum</i>	86
Figura 18. Espectro de masas experimental obtenido por GC-TOF-HRMS (columna Rxi-5MS) del compuesto N° 44 (Véanse Figuras 14-15 y Tabla 6) del AE de <i>Piper marginatum</i>	87

Figura 19. Corrientes iónicas extraídas (EIC) de las moléculas protonadas $[M+H]^+$ obtenidas por UHPLC-ESI ⁺ -Orbitrap-HRMS de los flavonoides presentes en el extracto hidroalcohólico de material vegetal de <i>Psidium sartorianum</i> , después de su destilación. Véase la Tabla 7 para la identificación de los picos.....	91
Figura 20. Espectros de masas experimentales obtenidos por ESI ⁺ -HRMS de A. Quercitrina presente en el extracto de <i>Psidium sartorianum</i> , después de la destilación de la planta y B. Sustancia patrón, quercitrina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.).	92
Figura 21. Formación de iones-productos de RDA, de galocatequina-(4 α -8)-galocateol (1) y galocatequina-(4 α -8)-catequina (2).	93
Figura 22. Formación del ion-producto en m/z 139,03897, común para los flavanoles galocatequina (R ₂ =OH; R ₃ =H) y catequina (R ₂ =H; R ₃ =OH).	94
Figura 23. Formación de iones-producto F ₁ ⁺ y F ₂ ⁺ principales en los espectros de masas de los flavonoles presentes en el extracto de <i>Psidium sarturianum</i>	95
Figura 24. Formación de los principales iones-producto en los espectros de masas de las flavonas presentes en el extracto de <i>Psidium sartorianum</i>	96
Figura 25. Perfil cromatográfico obtenido por HPLC-DAD (λ = 270 nm) del extracto hidroalcohólico de <i>Psidium sartorianum</i> , después de la destilación de la planta. Véase la identificación de los picos cromatográficos en la Tabla 8 . Los picos cromatográficos con (*) no fueron identificados, sus máximos de absorción se muestran en el Anexo 8.	97
Figura 26. Espectros de masas, obtenidos por UHPLC-ESI-HRMS, de A. Ácido gálico y B. Ácido elágico, presentes en el extracto <i>Psidium sartorianum</i> , después de la destilación de la planta.	100

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

- Figura 27. *Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (modo full scan) del extracto de P. sartorianum, obtenido de la planta después de su destilación. Columna DB-5MS (60 m), inyección split 1:30, MSD (EI, 70 eV). Véase la identificación de los picos cromatográficos en la Tabla 9.* 102
- Figura 28. *Curva de calibración para la cuantificación del ácido elágico presente en el extracto de P. sartorianum, obtenido del material vegetal, después de su destilación.* 104
- Figura 29. *Diagrama de fases con Tween[®] 80 como surfactante. A. Con agua: propilenglicol (1:1) y aceite de ajonjolí; B. Con aceite de aguacate; C. Con agua como fase acuosa y D. Con agua: etanol (1:1).* 106
- Figura 30. *A. Microemulsión base y B. Microemulsión con extracto de P. sartorianum, obtenido de la planta después de su destilación. Fotografía tomada por Juan Camilo HENRÍQUEZ SANABRIA, en el Centro de Investigación CENIVAM, UIS, Bucaramanga. Fecha: 26 de marzo de 2021.* 108
- Figura 31. *Perfiles cromatográficos obtenidos por HS-SPME-GC/MS (modo full scan) de A. Fracción volátil de la microemulsión base y B. Fracción volátil de microemulsión con extracto de P. sartorianum. Columna DB-5MS (60 m). Inyección splitless. MSD (EI, 70 eV). Temperatura de exposición de la fibra (DVB/CAR/PDMS) fue 60 °C. Tiempos de pre-equilibrio térmico de la muestra, de la exposición de la fibra y de la desorción en el puerto de inyección fueron 15, 30 y 15 min, respectivamente. Véase la identificación de los picos cromatográficos en la **Tabla 10.*** 110
- Figura 32. *Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC-DAD de: A. El extracto de Psidium sartorianum y los extractos obtenidos por MSPD de B. La microemulsión base y C. La*

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

microemulsión con extracto de P. sartorianum incorporado. ISTD= Naringenina (20 mg/L).

Véase la identificación de los picos cromatográficos en la Tabla 8. 115

Figura 33. El ácido elágico presente en la microemulsión con extracto de P. sartorianum incorporado, bajo las diferentes condiciones de almacenamiento. AELG= ácido elágico; ISTD= naringenina (20 mg/L). 118

Figura 34. Prueba de múltiples rangos (Tukey, HSD) para la evaluación de estabilidad de los siguientes parámetros: A. pH; B. Viscosidad; C. Conductividad y D. Actividad antioxidante ($p < 0,05$). 119

Figura 35. Estructura del ácido elágico. 126

Lista de Tablas

Tabla 1. Diseño de experimentos para la extracción de ácido elágico de las microemulsión.	68
Tabla 2. Rendimientos de extracción de los AE y extractos hidroalcohólicos.	70
Tabla 3. Linealidad de los ensayos de decoloración del ABTS ⁺ y de β -caroteno para la determinación de la actividad antioxidante, usando Trolox [®] como sustancia de referencia.	71
Tabla 4. Actividad antioxidante medida por los ensayos de decoloración del catión-radical ABTS ⁺ y del β -caroteno de los AE y extractos hidroalcohólicos estudiados.	72
Tabla 5. Mezclas binarias entre los AE y extractos hidroalcohólicos obtenidos que demostraron la actividad antioxidante <i>in vitro</i> más alta.	73
Tabla 6. Caracterización química por GC/MS y cuantificación por GC/FID de componentes del AE de <i>Piper marginatum</i> obtenido por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas.	82
Tabla 7. Identificación por UHPLC-ESI ⁺ - Orbitrap-HRMS de los compuestos fenólicos en el extracto hidroalcohólico de <i>Psidium sartorianum</i> , después de la destilación de la planta.	89
Tabla 8. Análisis por HPLC-DAD ($\lambda=270$ nm) de los compuestos fenólicos detectados en el extracto hidroalcohólico de <i>Psidium sartorianum</i>	98
Tabla 9. Identificación tentativa por GC/MS (Columna DB-5MS, 60 m) de los compuestos presentes en el extracto de <i>P. sartorianum</i> , obtenido de la planta después de su destilación. ...	103

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

Tabla 10. Identificación GC/MS de los compuestos presentes en las fracciones volátiles, obtenidas por HS-SPME, de la microemulsión base (ME-B) y de la microemulsión con extracto de <i>P. sartorianum</i> , después de la destilación de la planta (ME-EPS).....	111
Tabla 11. Análisis de la varianza (ANOVA) para el experimento de extracción del ácido elágico.	116
Tabla 12. Prueba de múltiples rangos para la variable A (relación microemulsión: soporte sólido). Método: 95% Tukey (HSD).....	117
Tabla 13. Prueba de múltiples rangos para la variable B (relación cantidad de homogeneizado: volumen de metanol) Método: 95% Tukey (HSD).....	117
Tabla 14. Evaluación de pH, viscosidad, conductividad y actividad antioxidante de la microemulsión con extracto de <i>P. sarturianum</i> , almacenada bajo diferentes condiciones ($\bar{x} \pm s$, n=3).	119
Tabla 15. Comparación de los compuestos principales en el AE de <i>P. marginatum</i> caracterizado en el presente estudio con los reportados en literatura científica.....	124
Tabla 16. Revisión de literatura científica sobre las actividades biológicas de los compuestos identificados en el extracto hidroalcohólico de <i>Psidium sartorianum</i> , después de la destilación de la planta.	130

Siglas, abreviaturas y acrónimos

ABTS: 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) [ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico)].

AE: Aceite(s) esencial(es).

AELG: Ácido elágico.

AEPM: Aceite esencial de *Piper marginatum*.

AEVC: Aceite esencial de *Varronia curassavica*.

AG: Ácido gálico.

ANOVA: *Analysis of Variance* (Análisis de la variancia).

BHA: Butilhidroxianisol.

BHT: Butilhidroxitolueno.

CENIVAM: Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales.

CIBIMOL: Centro de Investigación en Biomoléculas.

CUPRAC: *Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity Assay* (Ensayo de capacidad antioxidante reductor de iones cúpricos).

d.i.: Diámetro interno.

DAD: *Diode-Array Detector* (Detector de arreglos de diodos).

dr: Espesor de la fase estacionaria.

DPPH: 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo).

e.g.: *Exempli gratia* (por ejemplo).

ECM: Extracto de *Calycolpus moritzianus*.

EIC: *Extraction Ion Current* (Corriente iónica extraída).

EPS: Extracto de *Psidium sartorianum*.

ESI: *Electrospray Ionitation* (Ionización por electronebulización).

eV: Electrón-voltio.

FID: *Flame Ionization Detector* (Detector de ionización de llama).

GC: *Gas Chromatography* (Cromatografía de gases).

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

HAT: *Hydrogen Atom Transfer* (Transferencia de átomo de hidrógeno).

HCD: *Higher-Energy Collision Dissociation Cell* (Celda de disociación de alta energía).

HPLC: *High-Performance Liquid Chromatography* (Cromatografía líquida de alta eficiencia).

HRMS: *High-Resolution Mass Spectrometry* (Espectrometría de masas de alta resolución).

HS: *Head-Space* (Espacio de cabeza).

HSD: *Honestly Significant Difference* (Diferencia honestamente significativa).

i.e.: *id est* (Esto es).

LRI: Linear Retention Indice(s) [Índice(s) de retención lineal(es)].

ISTD: *Internal Standard* (Estándar interno).

ITC: *International Trade Center* (Centro de comercio internacional).

LC: *Liquid Chromatography* (Cromatografía líquida).

LOQ: *Limit of Quantification* (Límite de cuantificación).

m.s.n.m.: Metros sobre el nivel del mar.

m/z: Relación masa/carga.

ME-B: Microemulsión-base.

ME-EPS: Microemulsión con extracto de *Psidium sartorianum*.

MSPD: *Matrix Solid-Phase Dispersion* (Dispersión de la matriz en fase sólida).

MWHD: *Microwave-Assisted Hydrodistillation* (Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas).

N.I.: No identificado.

NADPH: *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate* (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato).

O/W: *Oil/Water* (Aceite/agua).

ORAC: *Oxygen-Radical Absorbance Capacity* (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno).

PDS: Persulfato de potasio.

PVDF: *Polyvinylidene Difluoride* (Difluoruro de polivinilideno).

RDA: Reacción Retro-Diels-Alder.

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

Ref.: Referencia.

RFC: *Relative Centrifugal Force* (Fuerza centrífuga relativa).

RMN: Resonancia magnética nuclear.

RNS: *Reactive Nitrogen Species* (Especies reactivas de nitrógeno).

ROS: *Reactive Oxygen Species* (Especies reactivas de oxígeno).

rpm: Revoluciones por minuto.

SPLET: *Sequential Proton Loss Electron Transfer* (Pérdida secuencial de protón y transferencia de electrón).

SPME: *Solid-Phase Microextraction* (Microextracción en fase sólida).

ToF: *Time-of-Flight* (Tiempo de vuelo).

tr: Tiempo de retención.

UHPLC: *Ultra-High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia).

UV: Ultravioleta.

Resumen

Título: Estudio de estabilidad y propiedades antioxidantes de una microemulsión que incorpora extractos y aceites esenciales de plantas aromáticas que crecen en Santander*

Autor: Juan Camilo HENRÍQUEZ SANABRIA**

Palabras clave: Aceite esencial, extracto, antioxidante, microemulsión, GC/MS, LC/MS.

La piel está expuesta a factores ambientales, *i.e.*, luz ultravioleta, energía ionizante o sustancias xenobióticas, que incrementan las especies radicales de oxígeno (ROS). Cuando las ROS están en exceso y superan las defensas antioxidantes del cuerpo humano se genera el estrés oxidativo, el cual causa daño en las principales biomoléculas del cuerpo humano y genera afectación a la salud. Antioxidantes naturales como los flavonoides o ácidos fenólicos pueden ser extraídos de la biomasa residual de la destilación de plantas aromáticas y pueden ser incorporados en un producto cosmético como las microemulsiones con el objetivo de disminuir los efectos del estrés oxidativo.

En el presente trabajo de investigación se desarrolló y evaluó la estabilidad de una microemulsión con actividad antioxidante que incorporó como ingrediente activo un producto natural proveniente de algunas de las siguientes especies: *Calycolpus moritzianus*, *Piper marginatum*, *Psidium sartinianum*, *Varronia curassavica* y *Wedelia calycina*. El ingrediente activo se seleccionó con base en los resultados de actividad antioxidante de aceites esenciales, extractos y mezclas binarias. Las mediciones de actividad antioxidante se realizaron por los ensayos colorimétricos de ABTS+• y β -caroteno. El ingrediente activo se caracterizó por GC/MS, HPLC/DAD Y UHPLC-ESI-Orbitrap-MS. La microemulsión desarrollada se almacenó por 30 días a tres temperaturas (5, 25 y 40 °C) y se evaluó su estabilidad fisicoquímica después del almacenamiento.

El extracto de *P. sartinianum* se seleccionó como el ingrediente activo para incorporar en la microemulsión por su actividad antioxidante alta, comparada con las demás muestras de aceites esenciales, extractos y mezclas binarias evaluadas. En el extracto de *P. sartinianum* se identificaron dos proantocianidinas, cuatro flavanoles, ocho flavonoles, cuatro flavanonas, dos sesquiterpenoles y dos ácidos fenólicos, siendo el ácido elágico el compuesto más abundante (400 mg/g extracto). Los ingredientes seleccionados para la microemulsión fueron: aceite de aguacate, agua, propilenglicol, Tween® 80, extracto de *P. sartinianum* y aceite esencial de *Piper marginatum* (aromatizante). Los valores de pH, viscosidad, conductividad y actividad antioxidante fueron: 5,6, 253 cP, 3,4 μ S/cm y 43,7 μ mol Trolox®/g, respectivamente. Los valores de pH, conductividad y actividad antioxidante no variaron significativamente después de 30 días de almacenamiento a 25 °C.

*Trabajo de investigación

** Facultad de ciencias. Escuela de Química. Programa de Maestría en Química.

Directores: Prof. Elena E. STASHENKO, Ph.D., Prof. Jairo René MARTÍNEZ, Ph.D.

Abstract

Title: Stability study and antioxidant properties of a microemulsion that incorporates extracts and essential oils from aromatic plants growing in Santander*

Author: Juan Camilo HENRÍQUEZ SANABRIA**

Keywords: Essential oil, extract, antioxidant, microemulsion, GC/MS, LC/MS.

The skin is exposed to environmental factors, *i.e.*, ultraviolet light, ionizing energy, or xenobiotic substances, that increase oxygen radical species (ROS). When ROS are in excess and exceed the human body antioxidant defenses, oxidative stress is generated, which causes damage to the main human body biomolecules and cause harm. Natural antioxidants such as flavonoids or phenolic acids can be extracted from the residue biomass resulting from distillation of aromatic plants and can be incorporated into a cosmetic product, such as microemulsions, with the aim of decreasing the effects of oxidative stress.

In the present research, a microemulsion with antioxidant activity was developed and its stability was evaluated. The microemulsion incorporated a natural product from one of the following species: *Calycolpus moritzianus*, *Piper marginatum*, *Psidium sartorianum*, *Varronia curassavica* and *Wedelia calycina* as the active ingredient. The active ingredient was selected based on the antioxidant activity results of essential oils, extracts and binary blends of these species. The antioxidant activity was measured by the ABTS+• and β -carotene colorimetric assays. The active ingredient was characterized by GC/MS, HPLC/DAD and UHPL-ESI-Orbitrap-MS. The microemulsion was stored for 30 days at three temperatures (5, 25 and 40 °C) and its physicochemical stability was evaluated after storage.

The *P. sartorianum* extract was selected as the active ingredient to incorporate into the final microemulsion because of its high antioxidant activity among the others essential oils, extracts and binary blends evaluated. In *P. sartorianum* extract were identified two proanthocyanidins, four flavanols, eight flavonols, four flavanones, two sesquiterpenols and two phenolic acids, being the ellagic acid the most abundant compound (400 mg/g extract). The ingredients selected for the microemulsion were avocado oil, water, propylene glycol, Tween® 80, *P. satorianum* extract and *Piper marginatum* essential oil (flavoring). The values of pH, viscosity, conductivity and antioxidant activity were: 5.6, 253 cP, 3.4 μ S/cm and 43.7 μ mol Trolox®/g, respectively. The pH, conductivity and antioxidant activity values did not vary significantly after 30 days of storage at 25 °C.

*Research work

** Faculty of Sciences. School of Chemistry. Master's in Chemistry.

Supervisors: Prof. Elena E. STASHENKO, Ph.D., Prof. Jairo René MARTÍNEZ, Ph.D.

INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo en un sistema biológico es una condición causada por un desequilibrio entre las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) o de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés) y los antioxidantes en un sistema biológico (Sun y col., 2018). El estrés oxidativo produce daños en biomoléculas importantes como proteínas, lípidos y ADN, lo que puede generar diferentes condiciones patológicas como el envejecimiento prematuro, cáncer, aterosclerosis, hipertensión, entre muchas otras (Poljšak y Dahamane, 2012; Birben y col. 2012).

Para un organismo humano, una de las opciones para disminuir el estrés oxidativo es consumir alimentos que contienen sustancias antioxidantes, como carotenos, vitamina C, polifenoles, entre otros (Li, 2011). Las plantas aromáticas producen metabolitos secundarios, muchos de los cuales poseen actividad antioxidante. Diversos estudios (Kulisic y col., 2004; Politeo y col., 2007; Stashenko y col., 2008; Sim y col., 2010; Li y col., 2015) han mostrado que los AE y extractos obtenidos de estas plantas pueden poseer actividad antioxidante similar a la de sustancias sintéticas como el butilhidroxitolueno (BHT) o el butilhidroxianisol (BHA, por sus siglas en inglés). Sin embargo, se ha demostrado que gran parte de las sustancias antioxidantes de las plantas, como los polifenoles, se degradan en el tracto gastrointestinal, por lo que su efecto se ve fuertemente disminuido (Nagula y Wairkar, 2019). Una de las alternativa para evitar esto, es emplear antioxidantes tópicamente mediante su incorporación a un producto cosmético (Kim y Lee, 2018). En algunas investigaciones y patentes, se describen prototipos cosméticos desarrollados, en los que se usan productos naturales de plantas como ingredientes activos, por ejemplo, extractos de *Ginkgo biloba*, *Camellia sinensis*, *Aspathus linearis* y *Sanguisorba officinalis*, en cremas con función antioxidantes y antiarrugas (Chuarienthong y col., 2010; Kim y Lee., 2018).

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

Sin embargo, la capa cornea de la piel es una barrera que impide la penetración efectiva de las moléculas bioactivas hacia capas más profundas de la piel; por lo que muchas investigaciones se han encaminado hacia el desarrollo de nuevos sistemas que permitan una mejor penetración de estas sustancias. Durante los últimos 20 años, diferentes estudios (Kreilgaard, M., 2002; Hathout y col., 2010; Sae-Yoon y Sakdiset, 2020) han sugerido que las microemulsiones tienen el potencial de incrementar la penetración cutánea tanto para moléculas con carácter lipofílico como hidrofílico, en comparación con vehículos tradicionales.

Las investigaciones previas del Centro Nacional de Investigaciones para Agroidustrialización de Especies Vegetales, Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM) (Stashenko y Martínez, 2018), han permitido encontrar algunas de las especies aromáticas que crecen en Santander, y declararlas como promisorias; ello, con base en los resultados de rendimiento, composición química o actividad biológica de sus AE o extractos. Entre estas especies figuran *Calycolpus moritzianus*, *Piper marginatum*, *Psidium sartorianum*, *Varronia curassavica* y *Wedelia calycina*, que se seleccionaron para el desarrollo del presente trabajo de investigación.

El objetivo principal de esta investigación fue el estudio de la estabilidad de una microemulsión antioxidante que incorpora productos naturales obtenidos de plantas promisorias que crecen en el departamento de Santander (Colombia). Para cumplir con este objetivo, de las plantas promisorias, previamente seleccionadas, se obtuvieron AE y extractos. La actividad antioxidante de los AE y extractos se midió usando los ensayos colorimétricos ABTS⁺ y del β -caroteno. Los componentes de la microemulsión se escogieron con base en un diagrama de fases pseudoternarias. La caracterización química de los ingredientes naturales incorporados en la microemulsión se realizó por técnicas cromatográficas y de espectrometría de masas. La microemulsión desarrollada fue almacenada bajo las siguientes tres condiciones: a 5, 25 y a 40

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

°C, y su estabilidad fisicoquímica se estudió midiendo el pH, viscosidad, conductividad; se determinó también su composición química y la actividad antioxidante.

Los resultados mostraron que el extracto de *Psidium sartorianum*, rico en ácido elágico, presentó la actividad antioxidante más alta en comparación con los extractos de otras plantas evaluadas. La actividad antioxidante, el contenido del ácido elágico, el pH y la conductividad de la microemulsión fueron estables, después de almacenar la microemulsión durante 30 días a 25 °C. Futuras investigación se deberán enfocar en el estudio de efectividad de la microemulsión en modelos *in vivo*.

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo de investigación se presentaron en cuatro eventos científicos: (1) 50th *INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ESSENTIAL OILS*, realizado del 9 al 11 de septiembre de 2019 en Viena (Austria), en modalidad póster, titulado “*Use of essential oils and natural extracts of plants that grown in Santander as antioxidants in a cosmetic product*”; (2) I SIMPOSIO DE QUÍMICA-UIS, realizado virtualmente del 3 al 4 de diciembre de 2020, en modalidad de ponencia oral, titulada “Evaluación de la actividad antioxidante de aceites esenciales, extractos y mezclas binarias, de plantas aromáticas que crecen en Santander”; (3) 23rd *INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ADVANCES IN EXTRACTION TECHNOLOGIES* (ExTech XXIII), realizado del 30 de junio al 2 de julio de 2021, de forma virtual, en modalidad póster, titulado “*Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Piper marginatum and Varronia curassavica*” y (4) 34° CONGRESO LATINOAMERICANO DE QUÍMICA (CLAQ 2020), realizado del 11 al 15 de octubre del 2021 en Cartagena (Colombia), en modalidad de ponencia oral, titulada “Estudio de estabilidad y propiedades antioxidantes de una microemulsión que incorpora extracto de *Psidium sartorianum* y AE de *Piper marginatum*”.

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

Esta investigación fue financiada por el Banco Mundial y dirigida por Minciencias, Mineducación, Mincomercio e ICETEX, convocatoria Ecosistema Científico - Colombia Científica, Fondo Francisco José de Caldas, Contrato RC-FP44842-212-2018, Programa Bio-Reto XXI-15:50.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1 MARCO TEÓRICO

2.1.1. La piel y el estrés oxidativo.

La piel es el órgano humano más extenso, su área superficial es entre 1,5 y 2,0 m² (Nichols y Kativar, 2010), sirve como barrera protectora contra daños mecánico, químico y la pérdida de humedad. La piel actúa como regulador de la temperatura (Niki, 2015) y se encuentra dividida, *grossa modo*, en epidermis, dermis y capa subcutánea (Véase **Figura 1**).

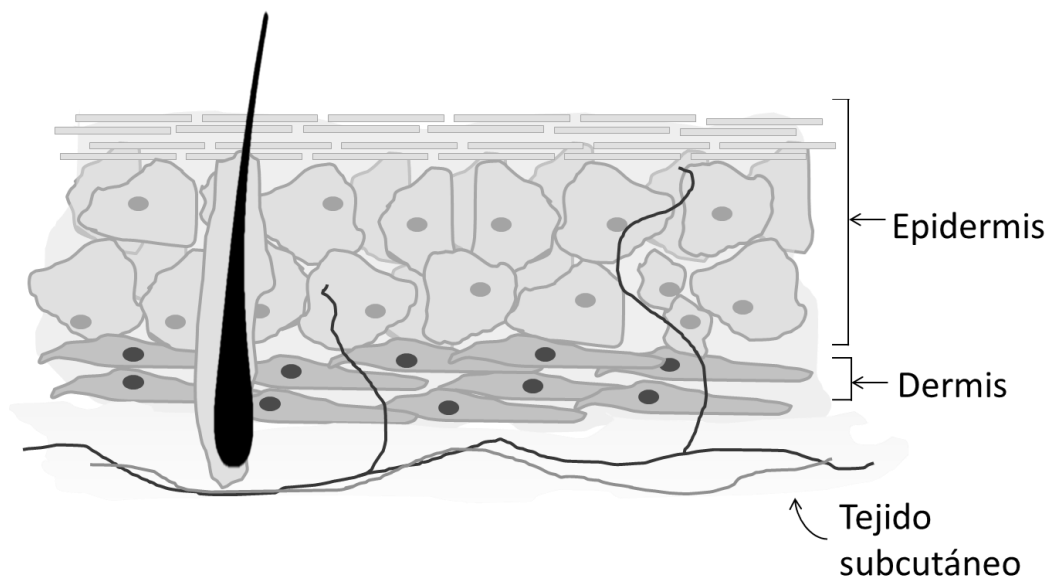
La epidermis es la capa exterior de la piel y se encuentra dividida en cuatro capas, a saber: córnea, granular, espinosa y basal, que actúan como la mayor barrera de la piel. La capa córnea es la capa más externa y dura de la epidermis, está compuesta por queratinocitos que han perdido su núcleo, actúa como una membrana semipermeable e inhibe la entrada de microbios y sustancias químicas. La capa granular está compuesta, principalmente, por queratinocitos planos y actúa como una barrera de fluidos como el agua. La capa espinosa está conformada por queratinocitos que están unidos entre sí por desmosomas, responsables de mantener la estructura y la integridad de la piel. La capa basal está directamente unida a la dermis (Nagula y Wairkar, 2019).

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

La dermis es una capa rica en capilares sanguíneos que proporcionan soporte y nutrición a las células de la epidermis. Esta capa de la piel se encuentra dividida en dos secciones, *i.e.*, dermis papilar y reticular. La dermis papilar es una capa delgada que está compuesta por colágeno libremente dispuesto. La dermis reticular es una capa fina que contiene grasa subcutánea. La mayoría de las células de la dermis son fibroblastos, mastocitos y macrófagos.

La capa subcutánea consiste en adipocitos que le confieren la propiedad de termorregulación, aislamiento del cuerpo y de sistema de almacenamiento de energía. Los adipocitos en la capa subcutánea son de dos tipos, blancos y marrones (Nagula y Wairkar, 2019).

Figura 1. Representación de la piel. Tomado de Nagula y Wairkar (2019), con modificaciones.



La piel está expuesta constantemente a diversos efectos ambientales, como la luz ultravioleta, radiación ionizante, oxígeno, entre otros, que aumentan la cantidad ROS y RNS en la piel. Los ROS incluyen el anión superóxido radical ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($OH^{\bullet}$) y oxígeno singlete (1O_2), que es una especie molecular excitada (Poljšak y Dahamane, 2012a). Los ROS son altamente reactivos, exhiben acciones contra microorganismos patógenos y

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

disminuyen la probabilidad que entren al organismo, previniendo así la infección del cuerpo. La acumulación excesiva de ROS genera un estrés oxidativo, conduce a la degradación de los constituyentes celulares, daño a las principales biomoléculas, *i.e.*, ácidos desoxirribonucleicos, lípidos y proteínas, y al desarrollo de condiciones patológicas como cáncer, desórdenes neurológicos, aterosclerosis, hipertensión, diabetes, envejecimiento prematuro, entre muchas otras (Poljšak y Dahamane, 2012a; Birben y col. 2012).

Los ROS pueden provenir de medios enzimáticos y no enzimáticos. Algunas de las enzimas que generan ROS, tanto como producto principal como subproducto, incluyen las relacionadas con la cadena de transporte de electrones mitocondrial, como NADPH oxidasa, xantioxidorreductasa, peroxisomaloxidasas, enzimas de la familia del citocromo P450, ciclooxigenasas y lipooxigenasas (Rinnerthaler y col., 2015).

2.1.2. Metabolitos secundarios de plantas como fuente de antioxidantes

Los antioxidantes se definen como cualquier sustancia capaz de prevenir, reducir o reparar el daño inducido por ROS/RNS a otra sustancia, y en sistemas biológicos se definen como moléculas que, al estar presente en bajas concentraciones, comparadas con los sustratos oxidables, protegen, previenen o reducen los procesos de oxidación destructivos de biomoléculas (Halliwell, 2007).

Los antioxidantes, según su fuente, se clasifican en endógenos o exógenos. Los endógenos se producen en células y se clasifican como antioxidantes proteicos (peróxido dismutasa, catalasa, ferretina, metalotioneina, entre otros) y no-proteicos (formas reducidas de glutatión y bilirrubina). Los exógenos son aquellos antioxidantes que no se fabrican en las células, sino provienen de la dieta o como aditivos sintetizados en el laboratorio. Algunos ejemplos de los

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

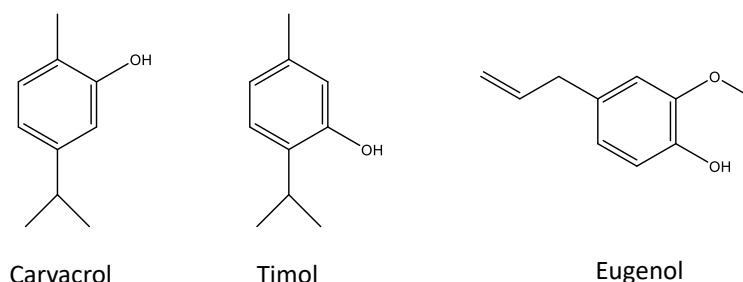
antioxidantes provenientes de la dieta son las vitaminas A, C y E y polifenoles (Li, 2011). Los antioxidantes naturales provenientes de plantas son cada vez más importantes en alimentos, en medicina preventiva y en productos cosméticos (Yanishlieva y col., 2006).

Algunos AE poseen actividad antioxidante por lo que se promocionan como sustitutos de los antioxidantes sintéticos en aplicaciones prácticas (Li y col., 2014). Los AE son mezclas complejas principalmente de terpenoides y derivados de fenilpropanoides volátiles (Fokou y col., 2020), se obtienen de flores, semillas, hojas, tallos, cortezas, madera, raíces o rizomas de plantas aromáticas, por métodos destilativos como arrastre con vapor, destilación con agua-vapor o hidrodestilación. Cuando se emplean solventes, por ejemplo, hexano o fluido supercrítico, se obtienen extractos y no AE (Stashenko, 2009). Diferentes investigaciones han demostrado la actividad antioxidante de los AE (Viuda-Martos y col., 2010; Olivero-Verbel y col., 2010; Dawidowicz y Olszowy, 2014). Stashenko y col. (2008), por ejemplo, determinaron la actividad antioxidante mediante el ensayo de decoloración del catión-radical del ácido 2,2-azinobis-(3-etil-benzotiozolin-6-sulfónico) (ABTS, por sus siglas en inglés) de dos AE de la especie *Lippia origanoides*. Los resultados de esta investigación mostraron que la actividad antioxidante del AE destilado de esta especie vegetal, rica en carvacrol, fue superior a la de BHT y similar a la del α -tocoferol.

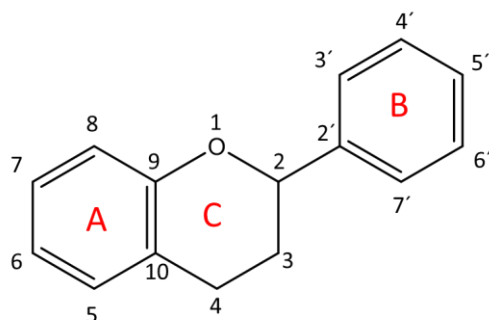
En la investigación realizada por Wang y col. (2017) se evaluó la actividad antioxidante, usando cinco ensayos diferentes, de 26 AE comerciales. La actividad antioxidante más alta se obtuvo para los AE de clavo (rico en eugenol) y tomillo (rico en timol y carvacrol). Las estructuras químicas de estas tres moléculas se muestran en la **Figura 2**. Algunos estudios (Ruberto y Baratta 2000; Mastelic y col., 2008; Horvathova y col., 2014) han mostrado que los fenoles terpénicos timol, carvacrol y eugenol presentaron actividades antioxidantes altas, cercanas a las

de sustancias de referencia como el BHT, α -tocoferol, los ácidos gálico y ascórbico; muchos AE que contienen estos fenoles terpénicos presentan también una actividad antioxidante alta.

Figura 2. Estructuras químicas de los fenoles terpénicos carvacrol, timol y eugenol.



Los flavonoides, que constituyen otro grupo de antioxidantes naturales, son una clase de metabolitos secundarios presentes en plantas vasculares (Agati y col. 2012). Los flavonoides son polifenoles de peso molecular relativamente bajo; en las plantas participan en procesos de pigmentación, inmunización, protección UV y estimulación en la fijación de nitrógeno. La estructura básica de los flavonoides consiste en tres anillos fusionados de $C_6 - C_3 - C_6$, etiquetados como A, C, y B (Patil y Masand, 2018) (Véase **Figura 3.**) Los diferentes niveles de oxidación y patrón de sustitución del anillo C, dan lugar a diferentes clases de compuestos como flavonas, flavononas, flavanoles, flavonoles, flavononoles, isoflavonas y antocianinas; mientras que los compuestos individuales, en cada clase, difieren en el patrón de sustitución de los anillos A y B (Singla y col., 2019).|

Figura 3. Estructura general de los flavonoides.

Los siguientes son dos procedimientos más comunes para la obtención de los flavonoides: (1) extracción líquido-líquido y (2) extracción sólido-líquido. Las técnicas más empleadas son extracción Soxhlet, extracción con solventes asistida por ultrasonido y extracción con fluido supercrítico (Stalikas, 2007). Los solventes frecuentemente usados para la extracción de flavonoides son metanol, etanol, acetona, éter etílico y acetato de etilo y para la extracción de flavonoides muy polares se recomienda el uso de mezclas alcohol-agua (Khoddami y col., 2013).

Los mecanismos de acción de los flavonoides y, en general, de los antioxidantes, pueden incluir entre otros los siguientes: (1) la disminución de las ROS, por inhibición de enzimas o quelación de trazas de elementos (iones metálicos) involucrados en la producción de radicales libres; (2) la reacción directa con las ROS y (3) la regulación o la activación de las defensas antioxidantes propias en las células. Las investigaciones realizadas (Burda y Oleszek, 2001) con flavonoides han evidenciado que la actividad antirradicalaria depende de la estructura y de los sustituyentes del heterociclo y del anillo B. Los aspectos más determinantes de esta capacidad es la presencia de un grupo catecol en el anillo B, que puede donar electrones, por lo que es blanco de radicales, y el enlace doble 2,3- conjugado con el grupo 4-oxo, responsable de la deslocalización efectiva de electrones. La presencia de un grupo 3-hidroxilo en el heterociclo incrementa la actividad

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

antirradicalaria, mientras que grupos hidroxilo en las posiciones 3', 5 y 7 de los anillos A y C, parecen ser menos importantes (Pietta, 2000).

Muchas especies vegetales de las familias Asteráceas, Poáceas, Mirtáceas, Zingeráceas, entre otras, han sido empleadas para la obtención de extractos con actividad antioxidante alta. En la investigación realizada por Saleem y col. (2020) se obtuvieron extractos de partes aéreas y raíces de *Filago germanica* L. (Asteráceas), usando diclorometano y metanol como solventes. La actividad antioxidante de los extractos se determinó mediante los ensayos ABTS^{••}, capacidad antioxidante reductora de iones cúpricos (CUPRAC, por sus siglas en inglés) y quelación de iones metálicos. Los resultados de esta investigación mostraron que los extractos obtenidos con metanol de las partes aéreas de *F. germanica* presentaron la actividad antioxidante más alta, medida por los métodos de ABTS^{••} y CUPRAC. Según el análisis de composición química realizado por HPLC-DAD, en el extracto aparece la epicatequina y el ácido 3-OH-benzoico, en concentraciones de 1,8 y 1,7 µg/g muestra, respectivamente.

Las investigaciones realizadas en CENIVAM con especies aromáticas que crecen en Santander han permitido destacar algunas plantas como promisorias, según rendimiento, composición química y actividad biológica de sus AE o extractos; por lo que estas especies merecen mayor atención y estudios, ya que pueden ser potenciales fuentes de moléculas con propiedades antioxidantes (Stashenko y Martínez, 2018). Como especies promisorias, se destacaron *Calycolus moritzianus*, *Piper marginatum*, *Psidium sartorianum*, *Varronia curassavica* y *Wedelia Calycina*.

2.1.2.1 *Calycolpus moritzianus*

C. moritzianus es un árbol que crece entre los 800 y 3600 m.s.n.m., lo llaman coloquialmente “arrayán”, la planta pertenece a la familia Mirtáceas. Muchas plantas de esta familia se emplean por sus maderas, AE, frutas ricas en vitamina C y antioxidantes (Fermin, 2010). De *C. moritzianus* se obtiene un AE con contenido alto de 1,8-cineol (13-50%), limoneno (20-46%), α -pineno (3-12%), terpinen-4-ol (1-6%), *trans*- β -cariofileno (1-10%) y guaiol (2-12%) (Yáñez-Rueda y col., 2009). El AE de *C. moritzianus* posee las siguientes actividades biológicas: antibacterial, contra *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* (Díaz y col, 2008) y citotóxica contra la líneas de células tumorales HeLa (Yáñez-Rueda y col., 2009), mientras que su toxicidad es baja (Velandía y col., 2016). En los extractos de las hojas de *C. moritzianus* se han identificado kaempferol, miricetina y luteolina (Rivero y col., 2013).

2.1.2.2 *Piper marginatum*

P. marginatum (Piperáceas) es un arbusto que crece abundantemente en la región amazónica y se conoce popularmente como “malvaíscó”. Los extractos de sus hojas han sido empleados en la medicina popular para tratar problemas de hígado y de vesícula, se usan también como tónico con acción carminativa y antiespasmódica (Reigada y col, 2007). Estudios de composición química de sus extractos (de Santos y col., 1998; Reigada y col, 2007; Brú y Guzman; 2016) han mostrado la presencia de propiofenonas, amidas, flavonoides, fenilalkaloides y aristolactamas. En el AE destilado de las partes aéreas de *P. marginatum* de Brasil, se encontraron como compuestos mayoritarios *trans*- β -cariofileno (16-26%), *cis*-asarona (4-30%), *trans*-asarona (6-33 %) y patchulol (7-13 %) (Ribeiro y col., 2016). En el AE destilado de plantas que crecen en Colombia, se encontraron componentes mayoritarios biciclogermacreno (23%), *trans*- β -cariofileno (16%) y 2-metoxi-4,5-metilendioxilpropiofenona (12%); este AE mostró una

actividad antioxidante cuatro veces superior a la de la sustancia de referencia, BHT (Saavedra, 2015).

2.1.2.3 *Psidium sartorianum*

P. sartorianum pertenece a la familia Mirtáceas. Es un árbol que puede crecer hasta 20-28 m de altura (Tuler y col, 2017), se caracteriza por sus pequeños frutos muy aromáticos (Pino y col. 2003) y se conoce popularmente como “guayabito” o “arrayán”. Los extractos de *P. sartorianum* poseen actividades antibacterial (Pio y col., 2013) y antifúngica (Camacho y col., 2004); sin embargo, no se encontraron reportes sobre su composición química. El AE destilado de *P. sartorianum* es rico en limoneno, α -pineno y *trans*- β -cariofileno (Tucker y col., 1995; Pino y col. 2003).

2.1.2.4 *Varronia curassavica*

V. curassavica (Boragináceas) es un arbusto de 0.5 a 4 m de altura, que crece desde el nivel del mar hasta los 2000 m.s.n.m. (Gómez y col., 1999). Los nombres científicos con los que generalmente se pueden encontrar reportes sobre esta planta son *C. salicina*, *C. curassavica*, *C. cylindristachia* (Fernández y col., 2007) y *C. verbenácea* (Sciarrone y col, 2017). Diversas actividades biológicas fueron reportadas para esta especie, entre ellas, se destacan la antiinflamatoria (Fernández y col., 2007), la antiedematigénica (Bayeux y col., 2002), la antibacteriana (Hernández y col., 2003) y la antioxidante (Michielin y col., 2011). Algunos estudios (Santos y col., 2013; Ioset y col., 2000) han reportado efecto citoestático para varios tipos de células cancerígenas, actividad contra el fitopatógeno *Cladosporium cucumerinum*, la levadura *Candida albicans* y la larva del mosquito transmisor de la fiebre amarilla *Aedes egypti*. Se han realizado diferentes estudios (Velde y col., 1982; Gómez y col., 1999, Ioset y

col., 2000; Bayeux y col., 2002; Santos y col., 2013; Hernández y col., 2014; Sciarrone y col., 2017) sobre la obtención de extractos y AE de *V. curassavica*. En los extractos se encontraron dos flavonas: 5,6'-dihidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona y artemitina, dos triterpenoides cordialin A, cordialin B (Velde y col., 1982; Bayeux y col., 2002) y las cordiaquinonas A, B, J, y K (Ioset y col., 2000). En el AE de *V. curassavica* se hallaron como compuestos mayoritarios β -terpineno, α -pineno y sabineno (Gómez y col., 1999; Sciarrone y col., 2017), α -santaleno (Santos y col., 2013), tricleno y germacreno D (Hernández y col., 2014).

2.1.2.5 *Wedelia calycina*

W. calycina es una planta perenne, que pertenece a la familia Asteráceas, y se caracteriza por poseer un olor muy distintivo. De plantas de *W. calycina*, recolectadas en el Estado de Sucre (Venezuela), se destiló el AE con un rendimiento relativamente bajo de 0.025%, rico en sesquiterpenos, *e.g.*, germacreno D (8.8%), como componente mayoritario, seguido de 3,3,7,7-tetrametil-5-(2-metil-1-propenil)-triciclo[4.1.0.0(2,4)]heptano (8.7%), β -sesquifelandreno (7.9%), óxido de cariofileno (5,1%) y octahidro-4,8,8,9-tetrametil-1,4-metanoazulen-7(1H)-ona. Este AE tuvo actividad moderada contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* y *Klebsiella pneumoniae*, aunque no ejerció actividad contra *Escherichia coli*, ni contra *Enterococcus faecalis* (Villarroel y col., 2015). Se han obtenido extractos de *W. calycina* usando cloroformo, se encontraron diterpenos de la familia de *ent*-caurenos (Herz y Kulanthaivel, 1984). Los *ent*-caurenos exhiben propiedades farmacológicas incluyendo antibacterial, antitumoral, antiviral y antiinflamatoria (Ding y col., 2017). En literatura científica no se encontraron reportes sobre la actividad antioxidante de su AE o extractos.

2.1.3. Sinergismo

El sinergismo se observa cuando una mezcla de dos o más sustancias, añadidos al mismo sistema, produce un efecto más pronunciado que el presentado por las sustancias individuales. Existe dos posibles efectos adicionales que se pueden conseguir al combinar sustancias, *i.e.*, antagónico y aditivo (Wang y col., 2011).

Diferentes estudios (Yao y col., 2012; Sharma y col. 2020; Tadtong y col., 2014) se han enfocado en el estudio del sinergismo o antagonismo de productos naturales en una variedad de actividades biológicas, incluyendo la actividad antioxidante. Sharma y col. (2020) investigaron la actividad antioxidante de seis AE y sus mezclas binarias, por el ensayo del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH, por sus siglas en inglés). Los efectos de cada una de las mezclas (sinérgico, antagónico o aditivo) se determinaron por la transformación de los datos experimentales de actividad antioxidante en valores de concentración inhibitoria fraccionada. Según los resultados obtenidos por Sharma y col. (2020) el AE de *Ocimum gratissimum* presentó la actividad antioxidante más alta, seguida de los AE de *Cymbopogon winterianus* y *Mentha longifolia*. Las mezclas binarias que mostraron un efecto sinérgico fueron *O. gratissimum* + *Vitex negundo* y *O. gratissimum* + *Cymbopogon flexuosus*. Las mezclas de los AE de *O. gratissimum* + *C. winterianus* y *O. gratissimum* + *M. longifolia* descubrieron efectos antagónicos. Las mezclas binarias de los AE de *O. gratissimum*, *C. winterianus* y *V. negundo*, con el antioxidante sintético BHT, presentaron un efecto sinérgico.

2.1.4 Métodos para la determinación de la actividad antioxidante

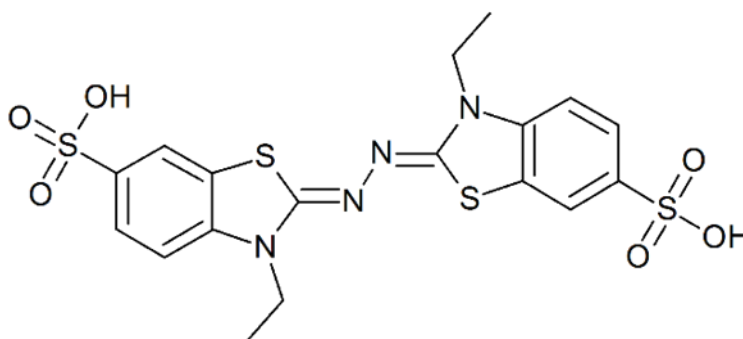
Los métodos para la determinación de la actividad antioxidante se pueden dividir en dos grupos grandes, a saber: (1) *in vitro* e (2) *in vivo*. Los métodos *in vivo* implican que las muestras para

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

evaluar se administran a animales de laboratorio con un régimen definido de dosis descrito para cada método. Después de un periodo dado, los animales se sacrifican y su sangre y tejidos se toman para el análisis. Los siguientes son los principales métodos *in vivo*: capacidad reductora férrica del plasma, estimación del glutatión reducido, estimación del glutatión peroxidasa, glutatión-S-transferasa, método de superóxido dismutasa, catalasa, ensayo de la actividad de la γ -glutamyl transpeptidasa, ensayo de peroxidación lipídica y ensayo de lipoproteínas de baja densidad (Alam y col., 2013).

En los métodos *in vitro*, generalmente, se emplean trampas de radicales libres; son métodos más sencillos para realizar, comparados con los modelos *in vivo* (Alam y col., 2013). Los principales incluyen autografía por cromatografía de capa fina, ensayo de actividad antioxidante celular, método de oxidación del sustrato colorante, capacidad antioxidante reductora del ion cúprico, quimioluminiscencia mejorada, ensayo de reducción del radical DPPH $^{\bullet}$, ensayo del poder antioxidante de reducción de hierro, ensayo de la capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés), ensayo de decoloración del catión-radical ABTS $^{+\bullet}$ (Véase **Figura 4**) (Badarinath y col., 2010) y decoloración del β -caroteno (Marco, 1968).

Figura 4. Estructura química del ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS).



MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

Miller y col. (1993) por primera vez describieron el ensayo de ABTS, que está basado en la técnica de colorimetría. En este ensayo la capacidad de los antioxidantes se mide por la disminución del catión-radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$, que puede desarrollarse por dos mecanismos. El primero se da por la detención inicial de la oxidación y prevención de la producción del $\text{ABTS}^{+\bullet}$. Este catión-radical se produce, cuando el ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) se incuba con una peroxidasa y peróxido de hidrógeno. La interacción de este catión-radical con la ferril mioglobina produce un color azul-verdoso (Badarinath y col., 2010). Sin embargo, la reacción es ambigua, porque los antioxidantes pueden reaccionar con el radical oxidante inicial, la metmioglobina o el $\text{ABTS}^{+\bullet}$, lo que puede causar una sobreestimación de la actividad antioxidante (Schaich y col., 2015). El segundo mecanismo está relacionado con la reacción directa con el $\text{ABTS}^{+\bullet}$, lo que permite evitar el problema del primer mecanismo. El $\text{ABTS}^{+\bullet}$ puede ser generado directamente, con un alto rendimiento mediante el uso de persulfato de potasio como agente oxidante. Los antioxidantes reaccionan únicamente con el $\text{ABTS}^{+\bullet}$ y el color se disminuye con el avance de una sola reacción. La capacidad antioxidante generalmente se reporta como equivalente de Trolox[®] (Schaich y col., 2015).

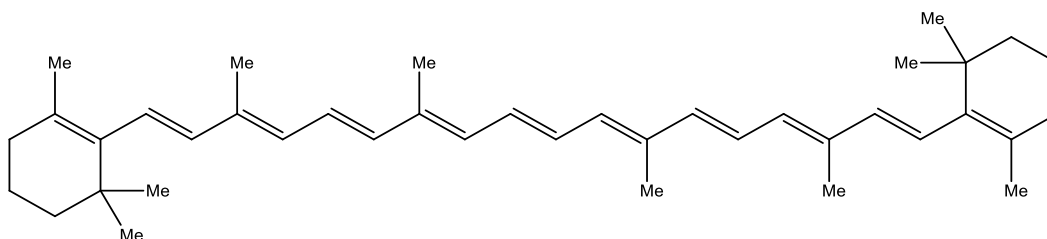
El ensayo de decoloración de β -caroteno fue descrito por Marco (1968) y modificado posteriormente por Miller (1971). El fundamento del ensayo consiste en la minimización de la pérdida del β -caroteno por una oxidación acoplada, inducida térmicamente, en una emulsión (aceite/agua) de ácido linoleico y β -caroteno. El ácido linoleico contiene 18 átomos de carbono, un grupo polar (ácido) y una cola no-polar (hidrocarburo); posee dos enlaces dobles en las posiciones *cis*-C-9-C-10 y *cis*-C-12-C-13. La presencia de los dos enlaces dobles alrededor del carbono C11, debilita el enlace C11-H (Schneider, 2009). La sustracción de un átomo de hidrógeno en C11, proceso esencialmente irreversible, por algún oxidante fuerte, como por

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

ejemplo, el radical hidroxilo ($\text{OH}^\bullet$) (Girotti, 1985), resulta en la formación de un radical del ácido linoleico (radical pentadienilo), con deslocalización de electrón entre los átomos C-9 y C-13. El siguiente paso en la oxidación del ácido linoleico es la adición reversible de oxígeno para la formación del radical peroxilo, que puede tener lugar en las posiciones C-9, C-11 y C-13, con un tiempo de vida media entre los milisegundos y segundos.

Los radicales peroxilo reaccionan con el β -caroteno (Véase **Figura 5**), que es un pigmento natural de 40 átomos de carbono, biosintetizado a partir de ocho unidades de isopreno, altamente insaturado (Shon, 2003), dando como resultado la formación de un radical β -carotenilo estable. Esta reacción disminuye la cantidad enlaces dobles del β -caroteno y como consecuencia la molécula pierde sus propiedades cromóforas y su color naranja característico. Este proceso puede ser monitoreado mediante espectroscopia, en el máximo de absorción del β -caroteno $\lambda=470$ nm (Jayaprakasha, 2001). La presencia de un antioxidante en la emulsión entrará en competencia con el β -caroteno por atrapar los radicales peroxilo (Moon y Shibamoto, 2008). En el ensayo de decoloración del β -caroteno, los antioxidantes hidrofóbicos presentan mayor eficiencia en la actividad antioxidante que los antioxidantes hidrofílicos, por su disponibilidad en la fase oleosa; aquellos, que se combinan mejor en la fase lipídica, interactuarán más eficientemente con los radicales peroxilo [Miraliakbari y Shahidi, 2008].

Figura 5. Estructura del β -caroteno.



2.1.5 Análisis químico de metabolitos secundarios.

Debido a la gran diversidad de metabolitos secundarios que pueden encontrarse en las plantas, existen también, varios métodos para su análisis cualitativo o cuantitativo. Las técnicas que más se emplean son cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS, por sus siglas en inglés), cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS, por sus siglas en inglés), resonancia magnética nuclear (RMN), electroforesis capilar, entre otras. La técnica empleada se escoge según la naturaleza de los analitos, es decir, su peso molecular, la volatilidad, la reactividad, la termoestabilidad, entre otras propiedades (Hill y Roessner, 2013).

La técnica GC/MS es idónea para el análisis de compuestos volátiles, termoestables, no iónicos, de peso molecular y polaridad bajos (Ernst y col., 2014). Esta técnica permite la separación de componentes de una mezcla y su posible identificación mediante la comparación de los espectros de masas obtenidos para cada componente y sus índices de retención con los reportados en literatura (Stashenko y Martínez, 2010).

La combinación de GC/MS con un sistema de micro-extracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) permite la preparación de la muestra para el análisis de compuestos volátiles o semivolátiles en varios tipos de matrices. Este método no requiere el uso de solventes, se emplea menor volumen de muestra, los tiempos de análisis son más cortos y se logra una sensibilidad

alta (Stashenko y Martínez, 2007); la SPME se emplea para el estudio de los metabolitos secundarios de plantas tanto *in vivo*, como *in vitro* (Zhu y col., 2013).

Para el análisis de metabolitos secundarios no volátiles como los flavonoides se usa cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés), que puede estar acoplada a un detector de arreglo de diodos (DAD, por sus siglas en inglés) o a un detector de espectrometría de masas (MS). Este último acoplamiento (LC/MS) emplea diferentes configuraciones e interfaces para la separación de mezclas complejas de compuestos y su posterior ionización, detección e identificación estructural (Mandel, 2017).

2.1.6 Productos cosméticos

Un producto cosmético es toda aquella sustancia o formulación destinada a ser puesta en contacto con las partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar o mejorar su aspecto, protegerlos, mantenerlos en buen estado o corregir los olores corporales (*Federal Food, Drug, and Cosmetic Act*). Esta definición incluye a las fragancias, así como a los productos para el cuidado de uñas, cabello, labios y piel (Smith y col., 2016). Sin embargo, esta definición no es universal. Algunos productos que son considerados como cosméticos en Europa pueden ser clasificados como fármacos en los Estados Unidos, como es el caso de los productos de pantalla solar, anti-transpirantes, preparaciones anticaspa u otros (Nohynek y col. 2010). Desde el punto de vista del cuidado de la piel, los productos cosméticos tienen el propósito de suministrar lípidos y humedad a la piel (Brummer, 2006).

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

Muchos productos cosméticos comerciales son emulsiones, que son sistemas heterogéneos, termodinámicamente inestables, que tienden colapsar con el tiempo, debido a mecanismos fisicoquímicos como separación de fases por gravedad, floculación, coalescencia, maduración de Ostwald o inversión de fases (Otto y col., 2009). Las emulsiones comprenden al menos dos fases líquidas inmiscibles, donde un líquido está disperso (fase dispersa) en otro líquido (fase dispersante) en forma de pequeñas gotas esféricas, que se encuentran en un rango entre los 100 nm y los 100 μ m (McClements, 2012). Las emulsiones cosméticas se clasifican en emulsiones simples y dobles. Las emulsiones simples están divididas en dos tipos: (1) emulsión agua en aceite (W/O, por sus siglas en inglés) y (2) emulsión aceite en agua (O/W, por sus siglas en inglés). Las emulsiones dobles son del tipo agua en aceite en agua (W/O/W) o aceite en agua en aceite (O/W/O) (Kim y Lee, 2018).

En el caso de los productos cosméticos con propiedades antioxidantes, se busca que las sustancias que hacen parte de los principios activos sean capaces de penetrar la piel, por lo que uno de los mayores retos en el desarrollo de productos tópicos es aumentar la absorción del principio activo, sin inducir alteraciones irreversibles de la función de barrera cutánea (Kreilgaard, M., 2002).

Durante los últimos 20 años, un gran número de estudios (Vicentini y col., 2008; Hathout y col., 2010; Lopes y col., 2010; Sae-Yoon y Sakdiset, 2020) ha mostrado que las microemulsiones incrementan la penetración cutánea tanto de moléculas con carácter lipofílico como hidrofílico, comparadas con vehículos tradicionales.

2.1.6.1 Microemulsiones

Las microemulsiones fueron descritas por primera vez por Hoar y Schulman (1943), como sistemas líquidos, constituidos principalmente por una fase oleosa, agua, surfactante y en ocasiones, co-surfactante. Las microemulsiones tienen un amplio rango de combinaciones entre las fases oleosas, agua y surfactantes, sin embargo, en ocasiones, para una composición dada, este rango puede ser muy estrecho. La región de existencia es típicamente descrita a través de diagramas de fases pseudoternarias (Kreilgaard, M., 2002).

Schulman y col. (1959) describieron algunas de las condiciones que se deben cumplir para la formación de las microemulsiones, entre éstas, una tensión interfacial muy baja en la interfaz agua-aceite, la formación de una capa interfacial altamente fluida de surfactante, y la penetración y asociación de las moléculas en la fase oleosa con la capa interfacial del surfactante. La introducción de un co-surfactante al sistema permite, generalmente, la disminución de la tensión interfacial y un aumento de su fluidez.

Contrario a las emulsiones convencionales, las microemulsiones son termodinámicamente más estables, ópticamente isotrópicas, se forman espontáneamente cuando se mezclan en las proporciones adecuadas, sin requerir energía mecánica adicional. Las microemulsiones son más pequeñas que las longitudes de onda de la luz visible ($\lambda < 150$ nm) y pueden presentar tres tipos de estructuras, a saber: (1) gotas miscelares (O/W); (2) gotas miscelares invertidas (W/O) y (3) estructuras bicontinuas (Sjöblom, y col., 1996).

Debido a que la formación de las microemulsiones es un proceso energéticamente favorable, estas pueden formarse espontáneamente, con solo mezclar los componentes que las conforman. El proceso de formación de las microemulsiones está gobernado por la **Ecuación 1**.

$$\Delta G = \gamma \Delta A - T \Delta S \quad \text{Ecuación 1.}$$

Donde ΔG es la energía libre del sistema de la microemulsión, γ es la tensión en la interfaz O/W, ΔA es la variación del área interfacial, T es la temperatura y ΔS es la variación de la entropía del sistema. Para que el sistema sea energéticamente favorable, su energía libre (ΔG) debe ser negativa. El incremento del número de gotas produce un aumento del ΔA , sin embargo, la tensión de la interfaz baja y el aumento de la entropía que ocurren en el sistema de la microemulsión contrarrestan el valor de ΔA . El uso de calentamiento o agitación suele emplearse para superar la barrera cinética o para acelerar los arreglos de las moléculas surfactantes (Pavoni y col., 2020).

En equilibrio las microemulsiones pueden caer en una de cuatro categorías, *i.e.*, microemulsiones Winsor tipo I, II, III, o IV. En una microemulsión tipo Winsor I, existen dos fases, en una fase la microemulsión (O/W) y el exceso de aceite se ubica en la otra fase. En la Winsor II, el surfactante forma una microemulsión (W/O) y el exceso de agua está en una fase separada. En la del tipo III, existen tres fases, una fase constituida por la microemulsión de agua y aceite, en otra fase está el exceso de agua, y en otra, el aceite se encuentra en exceso. La microemulsión Winsor tipo IV, se caracteriza por una sola fase homogénea (Ruckenstein, 1999).

La estructura interna de las microemulsiones constituye un aspecto fundamental para el desarrollo de este tipo de sistemas, que pueden ser complejos, por lo que se requieren técnicas instrumentales sofisticadas para su descripción, entre ellas, figuran RMN, dispersión de rayos X de ángulo pequeño, dispersión de neutrones de ángulo pequeño y dispersión dinámica de luz. Métodos macroscópicos empleados para la descripción física de las microemulsiones incluyen la

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

medición de la viscosidad, conductividad, permisividad dieléctrica, conductividad térmica, calorimetría y espectroscopia infrarrojo (Moulik y Paul, 1998).

2.1.6.1 Pruebas de estabilidad

Las pruebas de estabilidad están compuestas por una serie de ensayos que buscan brindar información sobre la estabilidad de un producto cosmético o farmacéutico y permiten determinar el tiempo de vida media y la fecha de expiración, bajo ciertas condiciones de almacenamiento y empaque. Las pruebas realizadas por periodos largos, generalmente, proporcionan datos de degradación del producto más significativos. Sin embargo, para el desarrollo de nuevos productos se requiere de información sobre su estabilidad en un menor tiempo. Por esta razón, se usan pruebas de estabilidad aceleradas para evaluar de forma preliminar la estabilidad de las formulaciones desarrolladas. Estas pruebas de estabilidad aceleradas requieren menor tiempo entre pruebas y se desarrollan bajo diferentes condiciones de temperatura y humedad (Iskandarsyah y Ranhman, 2018).

2.2 MARCO DE ANTECEDENTES

2.2.1. Panorama general de las investigaciones en productos cosméticos

Los productos cosméticos son un sector importante en la economía mundial. Según el Centro de Comercio Internacional (ITC, por sus siglas en inglés), los productos cosméticos, que incluyen las cremas para el cuidado de la piel, los productos de belleza y para las uñas, generaron ventas superiores a 62 mil millones de dólares en el 2019 (ITC, fecha de consulta: 9 de abril de 2021).

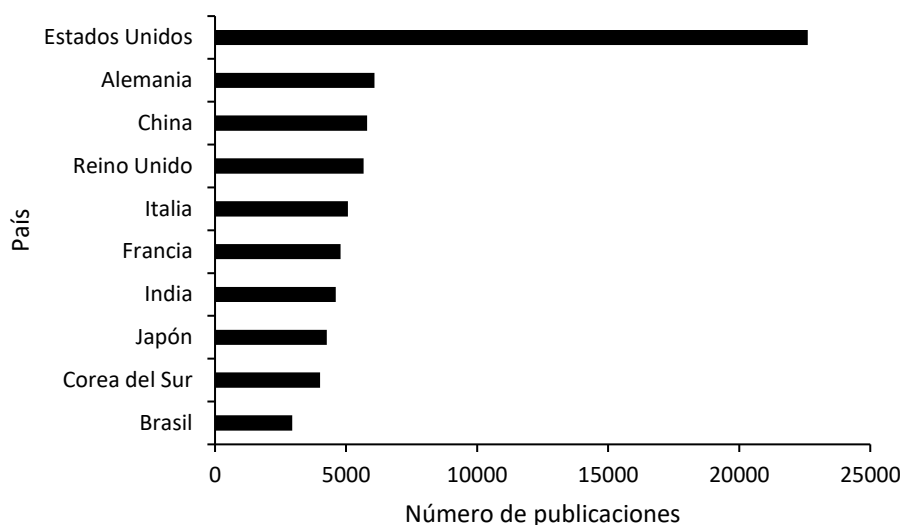
En el 2019, los principales actores económicos en el mercado de los productos cosméticos como exportadores fueron Francia (16%), Singapur (10%), los Estados Unidos (9,8%), Corea del Sur

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

(8,5%) y Japón (7,1%). Colombia ocupó la posición 29 y aportó solo el 0,3% de las exportaciones mundiales. Los países que adquirieron productos cosméticos colombianos estuvieron localizados principalmente en Latinoamérica, entre ellos figuran, México (27%), Perú (19%), Ecuador (18%), Chile (9%) y Panamá (4%). En cuanto a las importaciones, en el año 2019, Colombia adquirió productos cosméticos por un valor cercano a los 140 millones de dólares, sus principales proveedores fueron los Estados Unidos (18%), seguidos de Francia (12%), Brasil (12%), España (11%), China (10%) y otros (ITC, 2021).

Según la búsqueda bibliografía realizada en la base de datos *Scopus* (Elsevier, 2020), desde 1857 se han publicado 96.422 trabajos sobre productos cosméticos. En la **Figura 6**, se muestran los diez países con mayor número de publicaciones: los Estados Unidos, con 22.614 documentos (artículos originales y de revisión, capítulos de libros y otros), seguido de Alemania (6.082 documentos), China (5.804 documentos), Reino Unido (5.666 documentos), e Italia (5.072 documentos). Se evidenció que aquellos países que realizaron una producción científica mayor sobre los productos cosméticos son también los contribuyen más en este mercado.

Figura 6 Países en donde se ha investigado y publicado sobre productos cosméticos. Base de datos Scopus (Elsevier, 2021). Periodo de observación 1847-2020. Palabra-clave: “Cosmetics”. Fecha de consulta: 9 de abril de 2021.



En Colombia, se han realizado 283 publicaciones, lo que representa tan solo el 0,3% de las investigaciones reportadas en el mundo para el mismo periodo. Las universidades que más han contribuido en esta área de investigación son la Universidad de Antioquía (45), Universidad Nacional (39), Universidad de Cartagena (17), Universidad de los Andes (14), Universidad Pontificia Bolivariana (12), Universidad Industrial de Santander (11), entre otras. Los temas de mayor interés se ubican en áreas de medicina (114), agricultura y ciencias biológicas (58), farmacología, toxicología y farmacéuticos (52), ingeniería química (48), bioquímica, genética y biología molecular (35).

La investigación realizada por Delgado y col. (2020) es un ejemplo interesante, porque los autores usaron los desechos de granos de café, como ingrediente activo en la formulación de un prototipo cosmético con propiedades exfoliantes y antioxidantes. El método empleado para la determinación de la capacidad antioxidante fue el ensayo de decoloración del ABTS⁺. A los

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

prototipos de cremas diseñados se les evaluaron la estabilidad física (perfil reológico, viscosidad, estabilidad en condiciones de estrés de temperaturas alta y baja y centrifugación) y ensayos microbiológicos. Los resultados mostraron que la actividad antioxidante de los prototipos formulados varió entre 56 y 128 μmol equivalente Trolox[®], los pH fueron ligeramente básicos (7,2 – 7,9). La viscosidad del prototipo de crema con el contenido de polifenoles y actividad antioxidante más alta fue de 35.82 N·s/m², el producto se comportó como un fluido no newtoniano, es decir, no presentó una relación constante entre la viscosidad y el gradiente de velocidad, lo cual demuestra un comportamiento pseudo-plástico, común para las emulsiones.

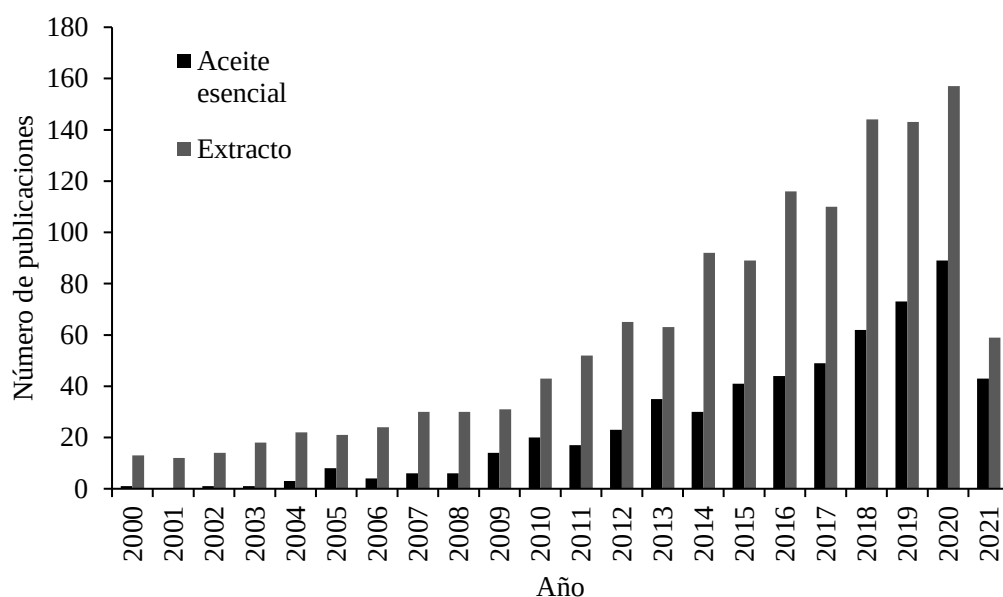
2.2.2 Uso de microemulsiones como prototipos cosméticos

Las microemulsiones han sido empleadas en diferentes industrias, desde el recobro mejorado en los años 70, hasta diferentes áreas de industrias químicas, incluyendo el sector cosmético y farmacéutico a comienzos del siglo XXI (Grampurohit y col., 2011). El amplio espectro de aplicaciones de las microemulsiones se refleja en el número alto de investigaciones realizadas sobre este tema. Según una búsqueda bibliográfica realizada en la base de datos *Scopus*, se han otorgado 64.043 patentes y se han publicado 20.835 documentos [artículos originales (82,5%), documentos de sesión (7,9%), artículos de revisión (6,9%), capítulos de libro (1,1%), entre otros]. Las principales áreas de interés de estas publicaciones abarcan química (22,9%), ciencias de materiales (16,2%), ingeniería química (13,6%), farmacología, toxicología y farmacia (9,3%).

En cuanto al uso de los AE y extractos para el desarrollo de microemulsiones, según la anterior ecuación de búsqueda, se han publicado 577 documentos relacionados con AE y 1375, con extractos. En la **Figura 7**, se reporta el número de publicaciones, según año, sobre microemulsiones, en la que emplearon AE o extractos naturales. Se evidenció un incremento en

la publicaciones, lo que puede significar un interés científico creciente sobre el desarrollo de microemulsiones con incorporación de estos productos naturales.

Figura 7. Número de publicaciones sobre microemulsiones que incorporan AE o extractos. Base de datos Scopus, ecuaciones de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY (microemulsion AND “essential oil”)* y *TITLE-ABS-KEY (microemulsion AND extract)*; periodo de observación: 2000-2021; fecha de consulta 12 de abril de 2021.



García y col. (2021) incorporaron un extracto glicólico de *Teobroma cacao*, rico en flavonoides y metilxantinas (cafeína y teobromina), en una microemulsión para el cuidado de la piel. La microemulsión estuvo compuesta de una fase acuosa [agua -poli(etilenglicol) 400 o agua-propilenglicol], una fase oleosa (ácidos grasos de cadena media) y un surfactante polisorbato 80 (Tween[®] 80). La relación de los componentes se escogió, según los resultados mostrados en un diagrama de fases pseudo-ternarias. Para evaluar la estabilidad, la microemulsión se centrifugó a 171,36 RFC (fuerza centrífuga relativa), por 30 min a 25 °C; se estudiaron también parámetros

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

como pH, conductividad, potencial Z, tamaño hidrodinámico de las gotas, índice de polidispersidad y perfil reológico, a las 24 h y 45 días, después de la preparación de la microemulsión, que resultó ser estable y los parámetros estudiados no variaron significativamente.

Ferreira-Nunes y col. (2018) emplearon el extracto acuoso de *Eugenia dysenterica* (fam. Mirtáceas) como ingrediente activo en una microemulsión con actividad antioxidante. Los autores formularon microemulsiones O/W y W/O; para esto, evaluaron diferentes combinaciones de los surfactantes Labrasol[®], Prulol[®] y Tween[®] 80. Las combinaciones de los ingredientes se seleccionaron usando diagramas de fases pseudo-ternarias para cada tipo de emulsión. Los autores estudiaron la penetración en la piel de catequina, principal flavonoide en el extracto de *E. dysenterica*, en los dos tipos de microemulsiones W/O y O/W. Los resultados mostraron que la microemulsión O/W permitió la penetración de la catequina a las capas más internas de la piel.

Tunit y col. (2020) emplearon los aceites vegetales de semilla de *Moringa oleifera* y *Perilla frutescens* como componentes de la fase oleosa de una microemulsión incorporada en una crema dermocosmética. Los autores evaluaron la actividad antioxidante de los aceites vegetales individualmente y en mezcla y de la microemulsión, por medio del ensayo DPPH[•]. La microemulsión presentó actividad antioxidante más alta que la de los aceites vegetales evaluados de manera individual o en mezcla. Los parámetros como pH, potencial Z, diámetro hidrodinámico, índice de polidispersidad, evaluados en las microemulsiones recién preparadas y 45 días después, fueron estables.

Oliveira y col. (2021) incorporaron en una microemulsión, que contenía citosan al 5%, una mezcla de AE de *Melaleuca alternifolia* y extracto de *Amphipterygium adstringens*, con posible

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

uso contra la vulvovaginitis candidiásica, basado en los resultados previos de estudios *in vitro* contra *Candida albicans*. Los investigadores emplearon un diagrama de fases pseudo-ternarias para describir el rango de concentraciones de la fase acuosa [agua–propilenglicol o agua–poli(etilenglicol) 400], fase oleosa (miristato de isopropilo) y el surfactante Tween[®] 80, en la que se formaban las microemulsiones. A cada microemulsión seleccionada, se le evaluaron los parámetros descritos por Garcia y col. (2021), antes y después del almacenamiento por 45 días a 25 y 40 °C. Se observó el comportamiento newtoniano de las microemulsiones, mientras que sus parámetros no cambiaron significativamente después de la adicción de la mezcla herbal.

Cheng y col. (2020) desarrollaron un prototipo de microemulsión contra el acaro *Tetranychus cinnabarinus*, el ingrediente activo que emplearon fue el AE de rizomas de *Curcuma longa*. La microemulsión se preparó por el método de titulación acuosa en un baño de ultrasonido (40 kHz, 25 °C). Los autores usaron diferentes tipos de surfactantes (Span[®] 60, AE0-3, NP-4 y Tween[®] 80) y de co-surfactantes (metanol, etanol, *iso*-propanol y *n*-butanol). La mejor combinación de fases se escogió con base en los resultados obtenidos en los diagramas de fases pseudo-ternarias. El prototipo de microemulsión desarrollada mostró una mayor eficacia contra el acaro que el AE de *C. longa*, sus propiedades fisicoquímicas fueron estables durante el periodo evaluado (un mes).

de Sá y col. (2020) emplearon los AE de *Cinnamomum zeylanicum* (corteza y hojas), *Syzygium aromaticum* y *Citrus sinensis* en una microemulsión con potencial para aclarar la piel, debido al efecto inhibidor de la enzima tirosinasa, importante en el proceso de melanogénesis. La actividad antioxidante de los AE incorporados en las microemulsiones fue evaluada por los métodos de DPPH[•], decoloración de catión-radical ABTS^{•+} y el ensayo de decoloración del β -caroteno. La microemulsión base se seleccionó de acuerdo con un diagrama de fases pseudo-ternaria. Las

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

microemulsiones con y sin AE incorporados fueron isotrópicas y presentaron comportamiento newtoniano. La microemulsión con el AE de corteza *C. zelanicum* mostró la actividad biológica y la estabilidad más altas.

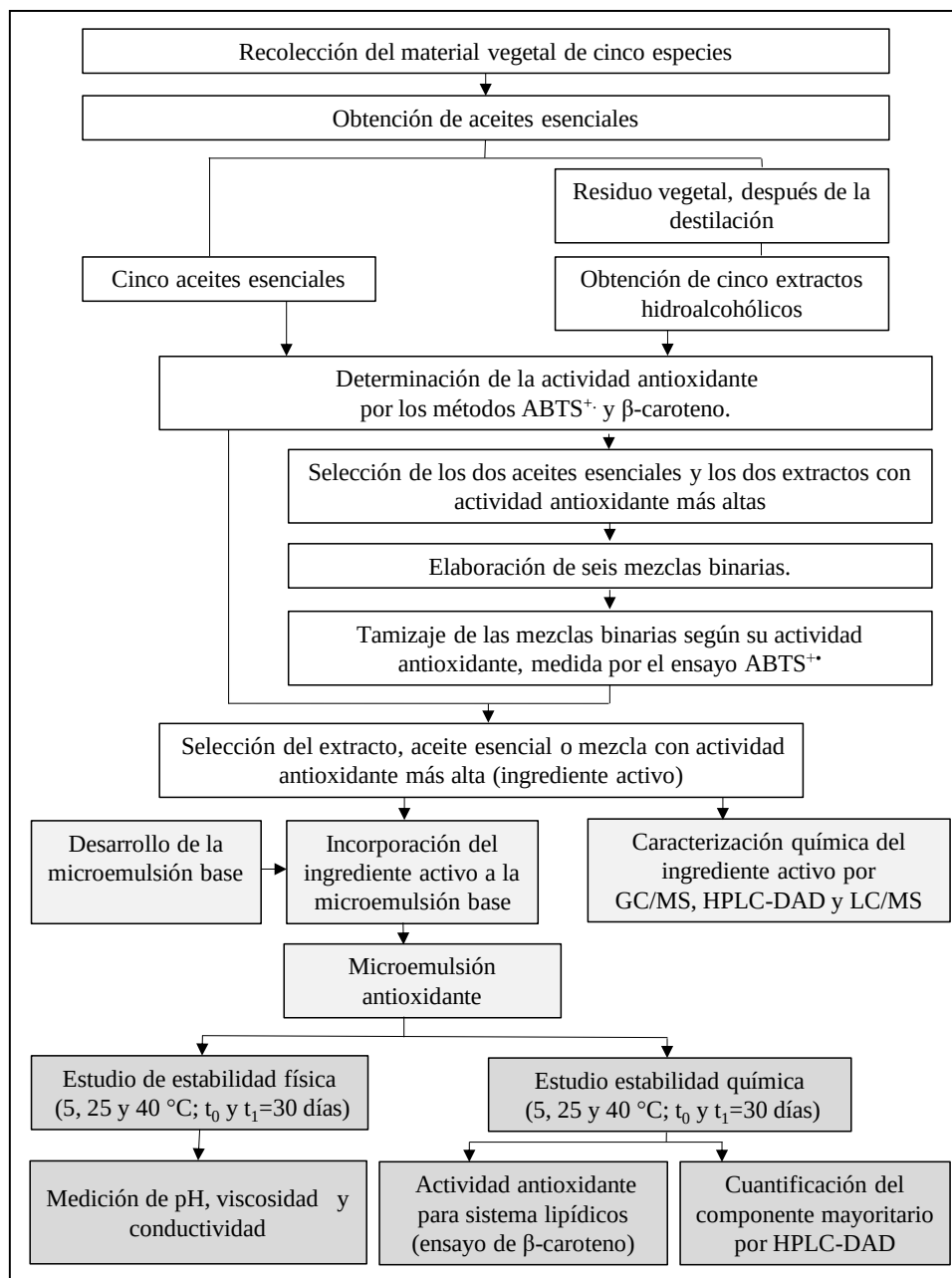
Los ejemplos de algunas investigaciones recientes con el uso de los ingredientes naturales para el desarrollo de microemulsiones con fines cosméticos y terapéuticos, dan una idea sobre las aplicaciones que pueden tener las microemulsiones en productos cosméticos. La estabilidad de estos sistemas es uno de los aspectos para destacar, puesto que en la mayoría de las investigaciones no se observaron la separación de fases, el incremento o disminución considerable de pH o la variación significativa de la viscosidad. La penetración de los componentes a las capas más profundas de la piel es quizá el aspecto de mayor relevancia, debido a que se asegura la acción de los componentes con carácter lipofílico y con actividad antioxidante en aquellos sitios de la piel, en donde ocurren los procesos oxidativos.

En conclusión, la microemulsiones son vehículos adecuados para la liberación en la piel de compuestos naturales con actividad antioxidante, presentes en los extractos y AE. Se requieren investigaciones sobre composición química y actividad biológica que permitan conocer de cuáles especies de plantas que crecen en el departamento de Santander (Colombia) se pueden obtener AE o extractos con actividad antioxidante alta, para que sirvan como ingredientes de las microemulsiones. El desarrollo de las microemulsiones para fines cosméticos debe incluir pruebas que indiquen las condiciones de almacenamiento en las que los prototipos desarrollados son estables. Estas investigaciones podrían ayudar para posicionar a Colombia como un contribuyente importante en el campo de los ingredientes naturales para los productos de cuidado de la piel.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El esquema general de la metodología desarrollada en el presente trabajo de investigación se muestra en la **Figura 8**.

Figura 8. Esquema general de la metodología usada en el presente trabajo de investigación.



3.1 REACTIVOS

El α -pineno (>98%), limoneno (>97%), *trans*- β -cariofileno (>98,5%), óxido de cariofileno (>95%) α -humuleno, ácido gálico (>97,5%), cianidina-3-*O*-rutinósido (>98%), pelargonidina (>90%), taxifolina (>85%), rutina (>94%), ácido elágico (>95%), ácido rosmarínico (>96%), quercetina (>98%), naringenina (>97,5%), apigenina (>95%), kaemferol (>90%), pinocembrina (>95%), galangina (>95%), ácido carnósico (>91%), ácido *p*-hidroxibenzoico (>99%), ácido clorogénico (>95%), ácido cafeico (>98), ácido *p*-cumárico (>98%), ácido ferúlico (>99%), quercitrina (>78%), ácido *trans*-cinámico (>99%), sakuranetina (>95), ácido vanílico (97%), epicatequina galato (>95%), luteolina-7-*O*-glucósido (>98%), β -caroteno (>93%), ABTS (>98%), persulfato de potasio (>97%), acetato de sodio (>99,99%), BHT (>99%), α -tocoferol (97%) y Trolox[®] (>97%) se obtuvieron de *Sigma-Aldrich* (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EE. UU.). El erioditiol (>95%) se adquirió de *Santa Cruz Biotechnology* (*Santa Cruz Biotechnology*, Dallas, TX, EE. UU.). La luteolina (>99%) se obtuvo de *AK Scientific* (*AK Scientific*, Union City, CA, EE. UU.). El quercetina-3-*O*-glucósido (>90%), cianidina-3-*O*-glucósido (>98%), cianidina-3,5-*O*-glucósido (>98%), delfinidina-3-*O*-glucósido (>95%), pelargonidina-3-*O*-glucósido (>95%), epicatequina (>95%), cianidina (>90%), catequina (>95%), delfinidina (>90%), dihidrokaemferol (>95%) se adquirieron de *PhytoLab GmbH & Co.* (*PhytoLab GmbH & Co.*, Vestenbergsgreuth, Alemania). El sulfato de sodio anhidro (>99,1%), etanol (>99,8%), metanol (>99,8%) se obtuvieron de *Mallinckrodt Baker Inc.* (*Mallinckrodt Baker Inc.*, J.T Baker, Phillisburg, NJ, EE. UU.) El gel de sílice-C₁₈ fue de *Silicycle* (*Silicycle*, Quebec, Canadá). El metanol, *n*-hexano, isopropanol, acetonitrilo grado LC/MS y ácido fórmico grado *Suprapur* fueron de Merck (Merck, Darmstadt, Alemania). Las mezclas de *n*-alcanos C₈-C₂₅ se obtuvieron de *AccuStandard, Inc.* (*AccuStandard, Inc.*, New Haven, CT, EE. UU.). Los gases helio, aire,

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

hidrógeno y nitrógeno (99,995%) para GC fueron de *Messer* (*Messer*, Bucaramanga, Colombia).

El agua Tipo 1 se obtuvo usando un sistema de purificación *Millerpore UV Synergy* (*Millerpore UV Synergy*, Molsheim, Francia).

3.2 MATERIALES

Las plantas de *C. moritzianus*, *P. marginatum*, *P. sartorianum*, *V. curassavica* y *W. calycina* se recolectaron durante la salida botánica organizada por el grupo de investigación CIBIMOL en el departamento de Santander, Colombia (8 de marzo de 2019). Las plantas fueron identificadas por el profesor Dr. Robert Tulio GONZÁLEZ. El material vegetal se almacenó bajo sombra, en un vivero de secado hasta su destilación. El material vegetal, después de su destilación, se secó y se usó para extracción con solvente.

El material vegetal y sus productos derivados fueron proveídos por el Estado Colombiano, a través del Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible: Contrato de acceso a recursos genéticos y productos derivados con fines de bioprospección N° 270 – Universidad Industrial de Santander.

3.3 OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

Los AE de las especies vegetales se obtuvieron en un equipo de destilación tipo Clavenger mediante la técnica de hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD, por sus siglas en inglés), como está descrito por Stashenko y col. (2004). Los AE se secaron con sulfato de sodio anhidro y se almacenaron en un refrigerador a 4 °C, hasta su análisis y uso. Los rendimientos de extracción de los AE se calcularon como la relación de la masa del AE obtenido (m_{AE}) y la masa de material vegetal empleado (m_{mv}) en la extracción, según la **Ecuación 2**.

$$Rendimiento, \% = \left(\frac{m_{AE}}{m_{mv}} \right) * 100$$

Ecuación 2

El material vegetal de cada especie, después de su destilación, se secó en bandejas en un vivero de secado ubicado en el complejo CENIVAM, y se usó posteriormente para la obtención de extractos con solventes.

3.4 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS.

Con el fin de aprovechar la biomasa de forma integral, el material vegetal después de su destilación se sometió a la obtención de extractos con alcohol. En los trabajos previos, realizados en el Centro de Investigación CENIVAM, se mostró que el material vegetal, después de su destilación aún contiene compuestos bioactivos, por ejemplo, los flavonoides (Arias y col., 2020). El material vegetal de cada especie, después de su destilación, se secó, se molió y se sometió a una extracción sólido-líquido, para lo cual se empleó etanol al 70% como solvente. La relación entre solvente de extracción y el material vegetal fue 20:1. La extracción sólido-líquido se realizó en un baño de ultrasonido *Elmasonic S15H* (*Elmasonic*, Signen, Alemania) (37 kHz), por 1 h a 50 °C. La mezcla se filtró y concentró en un rotoevaporador *Heidolph® Basis Hel-Vap HL* (Schwabach, Alemania). Cada extracto se secó en un liofilizador *VirTis® AdVantage Plus* (New York, EE. UU.) y se almacenó en un recipiente de vidrio color ámbar, en atmósfera de nitrógeno, hasta su análisis y uso.

3.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

La actividad antioxidante de los AE y los extractos obtenidos, se estudió usando los métodos de decoloración del ABTS^{••} y del β-caroteno. Las mediciones de absorbancia se realizaron en un lector de microplacas (*Thermo Scientific Varioskan LUX Multimode Microplate Reader*,

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

Sunnyvale, EE. UU.), provisto de 96 pozos y equipado con un módulo de absorbancia (UV-Vis). La actividad antioxidante se expresó en equivalentes de Trolox[®], como sustancia de referencia, por lo cual se realizaron las respectivas curvas de calibración. Los valores se reportaron como μmol de Trolox[®]/g de muestra. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

3.5.1 Ensayo de decoloración de ABTS^{•+}.

Para el ensayo de decoloración de ABTS^{•+}, se siguió la metodología descrita por Arias (2012). En una solución (50 mL) de acetato de sodio (20 mM, pH=4.5) se hicieron reaccionar, durante 24 h y, en ausencia de luz, el ABTS (192 mg) y el persulfato de potasio (PDS) (33 mg), para producir el catión-radical ABTS^{•+} de coloración azul intenso. Las concentraciones finales del ABTS y el PDS, fueron 7 mM y 2.45 mM, respectivamente. Con la solución *stock* del catión-radical ABTS^{•+} se prepararon las soluciones de trabajo, con absorbancia de $0,71 \pm 0,1$. Las lecturas de absorbancia se tomaron a una longitud de onda $\lambda=750$ nm y a una temperatura de 25 °C.

Las muestras se diluyeron en etanol absoluto, de tal forma que la inhibición del catión-radical ABTS^{•+} estuviera entre 10% y 90%. Para esto, se agregaron 10 μL de las muestras diluidas a los pozos y se completaron con 190 μL de la solución de trabajo del catión-radical ABTS^{•+}. El valor de absorbancia para cada muestra se comparó con el de un blanco de reacción. Para la cuantificación de la actividad antioxidante se obtuvieron los porcentajes de inhibición de la decoloración del catión-radical ABTS^{•+} (**Ecuación 3**). Estos valores se interpolaron con la curva de calibración de Trolox[®] (50-550 μM Trolox[®]). El BHT y el α -tocoferol se emplearon como sustancias de referencias.

$$\text{Inhibición de } A_{\lambda=750 \text{ nm}}, \% = \left(\frac{A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{blanco}}} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 3.}$$

Dónde, A_{blanco} es la absorbancia medida del blanco de reacción (catión-radical ABTS⁺ sin inhibir) y A_{muestra} es la absorbancia medida, 30 min después de agregar la muestra.

3.5.2 Ensayo de decoloración del β -caroteno.

Para la evaluación de la actividad antioxidante por el ensayo de decoloración del β -caroteno, se preparó una emulsión de β -caroteno de la siguiente forma: se pesó el β -caroteno (1 mg) y se disolvió en cloroformo (100 μ L); se tomaron 10 μ L de esta solución y se depositaron en un tubo cónico que contenía de Tween[®] 40 (100 mg) y de ácido linoleico (10 mg), la mezcla se agitó a 3000 rpm en un *minishaker* (IKA, Hofheim, Alemania) por 10 s. Posteriormente, el cloroformo se evaporó con flujo de nitrógeno por 3 min a la temperatura del laboratorio (27 °C). A la mezcla evaporada, se adicionó agua Tipo 1 (1 mL) y se agitó por 1 min, a 3000 rpm. La emulsión formada se depositó en un balón de 25 mL. El tubo cónico se lavó tres veces con agua Tipo 1. Una solución de PDS al 1% (3 mL) se agregó como agente co-oxidante y se aforó con agua Tipo 1.

Las muestras se diluyeron con el etanol absoluto (*Merck KGaA*, Darmstadt, Alemania) de tal forma que la inhibición de la oxidación del β -caroteno estuviera entre 10% y 90%. De cada dilución, se tomaron 10 μ L, que se depositaron en los pozos de la microplaca y se adicionaron 190 μ L de la emulsión de β -caroteno. La lectura se realizó a la longitud de onda de $\lambda = 450$ nm, a la temperatura de 45 °C.

El porcentaje de inhibición de la oxidación del β -caroteno por los extractos se calculó de acuerdo con la **Ecuación 4**:

$$Inhibición_{\lambda=450\text{ nm}}, \% = \left(\frac{A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{blanco}}} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 4.}$$

Donde A_{blanco} es la diferencia de los valores de absorbancia para el blanco [emulsión de β -caroteno (190 μL) y etanol (10 μL)] entre tiempo inicial y a los 60 min de la reacción; y A_{muestra} es la diferencia de los valores de absorbancia de la muestra, medidos entre el tiempo inicial y a los 60 min de la reacción. Los valores de porcentajes de inhibición de los extractos fueron interpolados en una curva de calibración de Trolox[®]. Para cada ensayo, una solución de Trolox[®] (20 μM) se incluyó como control.

3.6 DISEÑO DE MEZCLAS BINARIAS DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS

Una vez determinada la actividad antioxidante de los AE y extractos, se escogieron los dos AE y los dos extractos hidroalcohólicos con la actividades antioxidante más alta, para luego obtener seis mezclas binarias, necesarias para el estudio de los efectos aditivo, sinérgico o antagónico. Para cada mezcla binaria se realizaron tres combinaciones. La actividad antioxidante de cada combinación se evaluó por el ensayo de decoloración de catión-radical ABTS⁺.

3.7 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS INGREDIENTES NATURALES

Según los resultados obtenidos sobre la actividad antioxidante, se escogió el extracto de *Psidium sartinianum* como el ingrediente activo para el desarrollo de la microemulsión. El AE de *Piper marginatum* se empleó como aromatizante. Las composiciones químicas del AE y del extracto se estudiaron por GC/MS y LC/MS, respectivamente.

3.7.1 Análisis por GC/MS del aceite esencial de *Piper marginatum*.

La composición química del AE de *Piper marginatum* se estudió por GC/MS. El análisis se realizó en un cromatógrafo de gases (GC 6890 *System Plus*, *Agilent Technologies*, AT, Palo Alto, CA, EE. UU.) con detector selectivo de masas (MSD 5973 Network, AT, Palo Alto, CA, EE. UU.), usando ionización con electrones (EI, 70 eV). La inyección se hizo empleando un inyector automático AT, operado en modo *split* (relación 1:30), la temperatura del puerto de inyección fue de 250 °C. Los componentes de la mezcla se separaron según: (1) sus temperaturas de ebullición, en una columna apolar, DB-5MS (*J & W Scientific*, Folsom, CA, EE. UU.) de 60 m x 0,25 mm, d.i. x 0,25 µm, d_f, con la fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano) y (2) sus momentos dipolares, en una columna polar DB-WAX de 60 m x 0,25 mm, d.i. x 0,25 µm, d_f, con la fase estacionaria de poli(etilenglicol) del mismo fabricante. La presión inicial en la cabeza de la columna fue 113 kPa, se mantuvo el flujo constante (1,0 mL/min) del gas de arrastre helio (99,995%, *Messer*, Bucaramanga, Colombia). La temperatura del horno cromatográfico se programó de 50 °C (5 min) a 150 °C (2 min) @ 5 °C/min, luego, hasta 230 °C (10 min), @ 5 °C/min. Cuando se utilizó la columna DB-5MS, se empleó una rampa con calentamiento adicional, hasta 275 °C (15 min), @ 10°C/min. La temperatura de la línea de transferencia fue de 285 °C. El rango de masas usado para la adquisición en modo *full scan* fue *m/z* 45-450 u, con velocidad de adquisición de 3,58 *scan/s*, usando el *software* MSDChemStation Ver. G1701DA AT. La identificación de los compuestos se realizó con base en los índices de retención lineales (LRI) y por comparación de los espectros de masas obtenidos experimentalmente con los reportados en las bases de datos Adams 2004, NIST 2014 y Wiley 2008; se usaron también las sustancias-patrón disponibles.

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

Los LRI se calcularon a partir de los tiempos de retención de una mezcla de patrones de hidrocarburos lineales desde n -C₁₀ hasta n -C₂₅ (GRO-AK-101-NAS-10X y DRO-AK, -102-NAS-10X, AccuStandard®, New Haven, CT, EE. UU.), según la ecuación de H. van der Dool y D.J. Kratz (**Ecuación 5**), así:

$$\text{LRI} = 100n + 100 \frac{(t_{R\ X} - t_{R\ n})}{(t_{R\ N} - t_{R\ n})} \quad \text{Ecuación 5.}$$

Dónde: n es el número de átomos de carbono en la n -parafina que eluye antes del compuesto de interés ($t_{R\ X}$); $t_{R\ n}$ y $t_{R\ N}$ son tiempos de retención de las n -parafinas con los números de átomos de carbono n y N , respectivamente, que eluyen inmediatamente antes y después del analito de interés.

Tratamiento de la muestra: se tomó una alícuota del AE (50 μ L) y se disolvió en diclorometano hasta aforo (1 mL).

Para la determinación de la composición elemental de algunos compuestos no identificados en el AE, con áreas relativas superiores a 0,5%, se realizó su análisis por GC/MS acoplada al espectrómetro de masas, usando analizador de masas de tiempo de vuelo de alta resolución (GC-ToF-HRMS) en un equipo *LECO Pegasus® GC-HRT* 4D (Saint Joseph, MI, EE. UU.), en una columna apolar de [5%-fenilpoli(metilsiloxano), 100 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 μ m df] (Rxi-5MS) (*Restek*, PA, EE. UU.) El modo de inyección fue *split* (relación 1:30). La temperatura del puerto de inyección fue 250 °C, y el volumen de inyección fue 1 μ L. Se usó la ionización con electrones (EI, 70 eV). Los datos obtenidos se analizaron con el *software Chroma TOF*, versión 1.9 de LECO.

3.7.2 Cuantificación de los componentes del aceite esencial de *Piper marginatum* por cromatografía de gases con detector de ionización en llama.

La cuantificación de los compuestos (cantidad relativa >0,2%) se realizó por el método de calibración externa empleado un cromatógrafo de gases con detección de ionización en llama (FID) (AT 68900N, Palo Alto, CA, EE. UU.). Se usó una columna DB-5 [5%-fenil-poli(metilsiloxano) de 60 m x 0,25 mm, d.i. x 0,25 μ m, d_t], el modo de inyección fue *split* (relación 1:30), la temperatura del inyector fue 250 °C y el volumen de inyección fue 1 μ L. La siguiente fue la programación de la temperatura del horno cromatográfico en la columna apolar: 45 °C (5 min), luego, se calentó a 150 °C, a razón de 4 °C/min, y se mantuvo por 2 min, luego, la temperatura se elevó hasta 250 °C, a razón 5 °C/min, se mantuvo por 5 min, por último, se llevó a 300 °C, a una velocidad de 10 °C/min y se mantuvo por 16 min. La temperatura del FID fue 280 °C. Se empleó α -pineno para la cuantificación de los hidrocarburos monoterpénicos, monoterpénos oxigenados y compuestos oxigenados no isoprenicos (con número de átomos de carbono menor de 15), suponiendo que los factores de respuesta de estos compuestos sean similares al del α -pineno. Para la cuantificación de los hidrocarburos sesquiterpénicos, sesquiterpenos oxigenados y compuestos oxigenados no isoprenoides con 15 átomos de carbono, se empleó *trans*- β -cariofileno, suponiendo la similitud de su factor de respuesta con los de los sesquiterpenoides. Se prepararon soluciones de α -pineno en dos niveles de concentración: un nivel bajo, en un rango de concentraciones entre 0,1 y 1 g/L, y un nivel alto, en el rango de concentraciones entre 1,2 y 10,1 g/L; y del *trans*- β -cariofileno en dos niveles de concentración: un nivel bajo en el rango de concentraciones entre 0,5 y 5 g/L, y un nivel alto en el rango de concentraciones entre 7 y 23 g/L. Todas las mediciones se realizaron por triplicado. El límite de cuantificación se determinó (LOQ), según la **Ecuación 6** (Rao, 2018).

$$LOQ = \frac{|a| + 10S_a}{b} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde: a es el intercepto de la curva de calibración; S_a es la desviación estándar del intercepto y b es la pendiente de la curva de calibración.

3.7.3 Análisis por HPLC-DAD del extracto de *Psidium sartorianum*.

La detección y análisis de los compuestos fenólicos en el extracto de *Psidium sartorianum* se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia (AT, HPLC 1260 Infinity, Palo Alto, CA, EE. UU.), acoplada a un detector de arreglo de diodos (AT, DAD G1315D). La separación de los analitos ocurrió en una columna C₁₈ Gemini (*Phenomenex*, Torrance, CA, EE. UU.), 250 mm, L, x 4.6 mm, d.i., x 5 µm de tamaño de partícula, la detección de los compuestos fue a una longitud de onda $\lambda=290$ nm. La fase móvil fue A: agua (0,5 % de ácido fórmico) y B: acetonitrilo. El flujo fue 1 mL/min y el volumen de inyección 20 µL. La programación de la fase móvil fue así: 0 min-98% B; 15 min-88% B; 15-23 min-88% B; 46 min-60% B; 71 min-10% B; 71-75 min-10% B; 80 min-98% B; 80-85 min-98% B. La identificación de los compuestos se llevó a cabo por la comparación de sus tiempos de retención y los espectros UV-Vis con los de las sustancias de referencia (Véase **Sección 3.1**). La cuantificación del compuesto más abundante se efectuó por el método de calibración externa, usando la sustancia-patrón (ácido elágico).

3.7.4 Análisis por UHPLC-ESI-HRMS del extracto de *Psidium sartorianum*.

La caracterización química del extracto hidroalcohólico, que presentó la actividad antioxidante más alta, se realizó por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución con interfaz de electronebulización (UHPLC-ESI-HRMS). Los extractos (1 mg) se disolvieron en una solución (1 mL) de metanol, grado LC-MS (*Merck*, Darmstadt, Alemania) al

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

50% (v/v) en agua Tipo 1 obtenida en un sistema de purificación Millerpore UV Synergy (Molsheim, Francia) y acidulada con ácido fórmico, grado Suprapur (Merck, Darmstadt, Alemania), al 0,2% (v/v). Los extractos en solución se agitaron en un *minishaker* (IKA, Hofheim, Alemania) (1 min, 3000 rpm), se llevaron a un baño de ultrasonido *Elmasonic* S15H (Signen, Alemania) (37 kHz) por 30 min, a 25 °C, se filtraron usando una membrana PVDF 0,22 µm (Millipore, Sao Pablo, Brasil) y se envasaron en viales para cromatografía de 1,5 mL. Cuando el electronebulizador se operó en el modo de adquisición de iones negativos, los extractos se disolvieron en una solución de metanol al 50% en agua Tipo 1 modificada con formiato de amonio, al 5 mM.

Se empleó un equipo de cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia (UHPLC) *DionexTM UltimateTM 3000* (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), equipado con un desgasificador (SRD-3400), una bomba binaria de gradiente (HPG3400RS), un inyector automático de muestras (WPS 300TRS) y una unidad termoestada para la columna (TC 3000), una columna *Hypersil GOLDTM aQ* [Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU. (100 mm x 2,1 mm d.i. x 1,9 µm de tamaño de partícula)], y un detector de espectrometría de masas de alta resolución con un sistema de medición de corrientes de iones *Orbitrap (Exactive Plus Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.)*, que se empleó en el modo de barrido completo (MS *full scan*), con resolución de 70.000. La temperatura de la columna se mantuvo a 35 °C. La fase móvil para el modo de adquisición de iones positivos fue una mezcla de agua (A) con ácido fórmico al 0,2% y acetonitrilo (B). Para el modo de adquisición de iones negativos fue agua (A) con formiato de amonio al 5 mM y acetonitrilo (B). La siguiente fue la programación de la fase móvil: 100% A cambió linealmente a 100% B en ocho minutos, se mantuvo constante por cuatro minutos, se invirtió a 100% A por un minuto y se mantuvo sin cambios durante tres minutos. El volumen de

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

inyección fue de 1 μ L; gas secante: N₂, 7 L/min; gas nebulizador: N₂, 275 kPa; voltaje de capilar: 3.5 kV; rango de masas m/z 100-1100. Los espectros de masas se adquirieron en el modo de barrido completo (MS *full scan*), registrando iones-producto formados en la celda de disociación de alta energía HCD (modo positivo 10-40 V, modo negativo 10-30 V).

Los compuestos se identificaron con base en la composición elemental de las moléculas protonados o deprotonados, la relación isotópica y el patrón de fragmentación. Los datos obtenidos se analizaron en el *software Thermo Xcalibur v3.1* (Waltham, MA, EE. UU.).

3.7.5 Análisis por GC/MS del extracto de *Psidium sartorianum*.

El extracto de *Psidium sartorianum* (25 mg) se disolvió en metanol (1 mL) (grado HPLC), la mezcla se agitó en un *minishaker* (IKA, Hofheim, Alemania) (1 min, 3000 rpm) y se centrifugó (10 min, 3000 rpm) en una centrifuga Clay Adams® Compact II (*Becton, Dickinson and Company*, NJ, EE. UU.) Al sobrenadante, se le realizó una extracción líquido-líquido con hexano (0,5 mL, 1 min, 3000 rpm), la mezcla se dejó en reposo a -20 °C (2 h), posteriormente, se centrifugó (10 min, 3000 rpm), se tomó la fase metanólica, se filtró por membrana PVDF 0,22 μ m (*Millipore*, Sao Pablo, Brasil) y se envasó en un vial para cromatografía de 1,5 mL. El extracto se analizó en un equipo GC/MS (AT, Palo Alto, CA, EE. UU.) en la columna apolar idéntica a la descrita en el **Numeral 3.7.1**; pero durante la programación de la temperatura del horno, la última isoterma se mantuvo por un tiempo más largo, *i.e.*, 85 min.

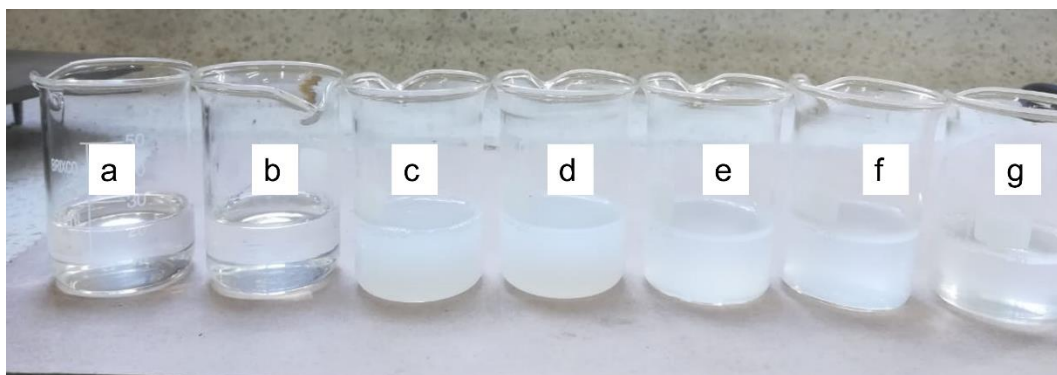
3.8 PREPARACIÓN DE LA MICROEMULSIÓN

Para la preparación de la microemulsión base se seleccionaron los ingredientes y sus proporciones, y se probaron tres fases acuosas (agua, agua: propilenglicol y agua: etanol), dos fases oleosas, aceite de aguacate y aceite de ajonjolí (Suquin, Bucaramanga, Colombia), y se

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

empleó Tween[®] 80 (Suquin, Bucaramanga, Colombia) como surfactante. Cada mezcla se preparó usando el método de titulación, agregando gota o gota la fase acuosa sobre la mezcla de la fase oleosa y el Tween[®] 80, agitando manualmente, solo lo necesario para mezclar todos los componentes (García y col. 2021). Inicialmente, el aceite vegetal se mezcló con el Tween[®] 80 en las siguientes relaciones: 5:95, 10:90, 17:83, 25:75, 50:50, 75:25 y 95:5, y, a estas mezclas se agregaron cantidades discretas de la fase acuosa (hasta de 1 mL). Se observó, detenidamente, en cada mezcla, la formación o no de la microemulsión, que se caracterizaba por ser ópticamente isotrópica (traslúcida) (de Sá y col., 2020), los resultados fueron representados a través de diagramas de fases pseudo-ternarias. Cada mezcla se preparó por duplicado. En la **Figura 9** se muestra un ejemplo de las mezclas realizadas.

Figura 9. Mezclas realizadas para la formación de microemulsiones con aceite vegetal de aguacate, agua: propilenglicol, y Tween[®] 80. Relación aceite vegetal: Tween[®] 80 **a.** 5:95; **b.** 10:90; **c.** 17:83; **d.** 25:75; **e.** 50:50; **f.** 75:25; **g.** 95:5. Fotos tomadas por Juan Camilo HENRÍQUEZ SANABRIA, en el Centro de Investigación CENIVAM, UIS, Bucaramanga. Fecha: 25 de enero de 2021.



MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

Una vez se seleccionaron los componentes de la microemulsión base y sus proporciones, se preparó una microemulsión con actividad antioxidante, mediante la incorporación del ingrediente activo (AE, extracto o mezcla) con actividad antioxidante más alta, a una concentración final de 1%. Para esto, el ingrediente activo se mezcló con la fase acuosa y se agregó, lentamente, a la mezcla de la fase oleosa y el surfactante, agitando manualmente, solo lo necesario para mezclar todos los componentes.

3.8.1 Pruebas de estabilidad de las microemulsiones.

Las microemulsiones preparadas con actividad antioxidante se llevaron a centrifuga (Clay Adams® Compact II, *Becton, Dickinson and Company*, NJ, EE. UU.) por 30 min, a 3000 rpm, observando si presentaban o no la separación de fases (Smaoui y col., 2017). La microemulsión que fue estable a la prueba anterior se almacenó durante 30 días, bajo tres condiciones, a saber: (1) en una cámara de clima constante (*Memmert HPP110*, Schwabach, Alemania), a 25 °C; (2) en un refrigerador (*Forte V25*, Indufrial, Bogotá, Colombia), a 5 °C y (3) en una cámara de calor (*Serie FD Classic Line*, *Binder GmbH*, Tuttlingen, Alemania), a 40 °C.

Al inicio y al final del periodo de almacenamiento, se evaluaron las propiedades físicas y químicas de las microemulsiones. Para pruebas físicas se midieron el pH, la viscosidad y la conductividad y para la pruebas químicas, se evaluaron la actividad antioxidante por el método de β -caroteno y la cantidad del ácido elágico en la microemulsión se midió por HPLC-DAD. El ensayo de β -caroteno se seleccionó para la evaluación de la actividad antioxidante de la microemulsión debido a la compatibilidad de sus componentes (ácido linoleico, Tween® 80 y agua) con las microemulsiones. El ácido elágico fue el compuesto analizado debido a su

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

abundancia en el extracto de *P. sartorianum*. A continuación, se describe cada uno de los procedimientos empleados.

3.8.2 pH de las microemulsiones

El pH se midió con un potenciómetro (*Miller Toledo*, Schwenzenbach, Suiza) equipado con un electrodo *Inlab Viscous Pro-ISM* (*Miller Toledo*, Schwenzenbach, Suiza). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

3.8.3 Viscosidad de las microemulsiones.

La viscosidad de las microemulsiones se midió en un viscosímetro rotacional equipado con un husillo (R2) (*Fungilab ONE SERIES*, Barcelona, España) (**Figura 10**), se evaluaron velocidades angulares entre 30 y 100 rpm, a una temperatura de 20 °C. Las mediciones se realizaron por triplicado en vasos de precipitados de 600 mL, según recomendaciones del proveedor (Fungilab, 2021).

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

Figura 10. *Medición de la viscosidad de las microemulsiones con viscosímetro rotacional con husillo R2 (Fungilab ONE SERIES, Barcelona, España). Fotografía tomada por Juan Camilo HENRÍQUEZ SANABRIA, en el Centro de Investigación CENIVAM, UIS, Bucaramanga. Fecha: 29 de marzo de 2021).*



3.8.4 Conductividad de las microemulsiones.

Por medio de un multímetro (*Fluke 179*, Everett, Wa, EE. UU.) se midió la resistencia al paso de corriente eléctrica de las microemulsiones; según la **Ecuación 7**, se determinó su conductividad. La distancia entre los electrodos fue de 1 cm.

$$G = \frac{1}{R} \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde G es la conductividad y R es la resistencia. Cada medición se realizó por triplicado.

3.8.5 Actividad antioxidante de la microemulsión.

La actividad antioxidante de la microemulsión preparada se midió por el ensayo de β -caroteno. Se tomaron 200 μL de cada microemulsión, se disolvieron en etanol absoluto (*Merck KGaA*,

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

Darmstadt, Alemania) hasta 2 mL; se tomaron 10 μL y se depositaron en la microplaca, se adicionaron 190 μL de la emulsión de β -caroteno (40 mg L^{-1}) y el procedimiento se continuó, según lo descrito en la **Sección 3.5.2**.

3.8.6 Extracción y cuantificación del ácido elágico en las microemulsiones.

Para extraer el ácido elágico en la microemulsión que contenía extracto de *Psidium sartorianum*, se empleó la técnica de dispersión de la matriz sólida (MSPD, por sus siglas en inglés) (Barker, 2007), con el fin de evitar la formación de posibles emulsiones, típicas para la técnica de extracción con solventes. La microemulsión (0.5 g) se depositó en un mortero, se agregó el dispersante sólido (sílice modificada $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$) (1.5 g) e *iso*-propanol (1 mL). La mezcla se homogeneizó manualmente usando un pistilo (10 min) y se transfirió a un cartucho tipo jeringa de 10 mL, que contenía en el fondo una trampa de algodón, la mezcla se compactó y los compuestos más polares se eluyeron con metanol (8 mL). El extracto MSPD se concentró con corriente de nitrógeno, se reconstituyó en una solución metanol (grado HPLC): agua Tipo 1 (1:1) acidulada al 0,5% con ácido fórmico (980 μL) y se agregaron 20 μL de una solución de naringenina en metanol (1 g/L) como patrón interno. Los resultados previos obtenidos del análisis por HPLC-DAD indicaron que la naringenina no se encontraba presente en el extracto de *P. sartorianum*. El extracto MSPD se analizó por HPLC-DAD, bajo las mismas condiciones que se habían usado para el análisis cromatográfico del extracto (Véase **Sección 3.7.3**).

Se realizó un diseño experimental 3^2 , para encontrar las mejores condiciones de recuperación del ácido elágico. Las siguientes variables fueron estudiadas: relación microemulsión: soporte sólido y relación de homogeneizado: volumen de metanol. El observable fue el área cromatográfica del ácido elágico. Cada extracción se realizó por duplicado. Los datos se procesaron usando el

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

programa Excel, versión 2016. Los experimentos realizados se muestran en la **Tabla 1**, donde -1 representa el nivel bajo; 0, el nivel medio, y 1, el nivel alto.

Tabla 1. Diseño de experimentos para la extracción de ácido elágico de las microemulsión.

N° de experimento	Variable		Cantidades empleadas		
	A	B	Microemulsión, g	Sílice modificada con C ₁₈ , g	Metanol, mL
1	-1	-1	0,5	1	3
2	-1	0	0,5	1	6
3	-1	1	0,5	1	9
4	0	-1	0,5	1,5	4
5	0	0	0,5	1,5	8
6	0	1	0,5	1,5	12
7	1	-1	0,5	2	5
8	1	0	0,5	2	10
9	1	1	0,5	2	15

A: Relación microemulsión: dispersante; **B:** Relación homogeneizado (g) : Volumen de solvente de elución (mL).

3.8.7 Caracterización de la fracción volátil de las microemulsiones.

Las fracciones volátiles de las microemulsiones-base y de la microemulsión con actividad antioxidante (más extracto) se analizaron, usando el muestreo del espacio de cabeza con una fibra de micro-extracción en fase sólida (HS-SMPE, por sus siglas en inglés) y el método GC/MS, según metodología descrita por Stashenko y col. (2013). La identificación de los compuestos se realizó por GC/MS empleando las mismas condiciones operacionales que se usaron para el análisis de los AE, en la columna apolar (**Sección 3.7.1**), con la diferencia que se utilizó un *liner* especial, de diámetro pequeño, para SPME. La microemulsión (20 mg) se depositó en un frasco de 4 mL con *séptum*, se dejó en pre-equilibrio térmico por 15 min, a 60 °C. La extracción se realizó exponiendo una fibra recubierta con DVB/CAR/PDMS (*Supelco-Sigma-Aldrich*, Milwaukee, Wi, EE. UU.) por 30 min en el frasco de 4 mL. La fibra se desorbió térmicamente por 15 min en el puerto de inyección del equipo GC-MS a 250 °C. La

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

cuantificación de los compuestos se realizó por el método de normalización simple, suponiendo que todos los factores de respuesta de los compuestos de la mezcla son iguales.

4. RESULTADOS

4.1 SELECCIÓN DEL INGREDIENTE ACTIVO PARA LA MICROEMULSIÓN

4.1.1 Rendimientos de los aceites esenciales y los extractos.

Los rendimientos de destilación de los AE y aislamiento de extractos hidroalcohólicos obtenidos a partir del material vegetal, después de su destilación, se muestran en la **Tabla 2**. Los rendimientos de los AE variaron de 0,1% a 0,7%. El valor más alto se obtuvo para *Psidium sartorianum* (0,7%), seguido de *Calycolpus moritzianus* (0,4%) y *Varronia curassavica* (0,2%). Los extractos hidroalcohólicos del material vegetal, después de su destilación, presentaron rendimientos de extracción entre 9,3% y 24%; los valores más altos correspondieron a *C. moritzianus* (24%), *P. sartorianum* (22%) y *P. marginatum* (9,4%).

Tabla 2. Rendimientos de extracción de los AE y extractos hidroalcohólicos.

Especie	Rendimiento, %	
	Aceite esencial	Extracto
<i>Calycolpus moritzianus</i>	0,4	24
<i>Piper marginatum</i>	0,1	9,4
<i>Psidium sartorianum</i>	0,7	16,7
<i>Varronia curassavica</i>	0,2	9,3
<i>Wedelia calycina</i>	0,2	3,8

4.1.2 Actividad antioxidante de aceites esenciales y extractos hidroalcohólicos.

Para evaluar la actividad antioxidante de los AE y extractos, se emplearon los métodos de decoloración del catión-radical ABTS⁺ y del β -caroteno, usando curvas de calibración con Trolox[®] como sustancia de referencia. Los resultados del R², la pendiente (a) y el intercepto (b) para cada ensayo se muestran en la **Tabla 3**. Ambos métodos presentaron un comportamiento lineal en el rango de concentraciones evaluadas; para el ensayo ABTS⁺ fue 50 -550 μ M de

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

Trolox[®] y para el ensayo de β -caroteno de 10-50 μ M de Trolox[®]. En el **Anexo 1** se muestran las curvas de calibración construidas para los dos métodos.

Tabla 3. Linealidad de los ensayos de decoloración del ABTS⁺ y de β -caroteno para la determinación de la actividad antioxidante, usando Trolox[®] como sustancia de referencia.

Ensayo	R ²	Pendiente, a	Intercepto, b
ABTS ⁺	0,994	0,12	2,31
β -Caroteno	0,991	1,42	-5,93

La actividad antioxidante de los AE y extractos hidroalcohólicos se muestra en la **Tabla 4**. Los extractos hidroalcohólicos tuvieron una actividad antioxidante, medida por el ensayo ABTS⁺, entre 240 y 1187 μ mol Trolox[®]. El orden decreciente de la actividad antioxidante fue así: *P. sartorianum* > *C. moritzianus* > *P. marginatum* > *W. calycina* > *V. curassavica*. El rango de la actividad antioxidante para los AE estudiados fue de 9 a 380 μ mol Trolox[®].

La actividad antioxidante medida por el ensayo de decoloración del β -caroteno de los extractos hidroalcohólicos estuvo en el rango de 2,6 a 44 μ mol Trolox[®]. El orden decreciente de actividad antioxidante fue así: *P. sartorianum* > *C. moritzianus* > *P. marginatum* > *V. curassavica* > *W. calycina*. Los AE presentaron un rango de actividad antioxidante entre 6,4 y 18 μ mol Trolox[®]. La actividad antioxidante, medida por ambos ensayos, de todas las muestras fue inferior a la de las sustancias de referencia, BHT y α -tocoferol.

Tabla 4. Actividad antioxidante medida por los ensayos de decoloración del catión-radical $ABTS^{+•}$ y del β -caroteno de los AE y extractos hidroalcohólicos estudiados.

Especie	Actividad antioxidante, $\mu\text{mol de Trolox}^{\text{®}}/\text{g muestra } (\bar{x} \pm s, n=3)$			
	$ABTS^{+•}$		β -Caroteno	
	AE	Extracto	AE	Extracto
<i>Calycolpus moritzianus</i>	9 $\pm$ 1	940$\pm$58	6,4 $\pm$ 0,16	23 $\pm$ 1,1
<i>Piper marginatum</i>	210$\pm$4	347 $\pm$ 5	17,8 $\pm$ 0,84	21 $\pm$ 1,0
<i>Psidium sartorianum</i>	59 $\pm$ 7	1180$\pm$17	12 $\pm$ 1,2	44 $\pm$ 2,2
<i>Varronia curassavica</i>	380$\pm$20	240 $\pm$ 13	10,2 $\pm$ 0,43	3 $\pm$ 0,1
<i>Wedelia calycina</i>	144 $\pm$ 2	253 $\pm$ 1	7,5 $\pm$ 0,1	2,65 $\pm$ 0,092
BHT*	6300 $\pm$ 180		431 $\pm$ 0,7	
α -Tocoferol*	2400 $\pm$ 207		557 $\pm$ 1,3	

AE: Aceite esencial. .

*Evaluado a 100 mg L⁻¹.

Los extractos de *Psidium sartorianum* y *Calycolpus moritzianus* y los AE de *Piper marginatum* y *Varronia curassavica*, presentaron la actividad antioxidante más alta que otros AE y extractos evaluados (Véase **Tabla 4**) y fueron seleccionados para preparar mezclas binarias para determinar, si su actividad antioxidante fue debido a los efectos aditivo, sinérgico, indiferente o antagónico; para esto, se usó como tamizaje el ensayo de $ABTS^{+•}$.

Las mezclas binarias preparadas se muestran en la **Tabla 5**. En la **Figura 11** se reportan los resultados de actividad antioxidante medida por el ensayo de decoloración del $ABTS^{+•}$ de las mezclas Binaria-1 y Binaria-2; los resultados de las otras mezclas binarias se muestran en el **Anexo 2**. Para cada mezcla binaria se probaron hasta tres relaciones, por ejemplo, para la mezcla Binaria-1, se evaluaron las relaciones de extracto de *P. sartorianum*: extracto de *C. moritzianus* (3:1), (1:1) y (1:3), garantizando que la concentración final de la mezcla fuera igual a la del extracto de *P. sartorianum*, cuando éste se evaluó individualmente, teniendo en cuenta que presentó la actividad antioxidante más alta entre las muestras evaluadas.

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

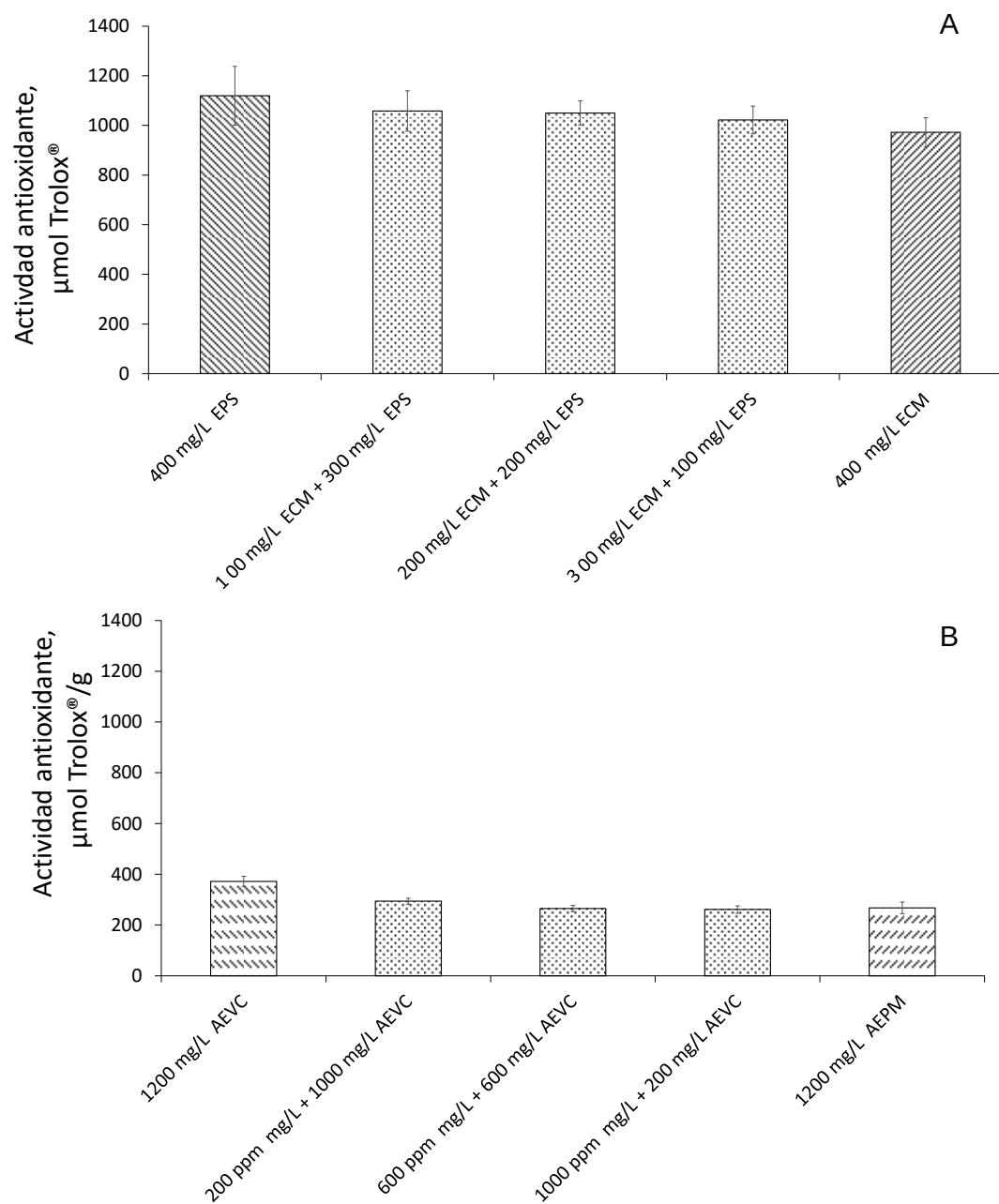
Según los resultados mostrados en la **Figura 11**, los valores de actividad antioxidante de las tres combinaciones en la mezcla Binaria-1, estuvieron dentro del rango de la actividad antioxidante de los extractos de *P. sartorianum* y *C. moritzianus*; a medida que disminuía la cantidad de *P. sartorianum* en la mezcla, la actividad antioxidante también disminuía, hasta valores cercanos a la de la actividad antioxidante del extracto de *C. moritzianus*. Este comportamiento fue similar a las combinaciones de la mezcla Binaria-2 y para todas otras mezclas estudiadas. No se observó un efecto aditivo o sinérgico en las mezclas realizadas.

Tabla 5. Mezclas binarias entre los AE y extractos hidroalcohólicos obtenidos que demostraron la actividad antioxidante in vitro más alta.

N°	Mezcla	Componentes
1	Binaria-1	Extracto de <i>C. moritzianus</i> + extracto de <i>P. sartorianum</i>
2	Binaria-2	Extracto de <i>C. moritzianus</i> + AE de <i>P. marginatum</i>
3	Binaria-3	Extracto de <i>P. sartorianum</i> + AE de <i>P. marginatum</i>
4	Binaria-4	Extracto de <i>C. moritzianus</i> + AE de <i>V. curassavica</i>
5	Binaria-5	Extracto de <i>P. sartorianum</i> + AE de <i>V. curassavica</i>
6	Binaria-6	AE de <i>P. marginatum</i> + AE de <i>V. curassavica</i>

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

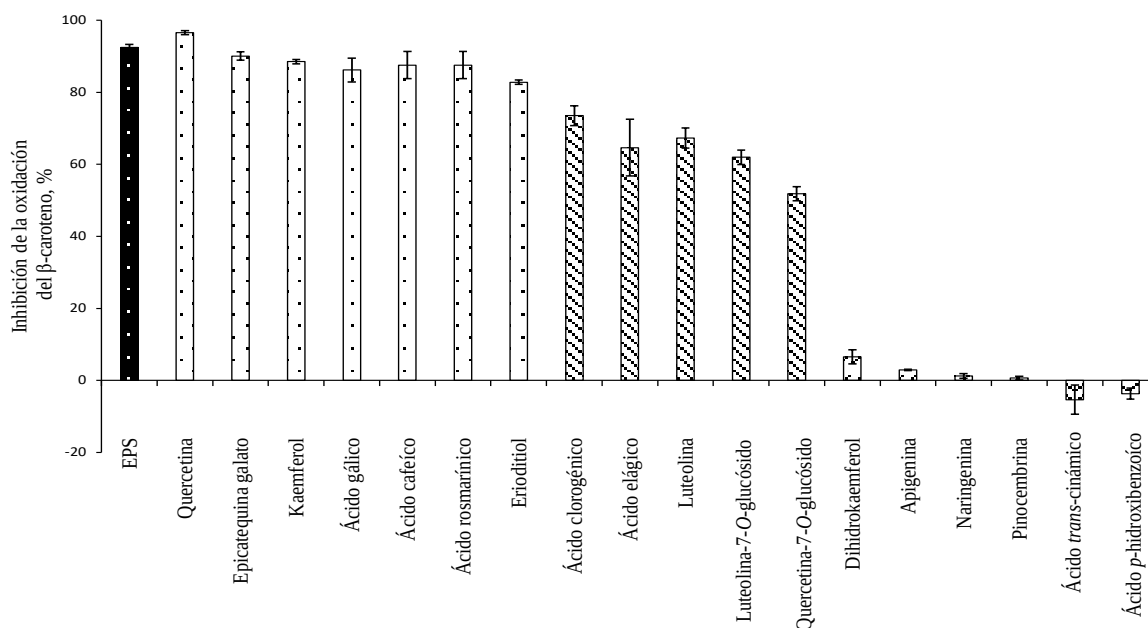
Figura 11. Actividad antioxidante medida por el ensayo de decoloración del catión-radical $ABTS^{+}$ de las mezclas A: Binaria-1 y B: Binaria-2. ECM. Extracto de *Calycolpus moritzianus*; EPS. Extracto de *Psidium sartorianum*; AEPM. Aceite esencial de *Piper marginatum*; AEVC. Aceite esencial de *Varronia curassavica*.



4.1.3 Actividad antioxidante de ácidos fenólicos y flavonoides.

Debido a que por el ensayo β -caroteno, los valores de la actividad antioxidante de las sustancias patrón, BHT y α -tocoferol, fueron nueve y 12 veces más altos que los del extracto de *P. sartorianum*, se decidió evaluar la actividad antioxidante por este mismo ensayo de algunas sustancias patrón comunes en extractos naturales (Stalikas, 2007) (Véase **Figura 12**). Las siguientes fueron las sustancias evaluadas: los ácidos cafeico, *trans*-cinámico, clorogénico, elágico, gálico, *p*-hidroxibenzoico y rosmarínico, la apigenina, el hidrokaemferol, la epicatequina galato, el erioditiol, el kaemferol, la luteolina, la luteloina-7-*O*-glucósido, la naringenina, la pinocembrina, la quercetina y la quercetina-3-*O*-glucósido. Todas las sustancias se evaluaron a una concentración de 1 g/L. Las sustancias se unieron, según su actividad antioxidante en cuatro grupos. La protección ejercida por el extracto de *Psidium sartorianum* fue comparable con la del grupo conformado por quercetina, epicatequina galato, kaemferol, erioditiol y los ácidos gálico, cafeico, rosmarínico. Las moléculas de este primer grupo se caracterizan por poseer en sus estructuras uno o dos anillos de benceno, con mínimo dos grupos hidroxilo, ubicados en posición *orto*; a excepción del kaemferol, que es flavonol, similar a la quercetina, pero con un hidroxilo menos en el anillo B.

Figura 12. Protección contra la oxidación del β -caroteno ejercida por los compuestos fenólicos, los ácidos *trans*-cinámico y *p*-hidrobenzoico y el extracto de *Psidium sartorianum* (EPS), todos evaluados a una concentración de 1 g/L.



Un segundo grupo de compuestos, con actividad antioxidante inferior a la del primer grupo, estuvo conformado por los ácidos clorogénico y elágico, luteolina, luteolina-7-*O*-glucósido y quercetina-3-*O*-glucósido. Tres de estos cinco compuestos son derivados estructurales de los componentes del primer grupo; así, por ejemplo, el ácido clorogénico es un derivado del ácido cafeico; el ácido elágico, del ácido gálico; la quercetina-3-*O*-glucósido, de su respectiva aglicona. Se observó un efecto de disminución de la actividad antioxidante cuando los flavonoides están conjugados con azúcares, por ejemplo, luteolina-7-*O*-glucósido y la quercetina-3-*O*-glucósido, tienen la actividad antioxidante más baja, que las respectivas luteolina y quercetina.

El tercer grupo estuvo conformado por dihidrokaemferol, apigenina, naringenina y pinocembrina. Estos cuatro compuestos no tienen el grupo catecol, lo que influyó notoriamente

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

sobre la actividad antioxidante (0,6-6,5%). Pinocembrina fue el compuesto con la actividad antioxidante más baja (0,6%) (medida por este método) en este grupo; en la estructura química de la pinocembrina no hay un grupo hidroxilo en la posición C-3, tampoco un enlace doble en la posición C₂-C₃; que según lo encontrado por Burda y Olezek (2001) podría ser la razón de su baja actividad antioxidante.

El cuarto grupo de compuestos contenía los ácidos *trans*-cinámico y *p*-hidroxibenzoico. Estos dos compuestos no protegieron al β -caroteno de su oxidación; inclusive, la presencia de estos ácidos (posibles pro-oxidantes) provocó que la oxidación del β -caroteno fuera mayor que la registrada para el blanco (muestra sin adición de sustancias de referencia), por lo que, se obtuvieron valores negativos de inhibición de la actividad antioxidante (Véase **Figura 12**).

4.2 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS INGREDIENTES NATURALES SELECCIONADOS

4.2.1 Caracterización química por GC/MS del aceite esencial de *Piper marginatum*.

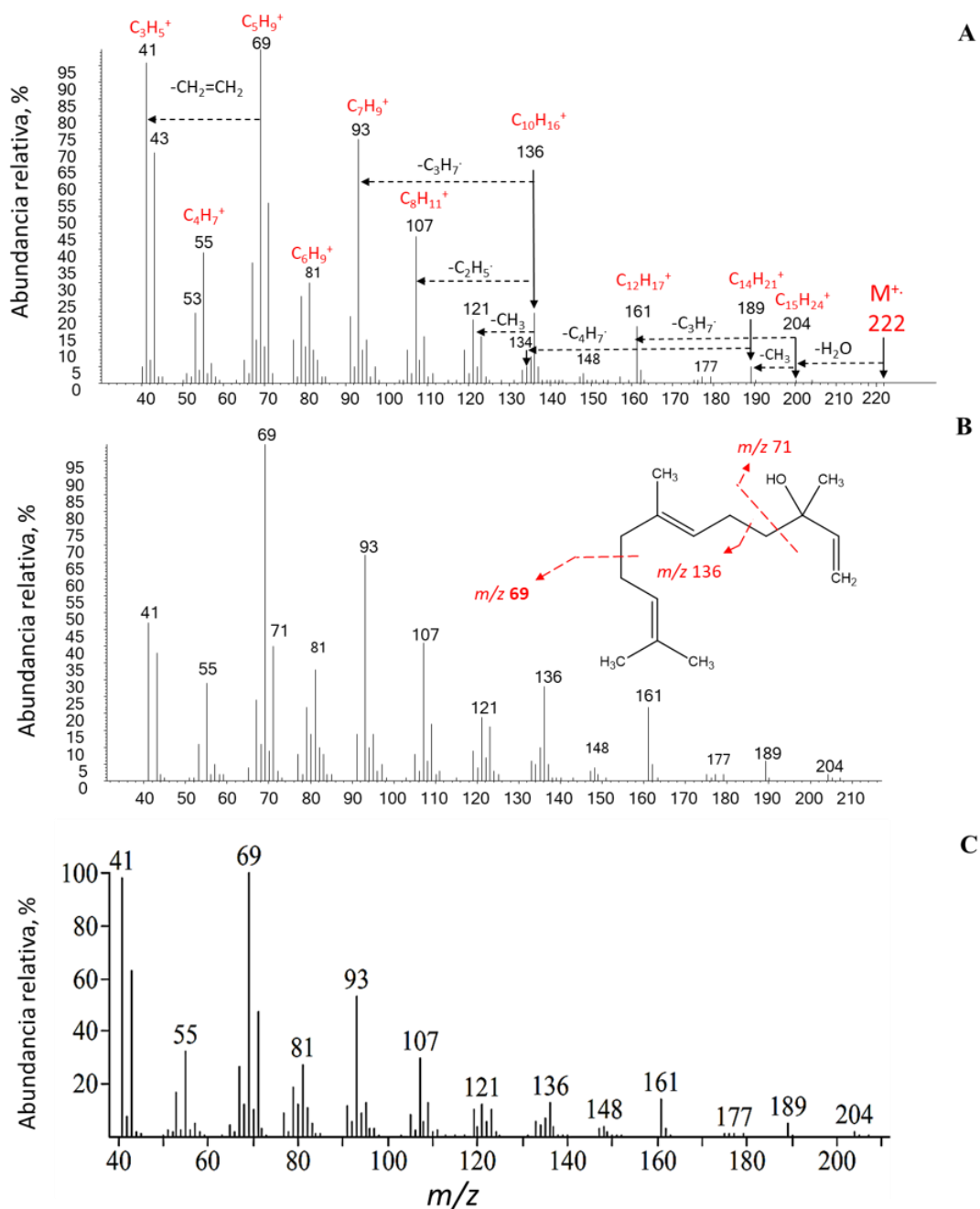
La caracterización química del AE se realizó por GC/MS. Para la identificación de los compuestos presentes en el AE, se compararon sus espectros de masas e índices de retención lineales experimentales con los reportados en literatura científica o en las bases de datos (Adams, 2007; NIST; Wiley; Babushok y col., 2011).

El uso de algunas sustancias de referencia certificadas permitió la identificación confirmatoria de varios compuestos del AE, usando la comparación de sus tiempos de retención y de sus espectros de masas con los de patrones. En la **Figura 13** aparece la comparación de los espectros de masas experimentales obtenidos de un pico cromatográfico (t_R = 40,3 min) del AE de *P. marginatum*, de

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

un patrón certificado de *trans*- β -nerolidol (t_R = 40,2 min) y del espectro de masas reportado en literatura (Adams, 2007). En los tres espectros de masas, el ion molecular M^{+} (m/z 222) fue de muy baja intensidad (<1%). Los iones-producto observados en m/z 136 (100%), 71 (43%) y 69 (30%) se deben a rupturas alílicas en el *trans*-nerolidol (Véase **Figura 13B**). En los espectros de masas, también, aparecieron los iones-producto $[M-H_2O]^{+}$ y $[M-H_2O-CH_3]^{+}$ registrados en m/z 204 (2%) y 189 (6%), respectivamente. Los iones-producto observados son comunes para muchos sesquiterpenos, pero, la relación única de sus intensidades permite la identificación inequívoca.

Figura 13. Espectros de masas de: A. *trans*-Nerolidol presente en el AE de *P. marginatum*; B. Sustancia patrón, *trans*-nerolidol Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). y C. Espectro de masas de *trans*-nerolidol reportado en literatura (Adams, 2007). GC/MS (EI, 70 eV). Columna apolar DB-5MS.



MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

Los cromatogramas, obtenidos por GC/MS en las columnas DB-5MS y DB-WAX, se muestran en las **Figuras 14 y 15**; el perfil cromatográfico obtenido por GC/FID en columna apolar (DB-5) se muestra en el **Anexo 3**. La composición química determinada por GC/MS y la cuantificación obtenida por GC/FID del AE de *P. marginatum* se muestran en la **Tabla 6**. Las curvas de calibración obtenidas para la cuantificación de los compuestos mayoritarios de los AE se muestran en el **Anexo 4**.

Figura 14. Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (modo full scan) del AE de *Piper marginatum*. Columna DB-5MS (60 m). Inyección split 1:30. MSD (EI, 70 eV); ISTD: *n*-tetradecano (1,9 g/L). Véase la identificación de los picos en la **Tabla 6**.

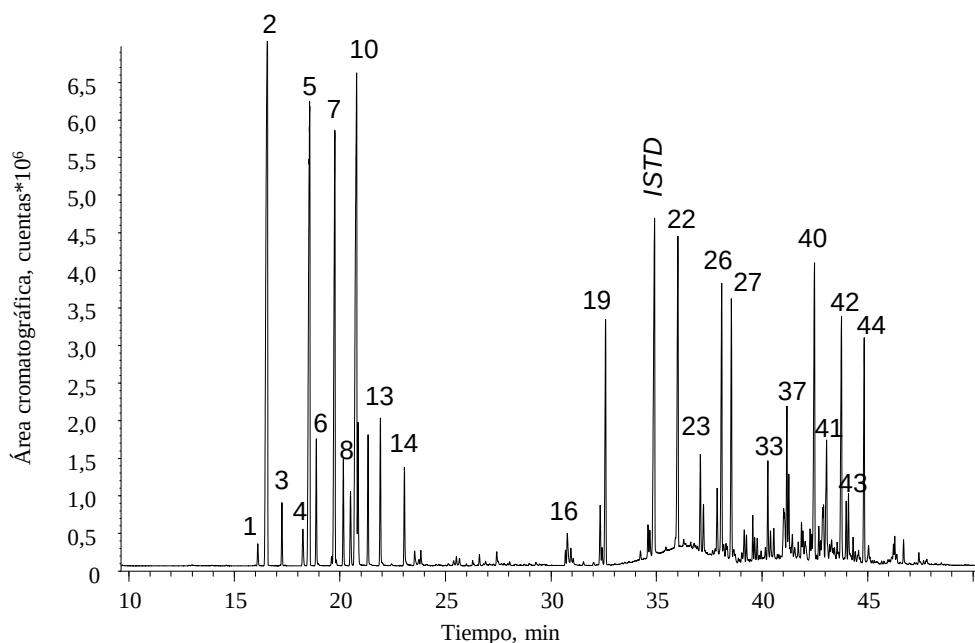


Figura 15. Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (modo full scan) del AE de *Piper marginatum*. Columna DB-WAX (60 m). Inyección split 1:30. MSD (EI, 70 eV). Véase la identificación de los picos en la **Tabla 6**.

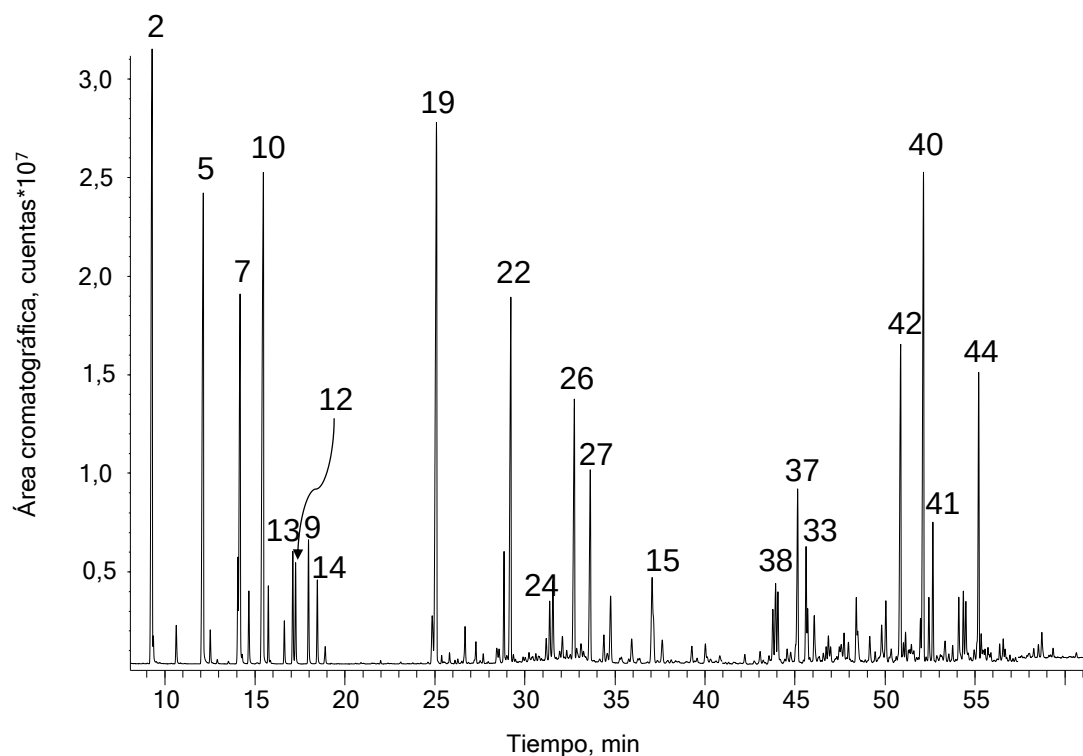


Tabla 6. Caracterización química por GC/MS y cuantificación por GC/FID de componentes del AE de *Piper marginatum* obtenido por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas.

N° Fig. 14 y 15	tr, min (DB-5MS)	Compuesto	Familia de compuest os	Índices de retención lineales				Cantidad de sustancia	
				DB5-MS		DB-WAX		GC área relativa, % (DB-5MS)	mg/g AE (DB-5)*
				Exp.	Ref.	Exp.	Ref.		
1	16,11	α -Tujeno ^{a, b}	HM	927	927 [2]	-	1026 [2]	0,3	2,8 ± 0,17
2	16,56	α -Pineno ^{a, b, c, d}	HM	937	936 [2]	1025	1025 [2]	11,9	130 ± 16
3	17,25	Canfeno ^{a, b}	HM	952	950 [2]	-	1068 [2]	0,7	5,9 ± 0,60
4	18,24	Sabineno ^{a, b}	HM	975	973 [2]	-	1122 [2]	0,5	4,8 ± 0,51
5	18,56	β -Pineno ^{a, b, c}	HM	982	977 [2]	1113	1110 [2]	9,7	110 ± 15
6	18,88	β -Mirceno ^{a, b}	HM	989	989 [2]	1167	1160 [2]	1,4	13 ± 2,1
7	19,76	α -Felandreno ^{a, b, d}	HM	1010	1004 [2]	1171	1167 [2]	7,3	64 ± 8,8
8	20,16	α -Terpineno ^{a, b}	HM	1019	1017 [2]	1185	1177 [2]	1,2	9 ± 1,1
9	20,50	<i>p</i> -Cimeno ^{a, b, d}	HM	1027	1024 [2]	1278	1270 [2]	1,0	10 ± 1,8
10	20,79	Limoneno ^{a, b, c, d}	HM	1034	1029 [2]	1205	1198 [2]	11,2	130 ± 20
11	20,85	β -Felandreno ^{a, b}	HM	1036	1030 [2]	1215	1209 [2]	1,6	6,5 ± 0,89
12	21,33	<i>trans</i> - β -Ocimeno ^{a, b}	HM	1047	1047 [2]	1257	1270 [2]	1,5	13 ± 2,0
13	21,92	γ -Terpineno ^{a, b}	HM	1061	1059 [2]	1253	1245 [2]	1,7	13 ± 2,0
14	23,06	Terpinoleno ^{a, b}	HM	1088	1086 [2]	1291	1282 [2]	1,2	10 ± 1,4
15	30,78	<i>trans</i> -Anetol ^{a, b}	MO	1291	1285 [1]	1840	1826 [3]	0,5	4,4 ± 0,86
16	30,94	Safrol ^{a, b}	MO	1296	1286 [2]	1888	1868 [2]	0,2	<LOQ
17	32,33	C ₁₅ H ₂₄ ^f	HS	1333	-	1404	-	0,8	7 ± 1,1
18	32,42	C ₁₅ H ₂₄ ^g	HS	1335	-	1420	-	0,2	<LOQ
19	32,59	δ -Elemeno ^{a, b}	HS	1339	1337 [2]	1481	1468 [2]	3,4	22 ± 5,0
20	34,60	β -Bourboneno ^{a, b}	HS	1392	1384 [2]	1535	1523 [2]	0,4	4,0 ± 0,38
21	34,68	β -Elemeno ^{a, b}	HS	1395	1389 [2]	1603	1590 [2]	0,4	4,8 ± 0,63

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

Continuación **Tabla 6.**

22	36,01	<i>trans</i> -β-Cariofileno ^{a, b, c, d}	HS	1433	1435 [4]	1615	1604 [5]	5,0	36 ± 7,2
23	37,08	<i>trans</i> -9- <i>epi</i> -Cariofileno ^{a, b}	HS	1463	1464 [1]	-	-	1,2	12 ± 2,2
24	37,22	α-Humuleno ^{a, b, c, d}	HS	1468	1453 [2]	1688	1666 [2]	0,6	5,7 ± 0,75
25	37,87	γ-Muuroleno ^{a, b}	HS	1486	1476 [2]	-	-	0,8	1,9 ± 0,1
26	38,09	Germacreno D ^{a, b}	HS	1493	1480 [2]	1725	1708 [2]	3,7	25 ± 4,8
27	38,54	Biciclogermacreno ^{a, b}	HS	1507	1500 [1]	1749	1734 [3]	3,4	22 ± 3,2
28	39,16	δ-Cadineno ^{a, b}	HS	1527	1523 [2]	1769	1755 [2]	0,5	5,7 ± 0,83
29	39,26	C ₁₅ H ₂₄ O ^h	SO	1530	-	1957	-	0,3	4,2 ± 0,51
30	39,56	C ₁₅ H ₂₄ O ⁱ	SO	1540	-	1910	-	0,4	3,3 ± 0,18
31	39,65	C ₁₅ H ₂₄ O ^j	SO	1543	-	-	-	0,3	<LOQ
32	39,77	Elemicin ^{a, b}	CO	1547	1553 [2]	2239	2231 [2]	0,3	<LOQ
33	40,27	<i>trans</i> -Nerolidol ^{a, b, c, d}	SO	1564	1560 [2]	2049	2036 [2]	1,2	9 ± 1,4
34	40,56	Germacreno B ^{a, b}	HS	1573	1559 [2]	1849	1823 [2]	0,4	3,5 ± 0,27
35	41,02	Germacreno-D-4-ol ^{a, b}	SO	1589	1574 [2]	2001	2018 [2]	0,7	12 ± 2,2
36	41,06	Espatulenol ^{a, b}	SO	1590	1576 [2]	2140	2126 [2]	0,6	4,6 ± 0,58
37	41,18	C ₁₅ H ₂₄ O ^k	SO	1594	-	2036	-	1,9	12 ± 2,2
38	41,27	Óxido de cariofileno ^{a, b, d}	SO	1597	1580 [2]	2002	1986 [2]	1,1	8 ± 1,4
39	42,35	Isolongifolen-9-ona ^{a, b}	SO	1637	1627 [1]	2227	-	0,3	3,9 ± 0,34
40	42,49	Isoespatulenol ^{a, b}	SO	1642	1638 [1]	2273	2250 [3]	4,8	38 ± 8,7
41	43,63	C ₁₅ H ₂₄ O ^l	SO	1663	-	2196	-	2,2	16 ± 2,1
42	43,77	Ylangenal ^{a, b}	SO	1690	1675 [3]	2227	-	3,7	22 ± 4,9
43	44,04	<i>ent</i> -Germacre-4(15),5,10(14)-trien-1β-ol	SO	1698	1695 [3]	2267	-	0,73	5,6 ± 1,6
44	44,84	C ₁₅ H ₂₄ O ^m	SO	1733	-	2400	-	2,8	17 ± 3,2

* ($\bar{x} \pm s$, n=3). ^a Identificación tentativa basada en los espectros de masas (MS, EI, 70 eV, coincidencia > 90%). ^b Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales en las columnas DB-WAX y DB-5MS ([1] Adams, 2007; [2] Babushok y col., 2011; [3] NIST 2017; [4] Rojas y Usabillaga, (2000); [5] Cardeal *et al.*, (2006).

^c Identificación tentativa basada en la comparación de los espectros de masas de alta resolución (HRMS) con la base de datos NIST 2017 (Véase **Anexo 3**) o la determinación de la composición elemental del ion molecular, iones-producto y sus masas exactas. ^d Identificación confirmatoria por MS y LRI usando sustancias de referencia certificadas (α-pineno, α-felandreno, limoneno, *trans*-β-cariofileno, *p*-cimeno, α-humuleno, *trans*-nerolidol y óxido de cariofileno).

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

Continuación **Tabla 6.**

^f <i>m/z</i> (I%): 204 M ⁺ (9%), 189 (15%), 161 (56%), 136 (40%), 121 (100%), 105 (30%), 93 (70%), 91 (35%), 77 (23%).
^g <i>m/z</i> (I%): 204 M ⁺ (4%), 189 (7%), 161 (40%), 136 (56%), 121 (100%), 105 (33%), 93 (72%), 77 (22%). ent-Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1β-ol
^h <i>m/z</i> (I%): 220 M ⁺ (2%), 204 (2%), 187 (5%), 177 (7%), 159 (12%), 137 (100%), 121 (100%), 105 (24%), 93 (69%), 84 (54%).
ⁱ <i>m/z</i> (I%): 220 M ⁺ (2%), 187 (2%), 177 (4%), 159 (6%), 137 (100%), 121 (95%), 105 (19%), 93 (65%), 84 (67%).
^j <i>m/z</i> (I%): 220 M ⁺ (78%), 202 (10%), 187 (33%), 176 (19%), 164 (62%), 159 (71%), 149 (36%), 135 (65%), 119 (78%), 105 (71%), 93 (100%), 77 (36%).
^k <i>m/z</i> (I%): 220 M ⁺ (17%), 205 (12%), 187 (11%), 177 (12%), 162 (77%), 147 (72%), 134 (38%), 119 (100%), 105 (54%), 93 (65%), 79 (29%).
^l <i>m/z</i> (I%): 220 M ⁺ (47%), 205 (5%), 187 (60%), 161 (82%), 159 (100%), 145 (51%), 119 (81%), 105 (39%), 91 (47%), 77 (23%), 43 (26%), 41 (26%).
^m <i>m/z</i> (I%): 220 M ⁺ (98%), 205 (18%), 202 (39%) 187 (90%), 177 (24%), 161 (39%), 159 (100%), 145 (46%), 131 (63%), 119 (32%), 105 (36%), 91 (35%), 77 (13%), 43 (16%).

En el AE de *P. marginatum* se identificaron 35 compuestos en cantidades >0,2%, que correspondieron al 84,9% del área cromatográfica total. El AE de *P. marginatum* tiene un alto contenido de hidrocarburos monoterpénicos (51%), seguidos de hidrocarburos sesquiterpénicos (21%) y sesquiterpenos oxigenados (19%). Los componentes mayoritarios en este AE fueron α -pineno (12%), limoneno (11%) y β -pineno (10%), todos monoterpenos.

Los espectros de masas obtenidos por GC-ToF-HRMS de los compuestos no identificados en el AE de *P. marginatum* se muestran en las **Figuras 16-18**. Se pudo establecer que el compuesto no identificado N° **17** con $t_R = 32,33$ min, posee una fórmula elemental de $C_{15}H_{24}$ (m/z 204,1871, $\Delta ppm = 0,75$), por lo que se puede afirmar que corresponde a un hidrocarburo sesquiterpénico; los iones en m/z 55, 67 y 91 indican la presencia de, por lo menos, un enlace doble en la molécula. El compuesto N° **37** ($t_R = 41,18$ min) presentó una fórmula elemental de $C_{15}H_{24}O$ (m/z 220,1821, $\Delta ppm = 0,6$); durante su fragmentación se observó la salida del radical con fórmula elemental $C_3H_6O^\bullet$ generando el ion-producto en m/z 162,1401 con fórmula elemental ($C_{12}H_{18}$), el catión $C_3H_6O^+$ se observó en m/z 58,0414; este compuesto pertenece a los sesquiterpenos oxigenados. El compuesto N° **44** ($t_R = 44,84$ min) con fórmula elemental de $C_{15}H_{24}O$ (m/z 220,1879, $\Delta ppm = 1,21$), durante su fragmentación, pierde la molécula de agua y genera el ion en m/z 202,1714, con fórmula elemental $C_{15}H_{22}$; por lo que este compuesto podría corresponder a un alcohol (de Hoffmann y Stroobant, 2007) y pertenece a la familia de los sesquiterpenos oxigenados.

Figura 16. Espectro de masas obtenido por GC-ToF-HRMS (columna Rxi-5MS) del compuesto N° 17 (Véanse **Figuras 14-15** y **Tabla 6**) del AE de *Piper marginatum*.

Peak True - sample "AE-Piper marginatum", Peak 123, at 3108.7 s, Area (Abundance)

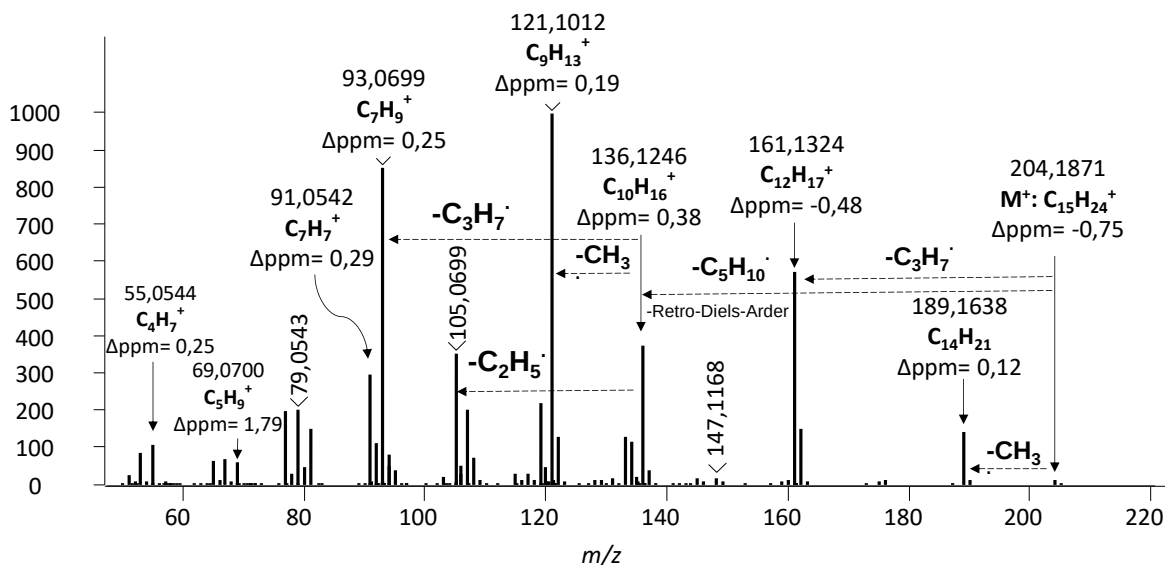


Figura 17. Espectro de masas obtenido por GC-ToF-HRMS (columna Rxi-5MS) del compuesto N° 37 (Véanse **Figuras 14-15** y **Tabla 6**) del AE de *Piper marginatum*.

Peak True - sample "AE-Piper marginatum", Peak 195, at 3891.02 s, Area (Abundance)

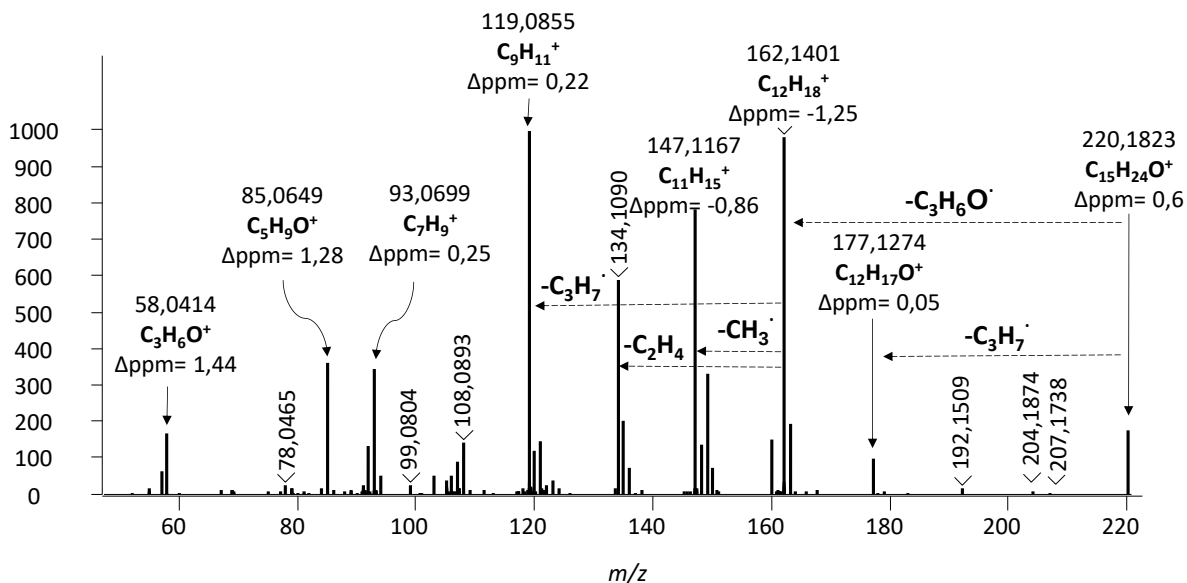
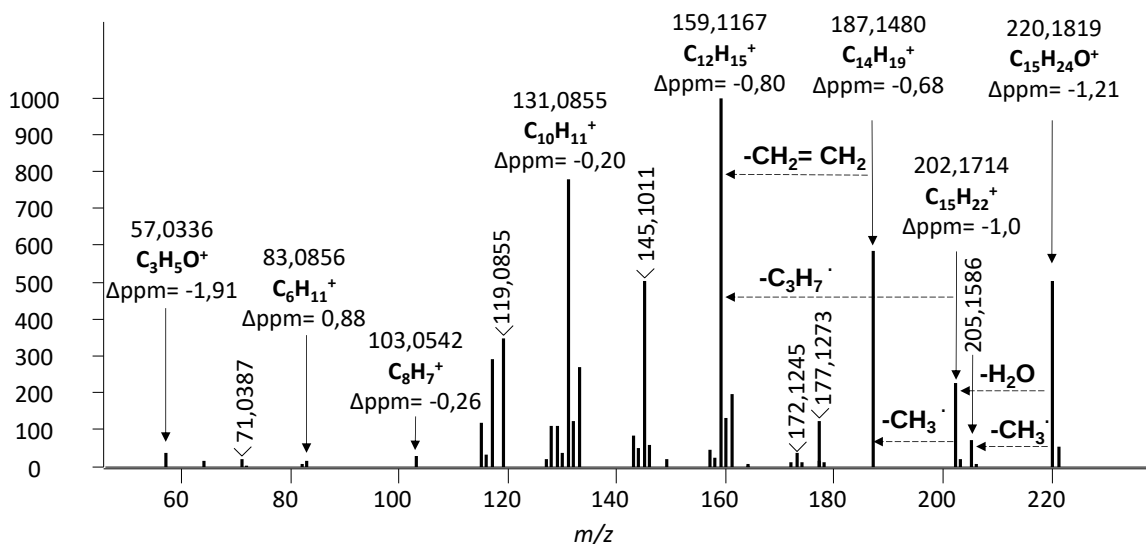


Figura 18. Espectro de masas experimental obtenido por GC-TOF-HRMS (columna Rxi-5MS) del compuesto N° **44** (Véanse **Figuras 14-15** y **Tabla 6**) del AE de *Piper marginatum*

Peak True - sample "AE-Piper marginatum", Peak 231, at 4270.38 s, Area (Abundance)



4.2.2 Caracterización química por UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-HRMS del extracto de *Psidium sartorianum*, después de la destilación de la planta.

El extracto hidroalcohólico de *Psidium sartorianum*, después de la destilación de la planta, se analizó en el equipo LC-MS (Orbitrap) en modo de adquisición de iones positivos, según se describe en la **Sección 3.7.4**. La lista de compuestos identificados se muestra en la **Tabla 7** y las corrientes iónicas extraídas (EIC, por sus siglas en inglés) de los iones [M+H]⁺ se muestran en la **Figura 19**. Se identificaron un total de 17 compuestos; cinco de éstos, de forma confirmatoria, y 12, de manera presuntiva. Para la identificación de los compuestos de manera confirmatoria se compararon los tiempos de retención de sustancias-patrón y sus espectros de masas con los obtenidos experimentalmente en el extracto de *P. sartorianum*. En la **Figura 20** se muestran los espectros de masas experimentales para la quercitrina, presente en el extracto y el de la sustancia

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

patrón. En los espectros de masas se observan las señales para las moléculas protonadas $[M+H]^+$ y los iones-producto $[M+H-C_6H_{10}O_4]^+$. Para la identificación presuntiva se compararon las masas de las moléculas protonadas y las de sus iones-producto con los datos de literatura (Flores y col. 2015, Huang y col., 1998; Wei y col., 2021).

De los 17 compuestos identificados, dos correspondieron a proantocianidinas [galocatequina-(4 α -8)-galocateol (**1**) y galocatequina-(4 α -8)-catequina (**2**)]; cuatro, a flavanoles [galocatequina (**3**), catequina (**4**), galato de epigalocatequina (**6**) y galato de epicatequina (**12**)]; ocho, a flavonoles [isómero de hibiscetina-*O*-metilpentósido (**5**), isómeros de miricetina-*O*-pentósido (**7** y **10**), los isómeros de miricetina-*O*-metilpentósido (**8** y **11**) miricetina-*O*-hexósido (**9**), guajavarina (**13**) y quercitrina (**14**)] y tres, a flavanonas [pinocembrina-*O*-hexósido (**15**), pinocembrina-*O*-[4'',6''-hexahidroxidifenoil]-hexósido (**16**), y pinocembrina (**17**)].

Tabla 7. Identificación por UHPLC-ESI⁺- Orbitrap-HRMS de los compuestos fenólicos en el extracto hidroalcohólico de *Psidium sartorianum*, después de la destilación de la planta.

N° Fig. 19	t _R , min	Compuesto	Fórmula	[M+H] ⁺	Δppm	Iones-producto m/z [M+H-X] ⁺ (Δppm)
1	3,13	Galocatequina-(4α-8)-galocatecol ^b	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₄	611,13983	0,49	443.09659 [M+H-C ₈ H ₈ O ₄] ⁺ (-1,55).
2	3,42	Galocatequina-(4α-8)-catequina ^b	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	595,14545	1,39	427.12202 [M+H-C ₈ H ₈ O ₄] ⁺ (-0,79).
3	3,44	Galocatequina ^b	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	307,08122	0,57	289,07019 [M+H-H ₂ O] ⁺ (-1,64); 139,03883 [M+H-C ₈ H ₈ O ₄] ⁺ (-0,98); 123,04415 [M+H-C ₈ H ₈ O ₅] ⁺ (0,77).
4	3,83	Catequina ^a	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	291,08631	1,33	273,07590 [M+H-H ₂ O] ⁺ (0,54); 139,03911 [M+H-C ₈ H ₈ O ₄] ⁺ (0,99); 123,04431 [M+H-C ₈ H ₈ O ₄] ⁺
5	3,93	Isómero de hibiscetina-metilpentósido ^b	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	481,09842	1.56	335.04004 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₄] ⁺ (0,83); 169.01340 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₄ - C ₈ H ₆ O ₄] ⁺ (1,46)
6	4,06	Epigalocatequina galato ^a	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	459,09218	0,28	-
7	4.06	Miricetina-O-pentósido ^b	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₂	451,08719	0,19	319,04465 [M+H-C ₅ H ₈ O ₄] ⁺ (0,61); 153,01816 [M+H-C ₅ H ₈ O ₄ - C ₈ H ₆ O ₄] ⁺ (-0,50)
8	4,14	Isómero de miricetina-O-ramnósido ^b	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	465,10306	0,65	319,04489 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₄] ⁺ (0,15); 153,01828 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₄ - C ₈ H ₆ O ₄] ⁺ (0,29)

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

Continuación. **Tabla 7.**

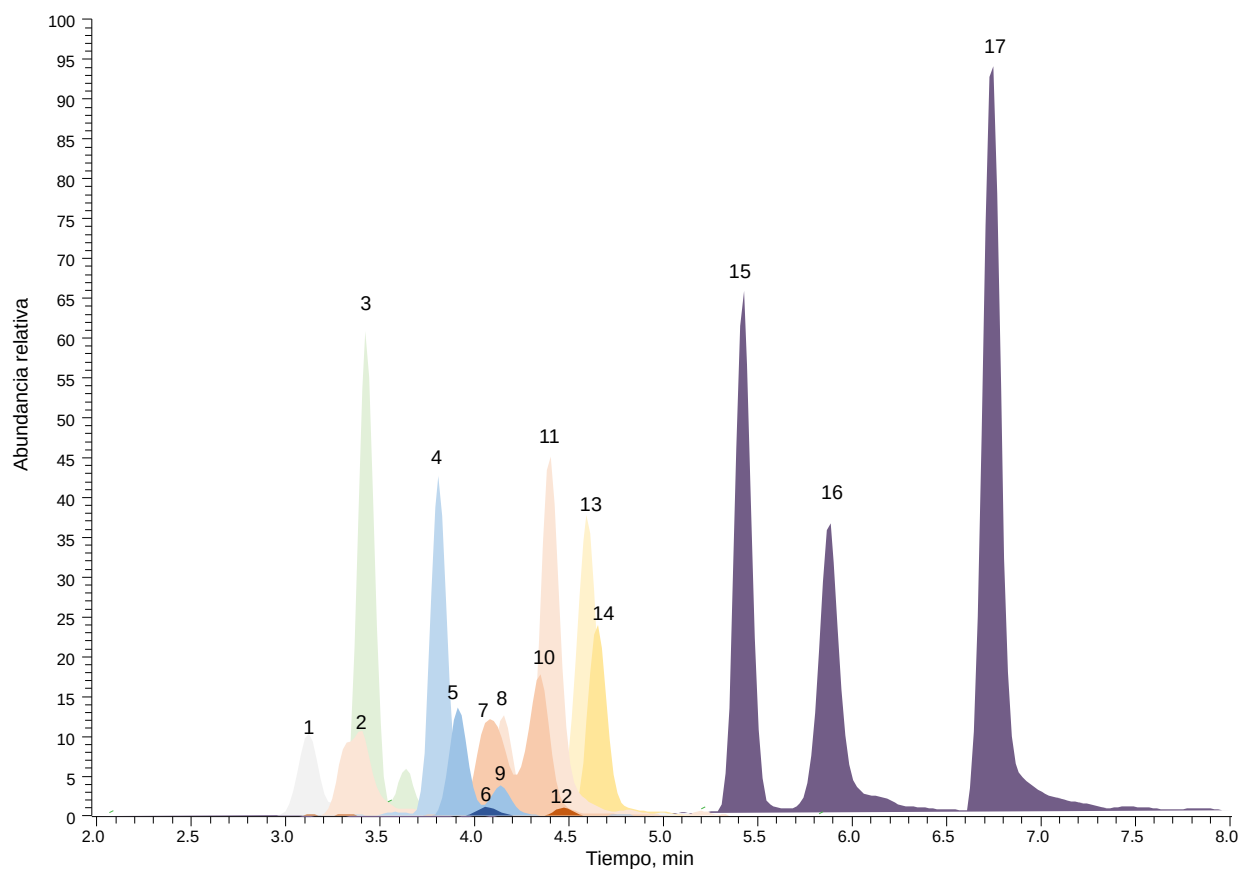
9	4,16	Miricetina-hexósido ^b	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	481,09767	0,80	319,04489 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺ (0,80); 153,01831 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅ - C ₈ H ₆ O ₄] ⁺ (0,49)
10	4,35	Miricetina-pentósido ^b	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₂	451,08688	0,49	319,04449 [M+H-C ₅ H ₈ O ₄] ⁺ (1,09); 153,01828 [M+H-C ₅ H ₈ O ₄ - C ₈ H ₆ O ₄] ⁺ (0,29)
11	4,39	Isómero de miricetina-O-ramnósido ^b	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	465,10291	0,33	319,04477 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₄] ⁺ (0,23); 153,01814 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₄ - C ₈ H ₆ O ₄] ⁺ (0,60)
12	4,45	Epicatequina galato ^a	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	443,09727	0,84	-
13	4,59	Guajavarina ^b	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	435,09229	0,22	303,04965 [M+H-C ₅ H ₈ O ₄] ⁺ (0,91); 153,01822 [M+H-C ₅ H ₉ O ₄ - C ₈ H ₆ O ₃] ⁺ (-0,10)
14	4,65	Quercitrina ^a	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	449,10783	1,20	303,04938 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₄] ⁺ (- 1,82); 153,1820 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₄ - C ₈ H ₆ O ₃] ⁺ (-1,0)
15	5,43	Pinocembrina-O-hexósido ^b	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	419,13397	0,75	257,08069 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺ (-0,57); 153,01814 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅ - C ₈ H ₈] ⁺ (-0,60)
16	5,87	Pinocembrina-O-[4'',6''- hexahidroxidifenoil]-hexósido ^b	C ₃₅ H ₂₈ O ₁₇	721,14056	0,89	703,13000 [M+H-H ₂ O] ⁺ (0,91); 465,06671 [M+H-C ₁₅ H ₁₂ O ₄] ⁺ (0,74); 257,08084 [M+H- C ₂₀ H ₁₆ O ₁₃] ⁺ ; 153,01825 [M+H- C ₂₈ H ₂₄ O ₁₃] ⁺ (0,09)
17	6,73	Pinocembrina ^a	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	257,08083	0,02	153,01845 [M+H-C ₈ H ₈] ⁺ (1,39)

X: Fórmula elemental del fragmento neutro.

^a Identificación confirmatoria basada en la comparación de las masas exactas de las moléculas protonadas y sus tiempos de retención con los de sustancias de referencia certificadas; las corrientes iónicas extraídas se muestran en el **Anexo 6**.

^b Identificación presuntiva basada en la comparación de las masas exactas de las moléculas protonadas y de sus iones-producto con lo reportado en literatura (Flores y col. 2015, Huang y col., 1998; Wei y col., 2021).

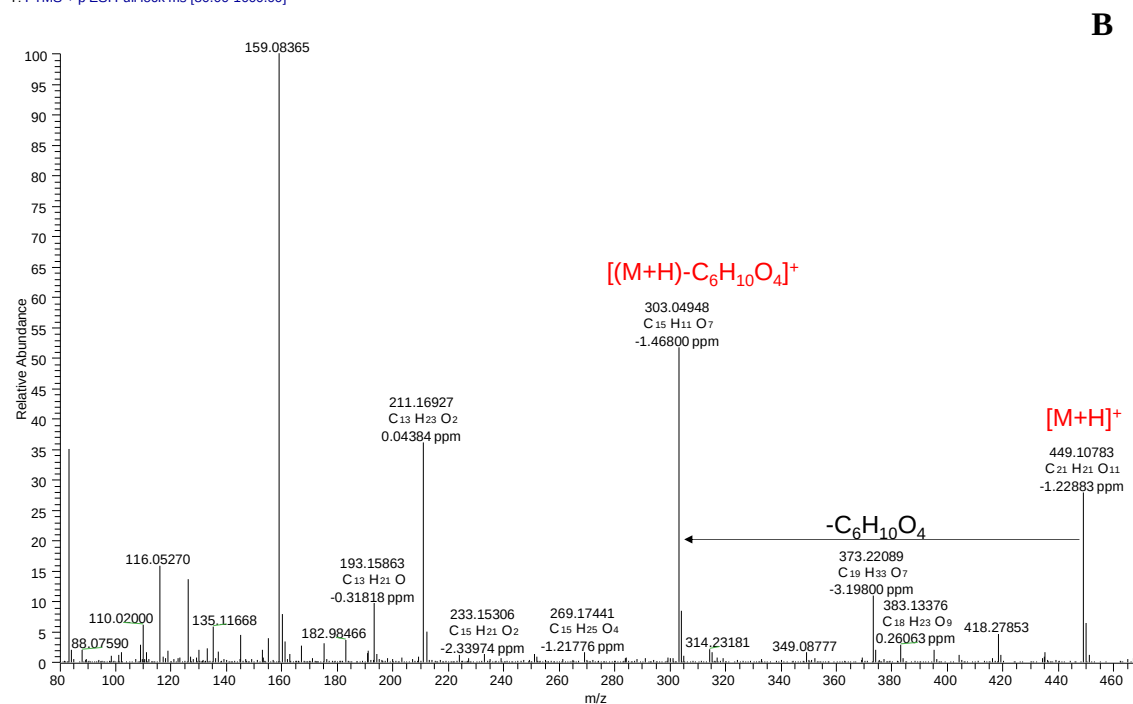
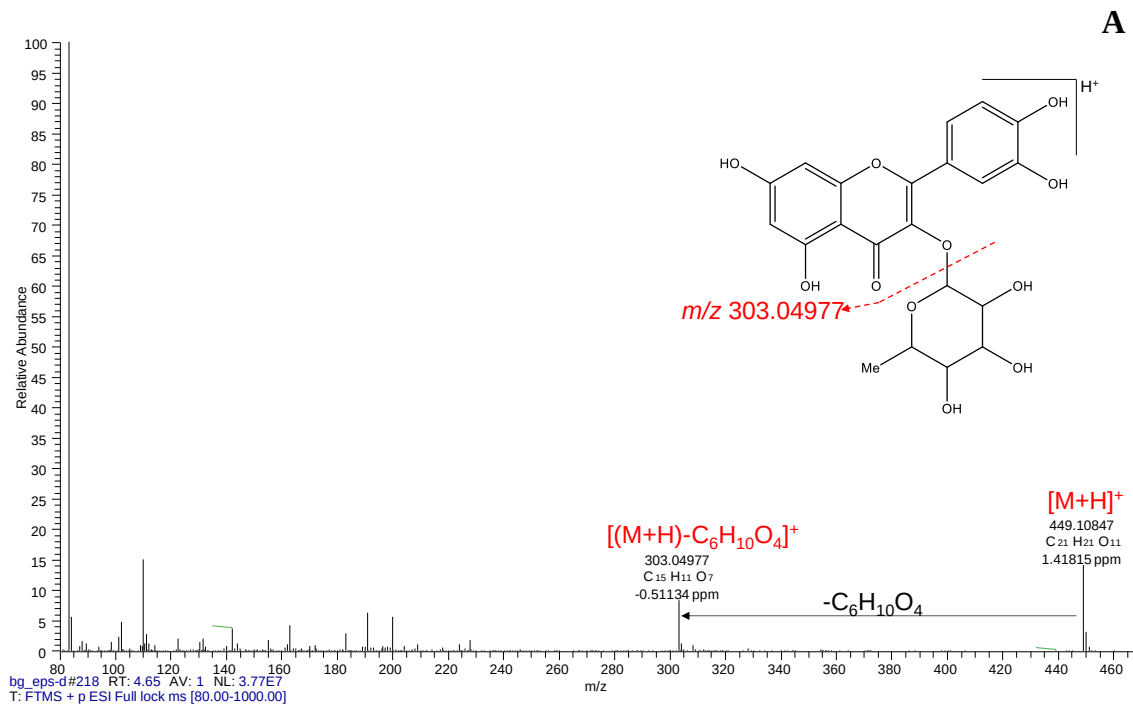
Figura 19. Corrientes iónicas extraídas (EIC) de las moléculas protonadas $[M+H]^+$ obtenidas por UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-HRMS de los flavonoides presentes en el extracto hidroalcohólico de material vegetal de *Psidium sartorianum*, después de su destilación. Véase la **Tabla 7** para la identificación de los picos.



MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

Figura 20. Espectros de masas experimentales obtenidos por ESI⁺-HRMS de **A.** Quercitrina presente en el extracto de *Psidium sartorianum*, después de la destilación de la planta y **B.** Sustancia patrón, quercitrina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.).

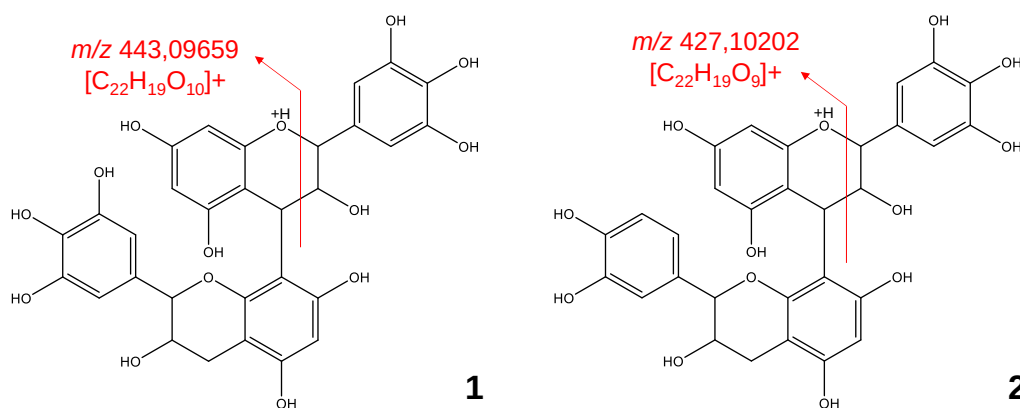
bg_quercitrina1#212 RT: 4.59 AV: 1 NL: 2.92E7
T: FTMS + p ESI Full lock ms [80.00-1000.00]



MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

Las proantocianidinas son los compuestos más polares de las sustancias fenólicas detectadas y aparecen en los primeros minutos de la corrida cromatográfica (HPLC en fase reversa). Las proantocianidinas **1** y **2** presentaron los iones $[M+H]^+$ en m/z 611,13983 ($C_{30}H_{27}O_{14}$) y 595,14545 ($C_{30}H_{27}O_{13}$), respectivamente. Las rupturas de los enlaces O_1-C_2 y C_3-C_4 del anillo C, por una mecanismo tipo Retro-Diels-Alder (RDA), con pérdida de la especie $C_8H_8O_4$ (del anillo B) y generaron los iones-producto en m/z 443,09659 ($C_{22}H_{19}O_{10}$) y 427,10202 ($C_{22}H_{19}O_9$) para los compuestos **1** y **2**, respectivamente (Véase **Figura 21**). En el **Anexo 7** se muestran los espectros de masas obtenidos para todos los compuestos identificados.

Figura 21. Formación de iones-productos de RDA, de galocatequina-(4 α -8)-galocateol (**1**) y galocatequina-(4 α -8)-catequina (**2**).

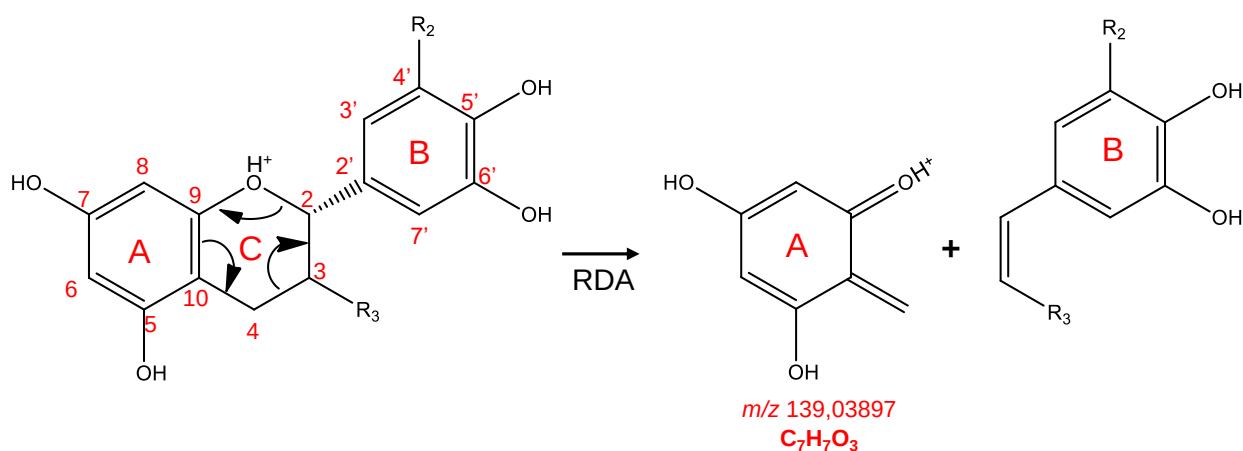


De los cuatro flavanoles identificados, dos se encontraron en el extracto como agliconas, la galocatequina (**3**) y la catequina (**4**), con $[M+H]^+$ en m/z 307,08122 ($C_{15}H_{15}O_7$) y 291,08631 ($C_{15}H_{15}O_6$), respectivamente. Las moléculas protonadas de estas dos agliconas, al fragmentarse, perdieron la molécula de agua y generaron iones-producto $[(M+H)-H_2O]^+$ en m/z 289,07019 ($C_{15}H_{13}O_6$) y 273,07587 ($C_{15}H_{13}O_5$), para los compuestos **3** y **4**, respectivamente. Los flavanoles **3** y **4** presentaron el ion-producto en m/z 139, con fórmula elemental $C_7H_7O_3$, producto de la

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

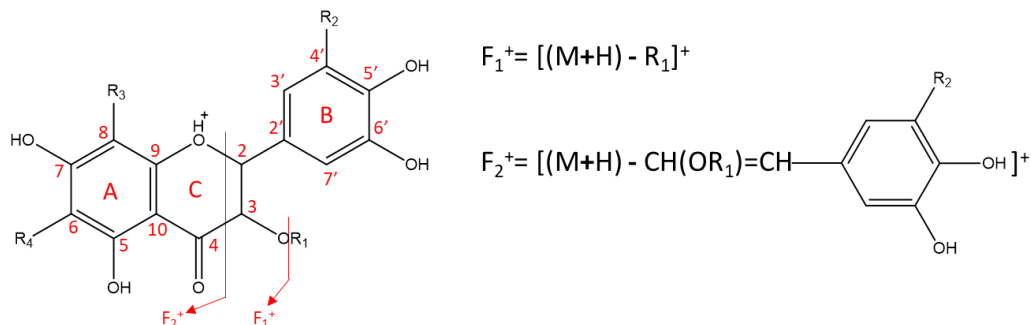
ruptura de los enlaces O₁-C₂ y C₃-C₄, por un mecanismo tipo RDA (Véase **Figura 22**). Debido a la cantidad baja de los flavanoles **6** y **12** presentes en el extracto, su identificación se realizó, únicamente, por comparación de las masas exactas de las moléculas protonadas [M+H]⁺ y de sus tiempos de retención, con los obtenidos de las sustancias-patrón.

Figura 22. Formación del ion-producto en *m/z* 139,03897, común para los flavanoles galocatequina (**R**₂=OH; **R**₃=H) y catequina (**R**₂=H; **R**₃=OH).



Los flavonoles fueron los compuestos identificados en mayor proporción el extracto de *P. sartorianum*. Todos los flavonoles identificados (**5**, **7-11**, **13-14**) se encontraron en forma de glucósidos. En la **Figura 23** se muestra el esquema general de fragmentación de los flavonoles identificados. Las agliconas de estos flavonoles presentaron iones-producto en *m/z* 153,01823 (C₇H₅O₄⁺) que se debe a la ruptura de los enlaces O₁-C₂ y C₃-C₄; sin embargo, como el compuesto **5** contiene un grupo hidroxilo adicional en el anillo A, esta ruptura generó el ion-producto en *m/z* 169,01340 (C₇H₅O₅). Debido a la alta resolución del *Orbitrap*-MS fue posible conocer, con base en las masas exactas de las moléculas protonadas y de sus iones-producto, los tipos de azúcares presentes en cada uno de los flavonoles identificados.

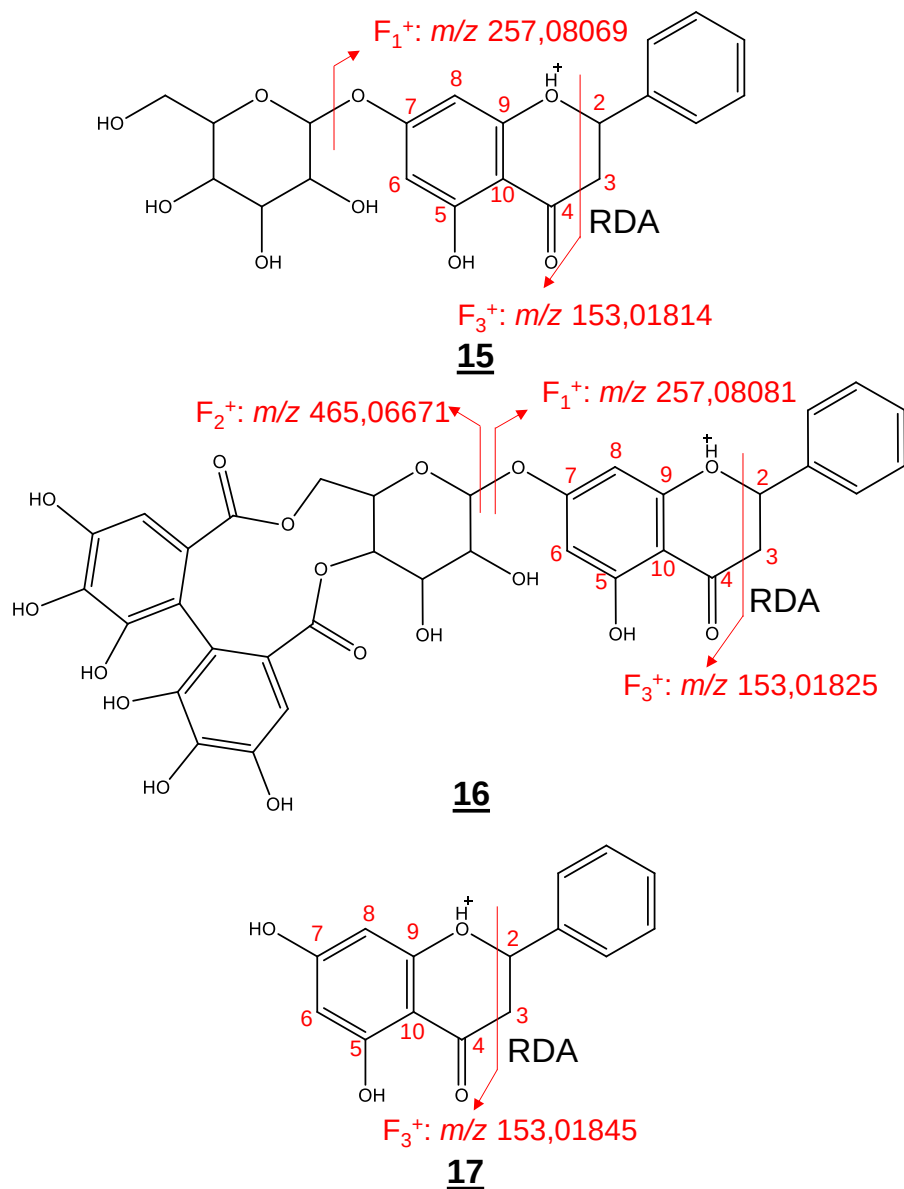
Figura 23. Formación de iones-producto F_1^+ y F_2^+ principales en los espectros de masas de los flavonoles presentes en el extracto de *Psidium sarturianum*.



Compuesto	Sustituyentes				Masa exacta (Δppm)		
	R_1	R_2	R_3	R_4	$[M+H]^+$	F_1^+	F_2^+
<u>5</u> Isómero de hibiscetina- <i>O</i> -metilpentósido	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$	OH	OH/H	H/OH	481,09842 (1,56)	335,04004 (0,83)	169,0134 (1,46)
<u>7</u> Miricetina- <i>O</i> -pentósido	$\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4$	OH	H	H	451,08719 (0,49)	319,04465 (0,61)	153,01816 (0,5)
<u>8</u> Isómero de miricetina- <i>O</i> -ramnósido	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$	OH	H	H	465,10291 (0,93)	319,04489 (0,15)	153,01828 (0,29)
<u>9</u> Miricetina- <i>O</i> -hexósido	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$	OH	H	H	319,04489 (0,80)	319,04484 (0,04)	153,01831 (0,49)
<u>10</u> Miricetina- <i>O</i> -pentósido	$\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4$	OH	H	H	451,08688 (0,49)	319,04449 (1,09)	153,01828 (0,29)
<u>11</u> Isómero de miricetina- <i>O</i> -ramnósido	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$	OH	H	H	465,10291 (0,33)	319,04477 (0,23)	153,01814 (0,6)
<u>13</u> Guajavarina	$\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4$	H	H	H	435,09229 (0,22)	303,04965 (0,91)	153,01822 (0,1)
<u>14</u> Quercitrina	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$	H	H	H	449,10783 (1,20)	303,04938 (1,82)	153,01822 (1,0)

En los espectros de masas de las flavanonas 15, 16 y 17 aparecen los iones $[M+H]^+$ en m/z 419,13397 ($\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{O}_9$), 721,14056 ($\text{C}_{35}\text{H}_{29}\text{O}_{17}$) y 257,08083 ($\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}_4$), respectivamente. Las flavonas 15 y 16 son derivados del pinocembrina (17). La formación de los principales iones-producto en los espectros de masas de las tres flavanonas se muestra en la **Figura 24**. El compuesto 17, concretamente $[M+H]^+$, durante su fragmentación, generó un ion-producto en m/z 153,01845 ($\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_4$), debido a la ruptura de los enlaces $\text{O}_1\text{-C}_2$ y $\text{C}_3\text{-C}_4$, por una mecanismo tipo RDA, similar a los iones-producto observados en los espectros de masas de las flavanonas 15 y 16 en m/z 153,01814 y 153,01825, respectivamente.

Figura 24. Formación de los principales iones-producto en los espectros de masas de las flavonas presentes en el extracto de *Psidium sartorianum*.



Compuesto	Masa exacta (Δ ppm)			
	$[M+H]^+$	F_1^+	F_2^+	F_3^+
15 Pinocembrina-O-hexósido	419,13397 (0,75)	257,08069 (0,57)	-	153,01814 (0,60)
16 Pinocembrina-O-[4'',6''-hexahidroxidifenoil]-hexósido	721,14056 (0,89)	257,08081 (0,09)	465,06671 (0,74)	153,01825 (0,09)
17 Pinocembrina	257,08083 (0,02)	-	-	153,01845 (1,39)

4.2.3 Caracterización química por HPLC-DAD del extracto de *Psidium sartorianum*.

El extracto hidroalcohólico de *P. sartorianum*, después de la destilación de la planta, se analizó también por HPLC-DAD. El perfil cromatográfico se muestra en la **Figura 25**, la lista de compuestos identificados aparece en la **Tabla 8** y en el **Anexo 8**, figuran las longitudes de onda máximas de absorción (λ^{max}) de los compuestos. Se identificaron tentativamente diez compuestos fenólicos en el extracto con base en la comparación de sus tiempos de retención y espectros UV, con los de las sustancias de referencia y los reportados en literatura científica (Shain y Miller 1981; Huang y col. 1998; Aaby y col. 2007; Su y col., 2008; Vandeputte y col. 2009; Fracassetti y col. 2013).

Figura 25. Perfil cromatográfico obtenido por HPLC-DAD ($\lambda = 270 \text{ nm}$) del extracto hidroalcohólico de *Psidium sartorianum*, después de la destilación de la planta. Véase la identificación de los picos cromatográficos en la **Tabla 8**. Los picos cromatográficos con (*) no fueron identificados, sus máximos de absorción se muestran en el **Anexo 8**.

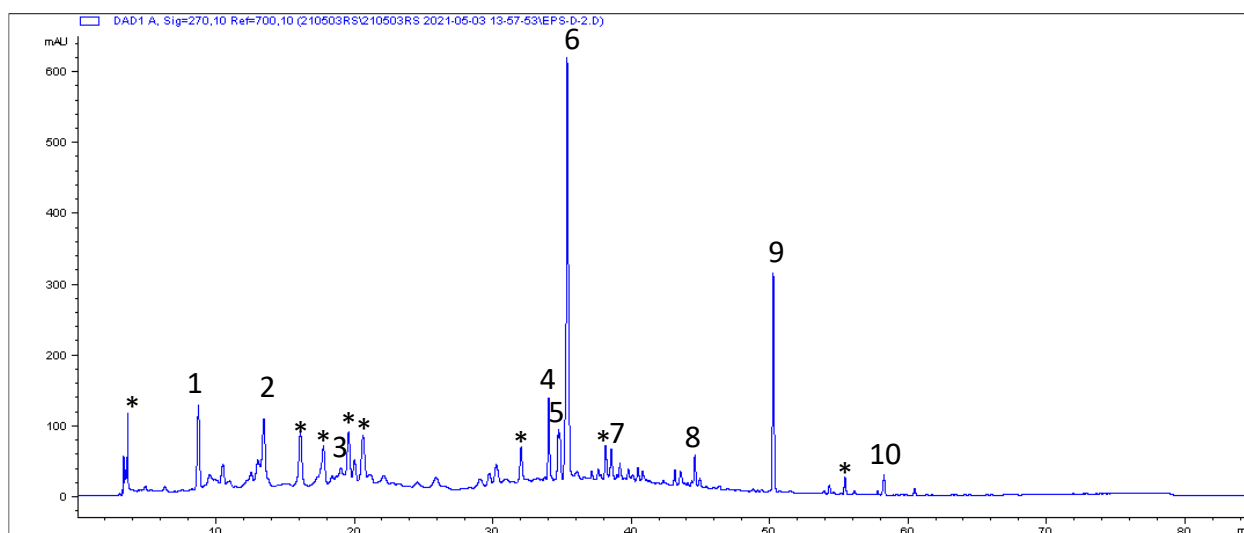


Tabla 8. *Análisis por HPLC-DAD ($\lambda=270$ nm) de los compuestos fenólicos detectados en el extracto hidroalcohólico de Psidium sartorianum.*

N° Fig. 24	tr, min	Compuesto	Referencias
1	8,71	Ácido gálico ^a	Fracassetti y col. (2013)
2	13,44	Elagitanino ^b	Aaby y col. (2007)
3	18,86	Catequina ^a	Vandeputte y col. (2009)
4	33,99	Miricetina- <i>O</i> -pentósido	Fracassetti y col. (2013)
5	34,71	Miricetina- <i>O</i> -pentósido	Fracassetti y col. (2013)
6	35,36	Ácido elágico ^a	Fracassetti y col. (2013)
7	38,57	Quercetrina ^a	Su y col. (2008)
8	44,58	Derivado de flavona ^b	Huang y col. (1998)
9	50,37	Derivado de flavona ^b	Huang y col. (1998)
10	58,31	Pinocembrina ^a	Shain y Miller (1981)

^aIdentificación confirmatoria con materiales de referencia.

^bIdentificación presuntiva basada en la comparación de los espectros UV con los reportados en literatura [Fracassetti y col. (2013); Aaby y col. (2007); Vandeputte y col. (2009); Su y col. (2008); Huang y col. (1998); Shain y Miller (1982)].

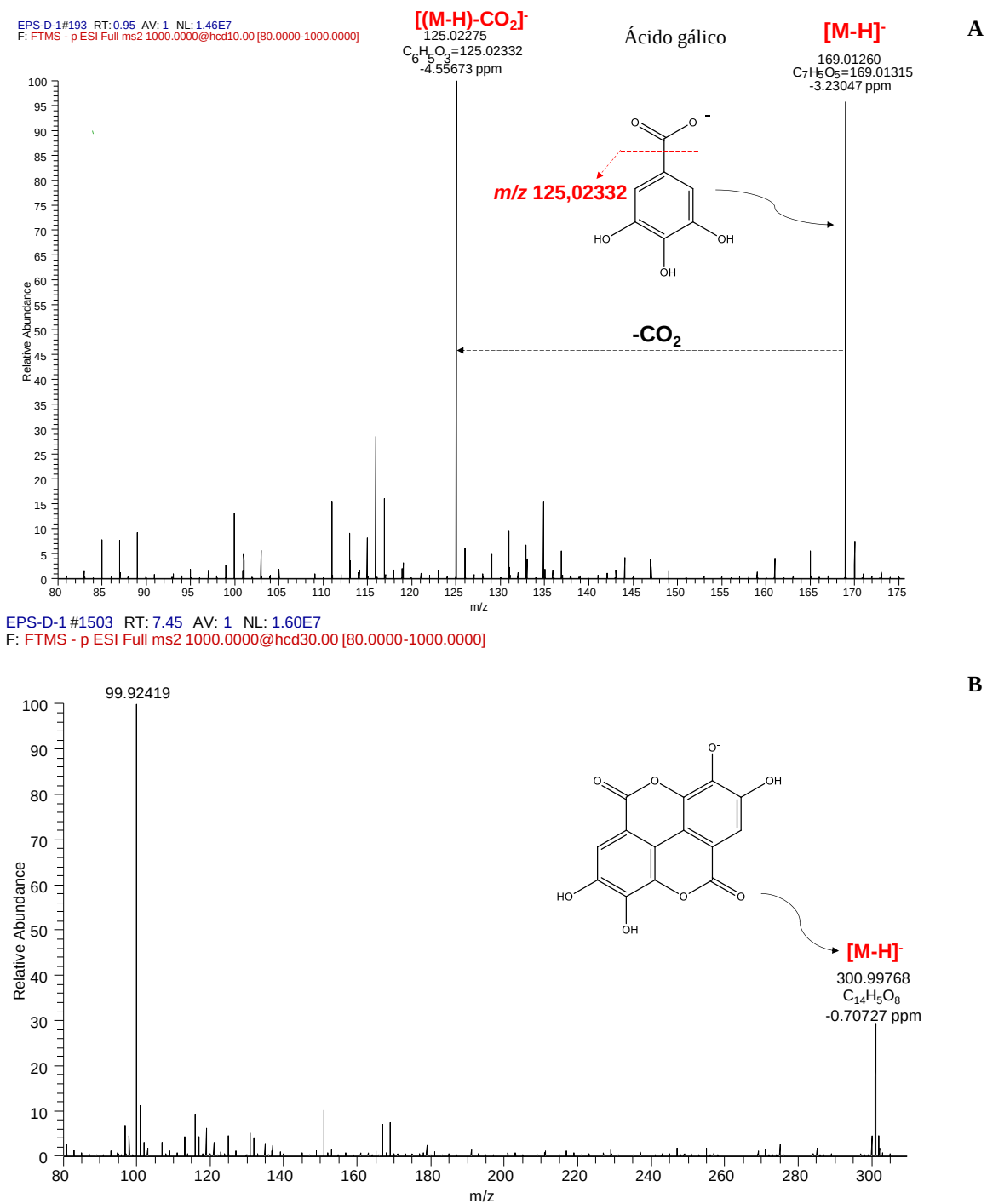
De los diez compuestos registrados por HPLC-DAD en el extracto, cinco, se identificaron de manera confirmatoria y cinco, de manera presuntiva. Los ácidos gálico y elágico, por su naturaleza química, no habían sido identificados por ESI⁺-HRMS, pero, sí se identificaron por HPLC-DAD, usando sustancias-patrón. Los compuestos de los picos cromatográficos **7** y **8** de la **Tabla 8**, posiblemente, correspondan a los previamente identificados por ESI⁺-HRMS pinocembrina-*O*-hexósido y pinocembrina-*O*-[4'',6''-hexahidroxidifenoil]-hexósido.

Por UHPLC-ESI-HRMS se confirmó la presencia de los ácidos gálico y elágico, por comparación de sus tiempos de retención, las masas exactas de las moléculas deprotonados [M-H]⁻ e iones-producto, idénticos a los obtenidos de las sustancias de referencia y lo reportado en literatura científica (Aaby y col., 2007; Regueiro y col., 2014). En la **Figura 26** se muestran los espectros de masas obtenidos por UHPLC-ESI-HRMS de los ácidos gálico y elágico. Las señales de la moléculas deprotonada y de los iones-producto del ácido gálico fueron de

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

intensidad baja y se observaron cuando se aplicó un voltaje 10 V en la celda de disociación de alta energía (HCD, por sus siglas en inglés). El ion-producto $[(M-H)-CO_2]^-$ observado en el espectro de masas del ácido gálico, se registró en m/z 125,02275. Para el ácido elágico, con un energía de 30 V en la HCD, se detectó la molécula deprotonada en m/z 300,99768 con fórmula elemental $C_{14}H_5O_8$. El ion-pruducto en m/z 257 reportado en literatura (Mullen y col., 2003; Regueiro y col. 2014), se formó por la descarboxilación de la molécula deprotonada, aunque fue de intensidad baja(<1%).

Figura 26. Espectros de masas, obtenidos por UHPLC-ESI-HRMS, de **A.** Ácido gálico y **B.** Ácido elágico, presentes en el extracto *Psidium sartorianum*, después de la destilación de la planta.



4.2.4 Caracterización química por GC/MS del extracto de *Psidium sartorianum*.

La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas permitió la identificación de compuestos volátiles y volatilizables, que no habían sido detectadas por cromatografía líquida, en el extracto de *P. sartorianum*, obtenido de la planta después de su destilación. En la **Figura 27** se muestra el cromatograma del extracto obtenido y, en la **Tabla 9**, se muestran los compuestos identificados junto con sus abundancias relativas. Los espectros de masas de los picos cromatográficos **10** y **16** (Véase **Figura 26**) de la **Tabla 9**, se muestran en el **Anexo 5**. Para el pico cromatográfico **10** se observaron los iones molecular $[M]^+$, de baja intensidad en m/z 98, y los iones-productos $[M-CH_3]^+$ en m/z 83, así como los iones-prodcuto $[M-C_3H_7]^+$ o $[M-CH_3CO]^+$ en m/z 55, y $[M-C_4H_7]^+$ en m/z 43. El pico cromatográfico **16** corresponde, probablemente, a la coelución de compuestos; además, en su espectro de masas aparece el ion en m/z 60, que es un ion-producto típico de la ruptura McLafferty en los ácidos. Los LRI de los cuatro primeros compuesto no se calcularon debido a que eluyeron antes que la primera *n*-parafina empleada (C₈) para estos análisis.

Figura 27. Perfil cromatográfico obtenido por GC/MS (modo full scan) del extracto de *P. sartorianum*, obtenido de la planta después de su destilación. Columna DB-5MS (60 m), inyección split 1:30, MSD (EI, 70 eV). Véase la identificación de los picos cromatográficos en la **Tabla 9**.

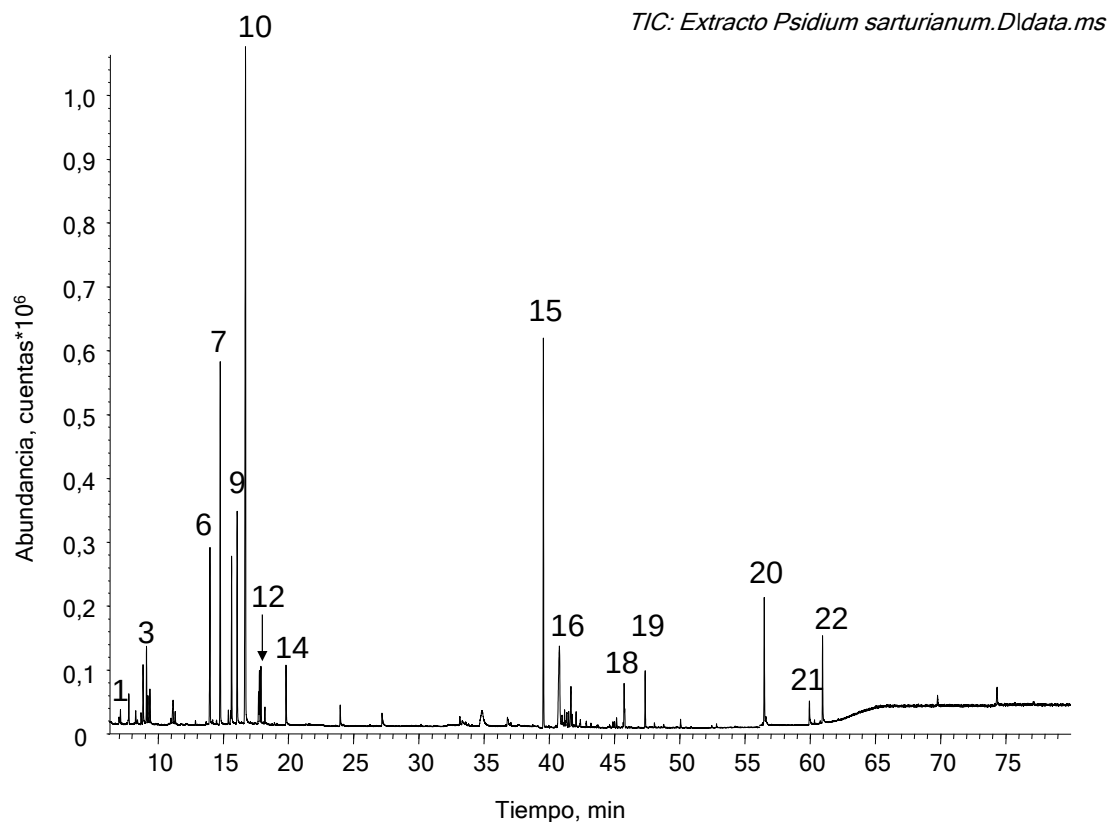


Tabla 9. Identificación tentativa por GC/MS (Columna DB-5MS, 60 m) de los compuestos presentes en el extracto de *P. sartorianum*, obtenido de la planta después de su destilación.

Nº Fig. 36	t _R , min	Compuesto	LRI _{Exp.}	LRI _{Lit.}	GC área relativa, %
1	7,7	Metilpetan-3-ol ^{a, b}	-	749 [3]	1,0
2	8,8	Hexan-3-ona ^{a, b}	-	790 [3]	1,9
3	9,1	1-Metilciclopentan-3-ol ^{a, b}	-	796 [3]	2,1
4	9,2	Hexan-3-ol ^{a, b}	-	797 [3]	0,7
5	9,4	Hexan-2-ol ^{a, b}	801	801 [3]	0,9
6	14,0	2-Metil-2-pentanetiol ^{a, b}	911	930 [3]	5,7
7	14,8	2,2-Dimetil-pentanal ^{a, b}	929	-	11,1
8	15,6	3-Hexilhidroperóxido ^a	949	965 [3]	4,9
9	16,1	2-Hexilhidroperóxido ^a	958	-	6,3
10	16,7	N.I.; m/z (I%): 98 (1%), 83 (100%), 71 (16%), 55 (58%), 43 (51%).	973	-	29,3
11	17,7	N.I.; m/z (I%): 100 (1%), 83 (100%), 67 (14%), 55 (95%), 43 (36%).	996	-	0,9
12	17,8	N.I.; m/z (I%): 83 (100%), 71 (16%), 67 (10%), 55 (89%), 43 (15%).	997	-	1,7
13	17,9	N.I.; m/z (I%): 83 (100%), 71 (15%), 55 (89%), 41 (31%).	1000	-	1,8
14	19,8	N.I.; m/z (I%): 121 (1%), 98 (23%), 91 (7%), 71 (9%), 58 (27%), 43 (100%).	1046	-	1,7
15	39,5	Ftalato de dietilo ^{a, b} (Plastificante)	1589	1590 [1]	11,5
16	40,8	N.I.; m/z (I%): 207 (1%), 205 (1%), 204 (1%), 156 (10%), 118 (30%), 112 (58%), 71 (85%), 60 (100%), 43 (70%).	1632	-	6,9
17	41,7	N.I.; m/z (I%): 121 (1%), 98 (23%), 91 (7%), 71 (9%), 58 (27%), 43 (100%).	1665	1649 [1]	1,6
18	45,7	N.I.; m/z (I%): 220 (15%), 202 (21%), 187 (16%), 179 (52%), 161 (47%), 147 (21%), 127 (88%), 123 (100%), 109 (83%), 95 (55%), 81 (71%), 69 (49%), 55 (58%).	1829	-	0,8
19	47,4	Clovanediol ^{a, b}	1901	1885 [3]	1,7
20	56,5	trans-9-Octadecenamida ^a	2359	2386 [3]	4,2
21	50,0	Pinocembrina ^{a, b}	2508	2513 [3]	0,9
22	61,0	Pinostrobin ^a	2564	-	2,6

N.I.: no identificado.

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

^b Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales en columna DB-5MS ([1] Adams, 2007; [2] Babushok y col., 2011; [3] NIST, 2017.

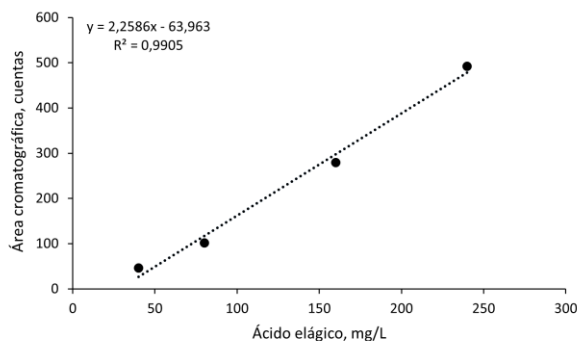
MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

Se identificaron 15 compuestos en cantidades $>0,7\%$, que representaron el 57% del área cromatográfica total. El compuesto “mayoritario” resultó ser un artefacto, el ftalato de dietilo (11,5%), un plastificante proveniente, posiblemente, del solvente de extracción, el etanol. Entre otros compuestos se encuentran los sesquiterpenos β -eudesmol y clovanediol y pinostrobina (metil éter de pinocembrina).

4.2.5 Cuantificación del ácido elágico en el extracto de *P. sartorianum*, obtenido de la planta después de su destilación.

La cuantificación del el ácido elágico, componente más abundante en el extracto de *P. sarturianum*, de plantas después de su destilación, se llevó a cabo por el método de calibración externa, empleando la sustancia patrón. Se evaluaron concentraciones entre 50 y 250 mg/L. La curva de calibración y la ecuación obtenida se muestran en la **Figura 28**. Mediante la extrapolación y teniendo en cuentas las diluciones realizadas, se pudo establecer que el contenido de ácido elágico fue de $400 \pm 25,7$ mg/g de extracto.

Figura 28. Curva de calibración para la cuantificación del ácido elágico presente en el extracto de *P. sartorianum*, obtenido del material vegetal, después de su destilación.



4.3 DESARROLLO DE LA MICROEMULSIÓN

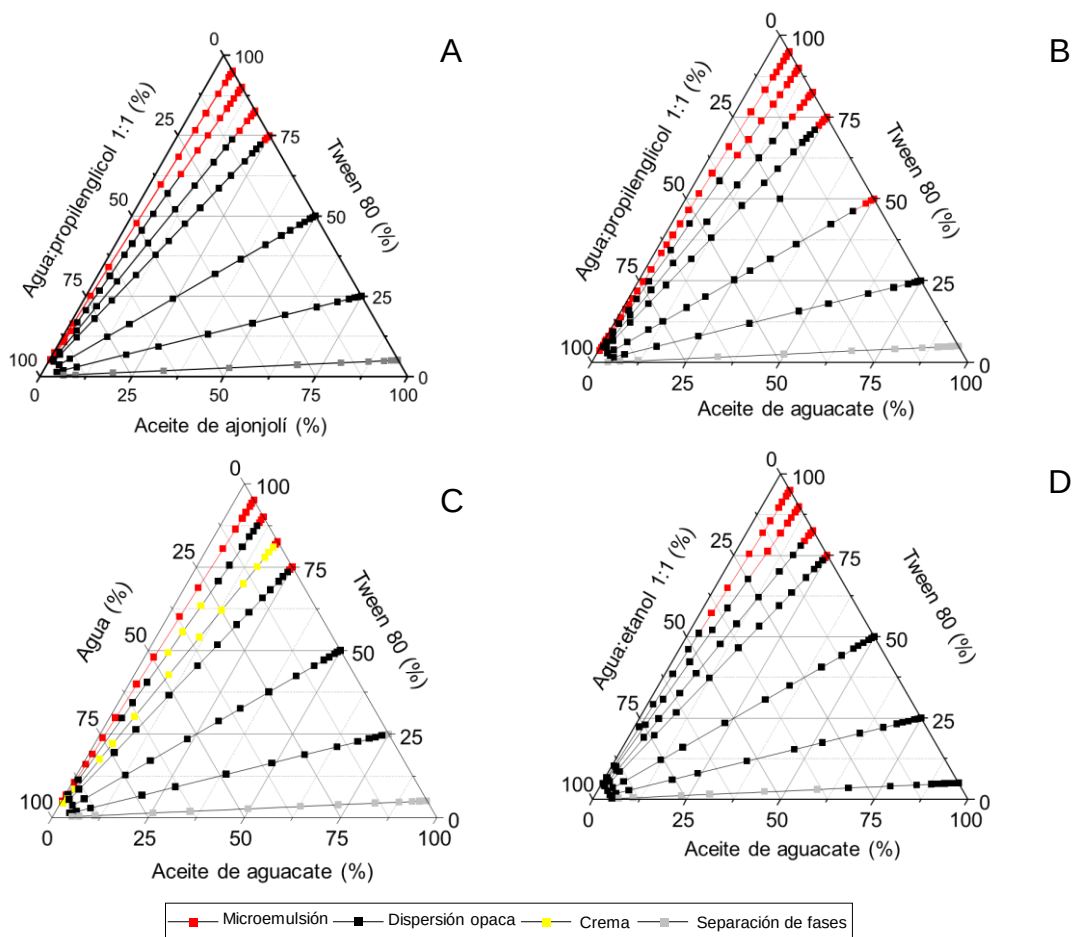
4.3.1 Diagrama de fases pseudoternarias

La existencia o no, de las microemulsiones, para las diferentes combinaciones de ingredientes se describió a través de diagramas de fases pseudoternarias (Véase **Figura 29**). Las combinaciones que formaron una microemulsión, se presentan de color rojo; las que generaron dispersión opaca, con color negro; aquellas, que dieron lugar a una macroemulsión (tipo crema), con color amarillo, las que presentaron separación de fases, con color gris.

La comparación de los diagramas de fases obtenidos con los aceites vegetales de ajonjolí (Véase **Figura 29A**) y aguacate (Véase **Figura 29B**) permitió establecer que, con el aceite de aguacate se obtuvo un mayor número de combinaciones que formaron microemulsiones, que con el aceite de ajonjolí. El aceite de aguacate se seleccionó para evaluar dos fases acuosas adicionales. La primera fase acuosa fue 100% agua, en la segunda, se sustituyó el propilenglicol por etanol. Con la fase acuosa de 100% agua se obtuvo un menor número de microemulsiones que con la fase acuosa constituida por agua:propilenglicol (1:1), y, para ciertas combinaciones, la formación de macroemulsiones (Véase **Figura 29C**). La fase acuosa conformada por agua: etanol (1:1) redujo el número de microemulsiones formadas (Véase **Figura 29D**); incluso, cuando su porcentaje en la mezcla fue mayor de 50%, esto, con una relación de Tween 80[®]: aceite de aguacate de 95:5.

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

Figura 29. Diagrama de fases con Tween® 80 como surfactante. **A.** Con agua: propilenglicol (1:1) y aceite de ajonjolí; **B.** Con aceite de aguacate; **C.** Con agua como fase acuosa y **D.** Con agua: etanol (1:1).



Con base en estos resultados, la siguiente combinación de ingredientes fue escogida para la microemulsión base, a saber: mezcla agua:propilenglicol (1:1) (65,7%) como fase acuosa, aceite de aguacate (1,5%), como fase oleosa; Tween® 80 (31,8%), como surfactante. Estos porcentajes se emplearon para el desarrollo de la microemulsión antioxidante con una ligera modificación,

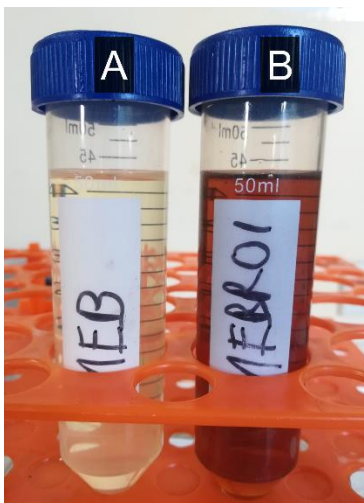
MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

i.e., se sustituyó una quinta parte del aceite vegetal de aguacate por el AE de *Piper marginatum*, para enmascarar el olor a grasa.

En total, se prepararon 2,1 L del primer lote de microemulsión con extracto de *P. sartorianum*, obtenido de la planta después de su destilación; para esto, en un recipiente de vidrio de 4 L, se mezclaron con agitación mecánica los componentes de la fase oleosa, *i.e.*, aceite de aguacate (31,6 mL), AE de *P. marginatum* (3,5 mL) y Tween® 80 (667 mL). En otro recipiente, el extracto *P. sarturianum* (21 g) se disolvió en agua:propilenglicol (relación 1:1) (440 mL) con ayuda de un baño de ultrasonido *Elmasonic S 300 H* (*Elma*, Alemania) (10 min, 24 °C). El extracto disuelto se agregó, lentamente, con una bureta, a la mezcla de la fase oleosa y el Tween® 80, con agitación manual de forma constante; finalmente, se agregó la mezcla agua:propilenglicol (936 mL). La microemulsión se almacenó en frascos de 600 mL. En la **Figura 30** se muestra una fotografía de la microemulsión base y de la microemulsión con extracto de *P. sartorianum*, obtenido de la planta después de su destilación.

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

Figura 30. **A.** Microemulsión base y **B.** Microemulsión con extracto de *P. sartorianum*, obtenido de la planta después de su destilación. Fotografía tomada por Juan Camilo HENRÍQUEZ SANABRIA, en el Centro de Investigación CENIVAM, UIS, Bucaramanga. Fecha: 26 de marzo de 2021.



La microemulsión con extracto de *P. sartorianum*, obtenido de la planta después de su destilación, fue del tipo O/W porque, cuando se adicionaba más cantidad de fase acuosa, ésta se difundía rápidamente en la microemulsión, sin observarse inversión de fases (Kreilgaard, 2002). La microemulsión antioxidante fue de color rojizo, similar al del extracto, no presentó turbidez a simple vista y clasificó como una microemulsión tipo Winsor IV. El aroma de la microemulsión fue similar al del AE de *Piper marginatum* incorporado.

4.3.2 Caracterización química de la fracción volátil de la microemulsión antioxidante.

Las composiciones químicas de las fracciones volátiles de las microemulsiones fueron estudiadas por medio de HS-SPME-GC/MS. Los perfiles cromatográficos de las fracciones volátiles de las microemulsiones base y con extracto de *Psidium sartorianum* se muestran en la **Figura 31**. Las composiciones químicas de las fracciones volátiles aparecen en **Tabla 10**. El LRI del etanol no

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

se calculó, debido a que eluyó antes que la primer *n*-parafina, C₈, empleada para los cálculos de los LRI. La diferencia entre los LRI_{Exp.} y LRI_{Ref.} del propilenglicol, fue debido al ensanchamiento de su pico cromatográfico.

Figura 31. Perfiles cromatográficos obtenidos por HS-SPME-GC/MS (modo full scan) de **A.** Fracción volátil de la microemulsión base y **B.** Fracción volátil de microemulsión con extracto de *P. sartorianum*. Columna DB-5MS (60 m). Inyección splitless. MSD (EI, 70 eV). Temperatura de exposición de la fibra (DVB/CAR/PDMS) fue 60 °C. Tiempos de pre-equilibrio térmico de la muestra, de la exposición de la fibra y de la desorción en el puerto de inyección fueron 15, 30 y 15 min, respectivamente. Véase la identificación de los picos cromatográficos en la **Tabla 10**.

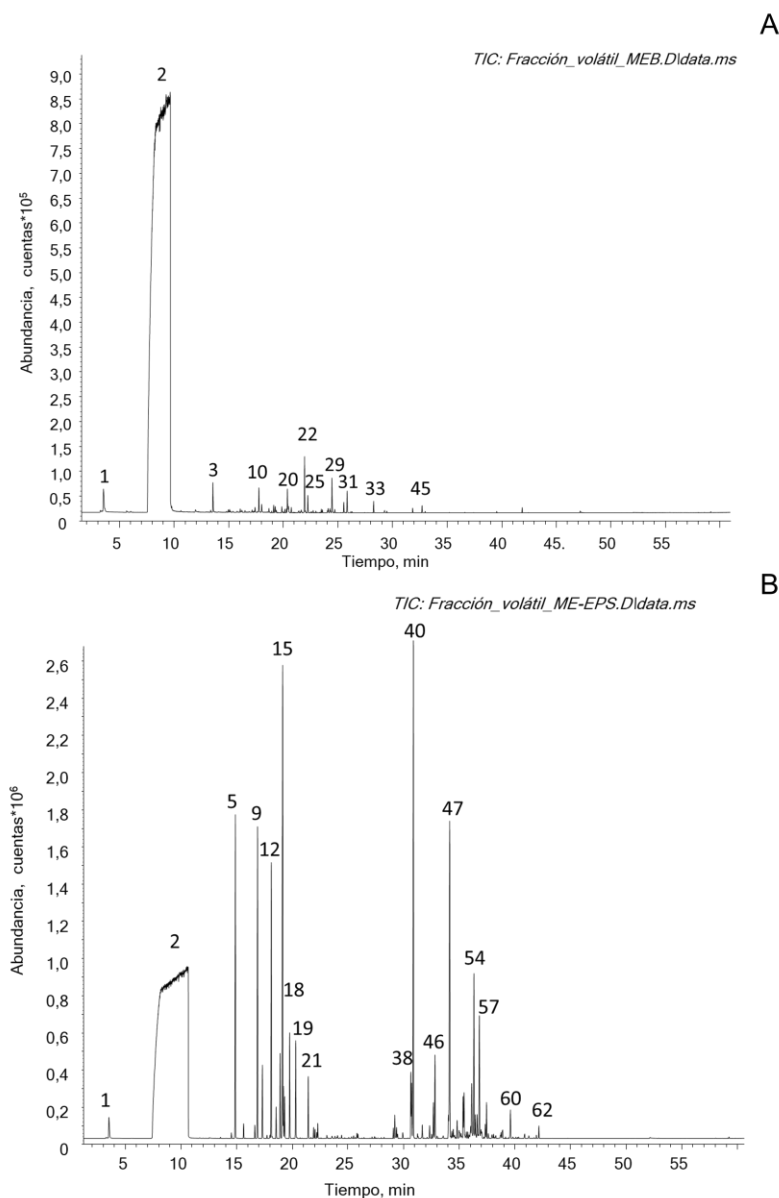


Tabla 10. Identificación GC/MS de los compuestos presentes en las fracciones volátiles, obtenidas por HS-SPME, de la microemulsión base (ME-B) y de la microemulsión con extracto de *P. sartorianum*, después de la destilación de la planta (ME-EPS).

N° Fig. 31	Compuesto	LRI		GC area relativa, %	
		Exp.	Lit.	ME-B	ME-EPS
1	Etanol ^a	-	427 [3]	0,19	0,24
2	Propilenglicol ^a	810	740 [3]	98,39	70,22
3	Heptanal ^{a, b}	903	901 [2]	0,18	-
4	α -Tujueno ^{a, b}	926	929 [2]	-	0,04
5	α -Pinenol ^{a, b}	934	936 [2]	-	2,25
6	Canfeno ^{a, b}	951	950 [2]	-	0,09
7	Sabineno ^{a, b}	974	973 [2]	-	0,09
8	β -Pinenol ^{a, b}	980	977 [2]	-	2,16
9	β -Mirceno ^{a, b}	989	989 [2]	-	0,45
10	Decano ^{a, b}	999	1000 [1]	0,15	0,02
11	Octanal ^{a, b}	1005	1003 [1]	0,05	0,02
12	α -Felandreno ^{a, b}	1008	1004 [2]	-	1,82
13	α -Terpineno ^{a, b}	1018	1014 [2]	-	0,19
14	<i>p</i> -Cimeno ^{a, b}	1027	1024 [2]	-	0,60
15	Limoneno ^{a, b}	1031	1024 [1]	0,04	4,10
16	β -Felandreno ^{a, b}	1034	1030 [2]	-	0,30
17	<i>cis</i> - β -Ocimeno ^{a, b}	1037	1038 [2]	-	0,26
18	<i>trans</i> - β -Ocimeno ^{a, b}	1048	1047 [1]	-	0,63
19	γ -Terpineno ^{a, b}	1061	1059 [2]	-	0,62
20	<i>trans</i> -Octen-2-al ^{a, b}	1061	1060 [2]	0,12	-
21	Terpinoleno ^{a, b}	1088	1086 [2]	-	0,38
22	Undecano ^{a, b}	1099	1100 [3]	0,29	0,07
23	Linalol ^{a, b}	1102	1099 [3]	-	0,06
24	Isopentanoato de isopentilo ^{a, b}	1106	1104 [3]	-	0,04
25	<i>n</i> -Nonanal ^{a, b}	1107	1100 [3]	0,10	-
26	3-Metilbutirato de pentilo ^{a, b}	1109	1110 [3]	-	0,09
27	<i>allo</i> -Ocimeno ^{a, b}	1130	1131 [3]	-	0,02
28	Alcanfor ^{a, b}	1155	1142 [3]	-	0,02
29	<i>trans</i> -2-Nonenal ^{a, b}	1164	1162 [1]	0,20	0,02
30	Dodeceno ^{a, b}	1192	1190 [3]	0,06	0,02
31	Dodecano ^{a, b}	1199	1200 [1]	0,12	0,03
32	α -Terpineol ^{a, b}	1202	1186 [1]	-	0,03
33	<i>trans</i> -Decen-2-al ^{a, b}	1266	1260 [1]	0,06	-
34	Acetato de bornilo ^{a, b}	1289	1284 [1]	-	0,06
35	<i>trans</i> -Anetol ^{a, b}	1293	1285 [1]	-	0,18

Continuación **Tabla 10.**

36	Safrol ^{a, b}	1297	1286 [2]	-	0,08
37	Acetato de <i>trans</i> -pinocarvilo ^{a, b}	1300	1297 [3]	-	0,03
38	C ₁₅ H ₂₄	1334	-	-	0,48
39	C ₁₅ H ₂₄	1336	-	-	0,44
40	δ-Elemenol ^{a, b}	1340	1337 [2]	-	3,85
41	α-Cubebeno ^{a, b}	1351	1345 [2]	-	0,02
42	C ₁₅ H ₂₄	1363	-	-	0,10
43	α-Copaeno ^{a, b}	1381	1374 [1]	-	0,10
44	β-Bourbobeno ^{a, b}	1391	1384 [1]	-	0,27
45	<i>trans</i> -Tetradec-3-eno ^{a, b}	1391	1384 [1]	0,04	-
46	β-Elemenol ^{a, b}	1395	1389 [1]	-	0,64
47	<i>trans</i> -β-Cariofileno ^{a, b}	1432	1433 [1]	-	2,73
48	γ-Elemenol ^{a, b}	1437	1434 [1]	-	0,05
49	β-Copaeno ^{a, b}	1440	1430 [1]	-	0,05
50	Aromadendreno ^{a, b}	1450	1440 [1]	-	0,14
51	N.I.: 218 (5%), 203 (22%), 175 (18%), 162 (15%), 147 (16%), 136 (45%), 121 (100%), 105 (26%), 93 (68%), 91 (35%), 82 (64%), 77 (22%).	1465	-	-	0,29
52	α-Humuleno ^{a, b}	1467	1453 [1]	-	0,37
53	γ-Muuroleno ^{a, b}	1486	1476 [2]	-	0,54
54	Germacreno D ^{a, b}	1491	1480 [2]	-	1,24
55	δ-Selineno ^{a, b}	1495	1492 [2]	-	0,20
56	β-Selineno ^{a, b}	1499	1486 [3]	-	0,22
57	Biciclogermacreno ^{a, b}	1505	1500 [2]	-	1,09
58	γ-Cadideno ^{a, b}	1519	1513 [3]	-	0,10
59	δ-Cadineno ^{a, b}	1522	1523 [2]	-	0,24
60	Espeatuleno ^{a, b}	1581	1577 [2]	-	0,23
61	Isoespatuleno ^{a, b}	1640	1638 [1]	-	0,04
62	Ylangenal ^{a, b}	1686	1675 [3]	-	0,08

ME-B: Microemulsión base; ME-EPS: Microemulsión con extracto de *P. sartorianum*, obtenido de la planta después de su destilación.

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

^b Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales en la columna DB-5MS ([1] Adams, 2007; [2] Babushok y col., 2011; [3] NIST, 2017).

En la fracción volátil de la microemulsión base se identificaron 14 compuestos en cantidades relativas >0.05%, que representaron el 99,99% del área cromatográfica total. El compuesto

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

mayoritario fue propilenglicol (98,4%); los demás compuestos en la fracción volátil fueron hidrocarburos y aldehídos.

En la fracción volátil de la microemulsión con extracto de *P. sartorianum* se identificaron 53 compuestos en cantidades relativas >0,02%, que representaron 97,4% del área cromatográfica total. El compuesto mayoritario fue, al igual para la microemulsión base, el propilenglicol (70,2%); sin embargo, los compuestos provenientes del AE de *Piper marginatum* estuvieron presentes en esta fracción, *e.g.*, α -pineno, limoneno, δ -elemeno, *trans*- β -cariofileno y otros.

Durante el proceso de extracción con la fibra de SPME, ocurre la concentración de algunos analitos, según su afinidad con el material polimérico que recubre la fibra, y es por esto que algunos compuestos “aparecen” en la fracción volátil de la microemulsión que contiene como aromatizante el AE de *P. marginatum* y que no habían sido detectados en el AE.

4.4 ESTABILIDAD DE LA MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

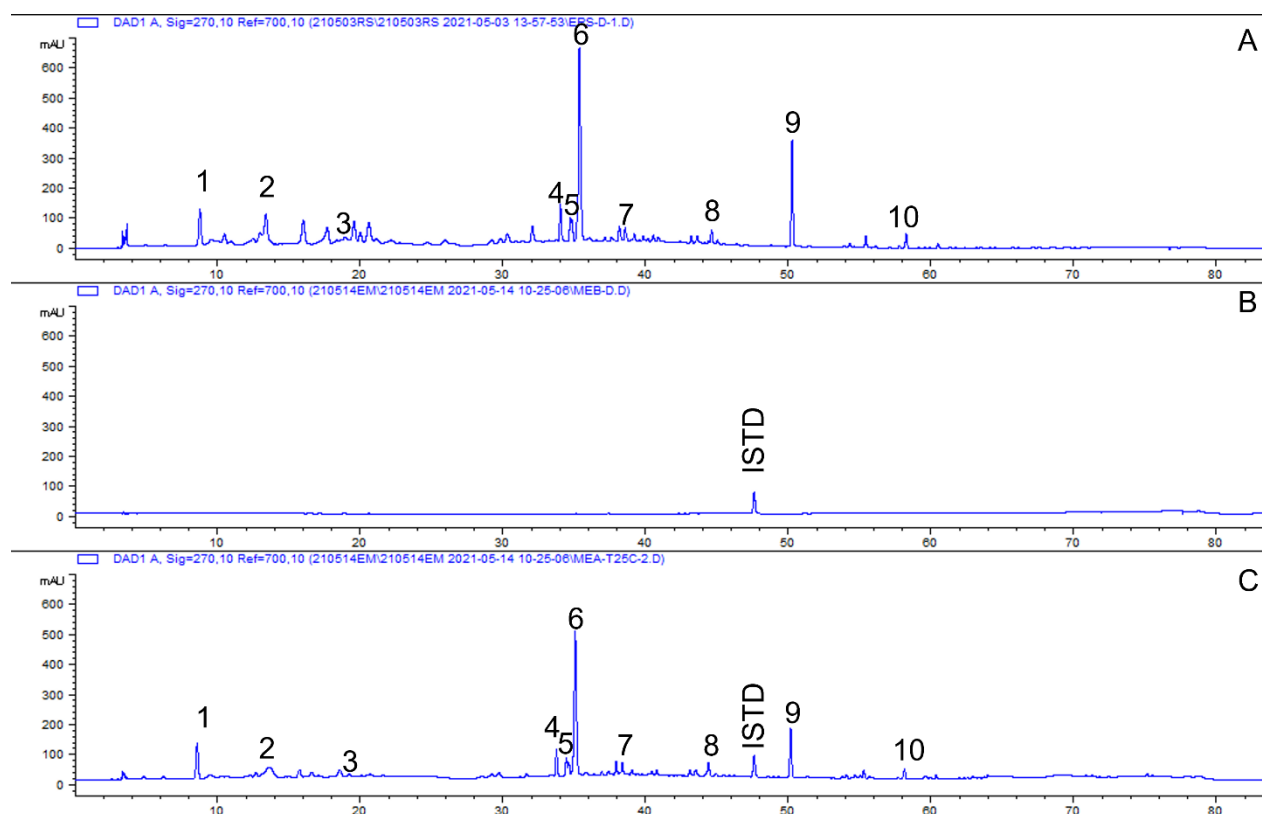
El estudio de estabilidad de las microemulsiones se realizó midiendo sus propiedades físicas y químicas, antes y después de un periodo de 30 días de almacenamiento, bajo diferentes condiciones de temperatura. Para poder medir la estabilidad del componente identificado más abundante en el extracto de *P. sartorianum*, *i.e.*, el ácido elágico, se implementó una metodología que permitiera su análisis cromatográfico por HPLC-DAD a partir de una matriz compleja como lo es la microemulsión.

En experimentos preliminares, se realizó una serie de extracciones líquido-líquido de las microemulsiones, con hexano como solvente, para llevar a cabo un proceso de *clean-up* y eliminar las grasas, previo al análisis cromatográfico. Sin embargo, se observó la formación persistente de una emulsión, difícil de separar, a pesar de que se usaron varias técnicas

convencionales, *i.e.*, ciclos de enfriamiento o calentamiento, centrifugación, filtración (Mitra, 2003). Es por esto, que se decidió ensayar con la técnica de MSPD, para la extracción de los compuestos fenólicos de las microemulsiones. En literatura científica no se encontraron reportes en los que se empleara MSPD para la extracción de compuestos fenólicos en este tipo de matrices, por lo que fue necesario realizar un diseño experimental para encontrar las mejores condiciones de extracción del ácido elágico.

En el **Figura 32** se muestran los cromatogramas obtenidos por HPLC-DAD de: **(A)** el extracto de *P. sartorianum*; **(B)** de los extractos MSPD de la microemulsión base y **(C)** de la microemulsión con extracto de *P. sartorianum*. Se observó que los perfiles cromatográficos del extracto de *P. sartorianum* y del extracto MSPD fueron similares, *i.e.*, se mantuvieron las señales de los diez picos cromatográficos. Según el análisis realizado, el extracto de la microemulsión base no aportó compuestos que absorbieran en la longitud de onda seleccionada ($\lambda=270$ nm).

Figura 32. Perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC-DAD de: **A.** El extracto de *Psidium sartorianum* y los extractos obtenidos por MSPD de **B.** La microemulsión base y **C.** La microemulsión con extracto de *P. sartorianum* incorporado. ISTD= Naringenina (20 mg/L). Véase la identificación de los picos cromatográficos en la **Tabla 8**.



Los resultados del diseño experimental se analizaron por medio de ANOVA y se muestran en la **Tabla 11**. Las variables **A** (relación de microemulsión: soporte sólido) y **B** (relación homogeneizado: cantidad de solvente de elución) presentaron efecto significativo sobre el observable (área cromatográfica del ácido elágico); sin embargo, el efecto de **A** fue mayor que el de **B**. La interacción entre las variables también fue significativa puesto que el valor de **F** fue mayor que el valor crítico de **F**.

Tabla 11. *Análisis de la varianza (ANOVA) para el experimento de extracción del ácido elágico.*

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
B	6405,8	2	3202,9	53,3	1,024E-05	4,3
A	559,1	2	279,6	4,7	4,096E-02	4,3
Interacción	1844,1	4	461,0	7,7	5,635E-03	3,6
Dentro del grupo	540,7	9	60,1			
Total	9349,7	17				

Se realizó una prueba de múltiples rangos por medio del procedimiento de diferencia honestamente significativa de Tukey (HSD, por sus siglas en inglés) y los resultados se muestran en las **Tablas 12 y 13**. Se estableció, con un 95% de confianza, que los niveles 0 y 1 de la variable **A** mostraron diferencias estadísticamente significativa, mientras que, entre los niveles (-1 y 0) y (-1 y 1) no la hubo. Los valores de las medias más altos se obtuvieron para los niveles -1 y 0, pero como entre estas no hubo diferencia significativa, se decidió escoger el primero para la metodología de extracción del ácido elágico, porque fue el nivel en que menor cantidad de soporte sólido se empleó.

Para la variable **B** se encontró que hay diferencias estadísticamente significativas para los niveles (-1 y 0) y (1 y -1), mientras que no la hubo para los niveles 1 y 0. Las medias más altas se obtuvieron para los niveles 1 y 0, pero como entre estas no hubo diferencias significativas, se escogió el segundo como el mejor nivel para esta variable, debido a que fue en la que menor volumen de metanol se empleó.

Tabla 12. Prueba de múltiples rangos para la variable **A** (relación microemulsión: soporte sólido). Método: 95% Tukey (HSD).

A	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos homogéneos
1	6	141,752	3,16424	X
-1	6	151,882	3,16424	XX
0	6	154,742	3,16424	X

Contraste	Significativo	Diferencia	+/- Límites
-1 – 0	No	-2,86013	12,4926
-1 – 1	No	10,1302	12,4926
0 – 1	Sí	12,9904	12,4926

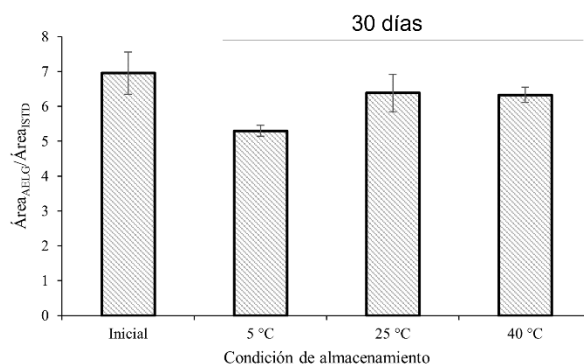
Tabla 13. Prueba de múltiples rangos para la variable **B** (relación cantidad de homogeneizado: volumen de metanol) Método: 95% Tukey (HSD).

B	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos homogéneos
-1	6	123,309	3,16424	X
1	6	157,958	3,16424	X
0	6	167,11	3,16424	X

Contraste	Significativo	Diferencia	+/- Límites
-1 – 0	Sí	-43,8014	12,4926
-1 – 1	Sí	-34,6495	12,4926
0 – 1	No	9,15189	12,4926

Teniendo en cuenta estos resultados, las extracciones MSPD se realizaron con las siguientes cantidades: microemulsión (0,5 g), sílice modificada con C₁₈ (1 g) y metanol (6 mL). Los resultados de la estabilidad del ácido elágico en la microemulsión, bajo las diferentes condiciones de almacenamiento, se muestran en la **Figura 33**. Los resultados se expresaron como la relación del área cromatográfica del ácido elágico (AELG) con respecto al área cromatográfica del estándar interno (ISTD: naringenina).

Figura 33. El ácido elágico presente en la microemulsión con extracto de *P. sartorianum* incorporado, bajo las diferentes condiciones de almacenamiento. AELG= ácido elágico; ISTD= naringenina (20 mg/L).



Las microemulsiones almacenadas durante 30 días a 25 y 40 °C no presentaron cantidades de ácido elágico menores que la de la microemulsión inicial ($p < 0,05$), mientras que la microemulsión almacenada a 5 °C tuvo diferencia significativa, según la prueba de “t” de Student.

Los valores pH, viscosidad, conductividad y actividad antioxidante obtenidos para la microemulsión base y la microemulsión con extracto de *P. sartorianum* bajo las diferentes condiciones de almacenamiento, se muestran en la **Tabla 14**. Para establecer cuál de las condiciones de almacenamiento influyó sobre la estabilidad de cada parámetro evaluado en la microemulsión, se realizó una prueba de múltiples rangos de Tukey (HSD) cuyos resultados se muestran en la **Figura 34**.

Se observó, que el pH de la microemulsión con extracto de *P. sartorianum*, obtenido de la planta después de su destilación, fue inferior al de la microemulsión base. Parte de esta disminución de pH se debió probablemente al aporte de H^+ de los ácidos gálico y elágico provenientes del extracto de *P. sarturianum*. La variación del pH de la microemulsión con extracto de *P.*

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

sartorianum, bajo las diferentes condiciones de almacenamiento, no fue estadísticamente significativa ($p<0.05$).

Figura 34. Prueba de múltiples rangos (Tukey, HSD) para la evaluación de estabilidad de los siguientes parámetros: **A.** pH; **B.** Viscosidad; **C.** Conductividad y **D.** Actividad antioxidante ($p<0,05$).

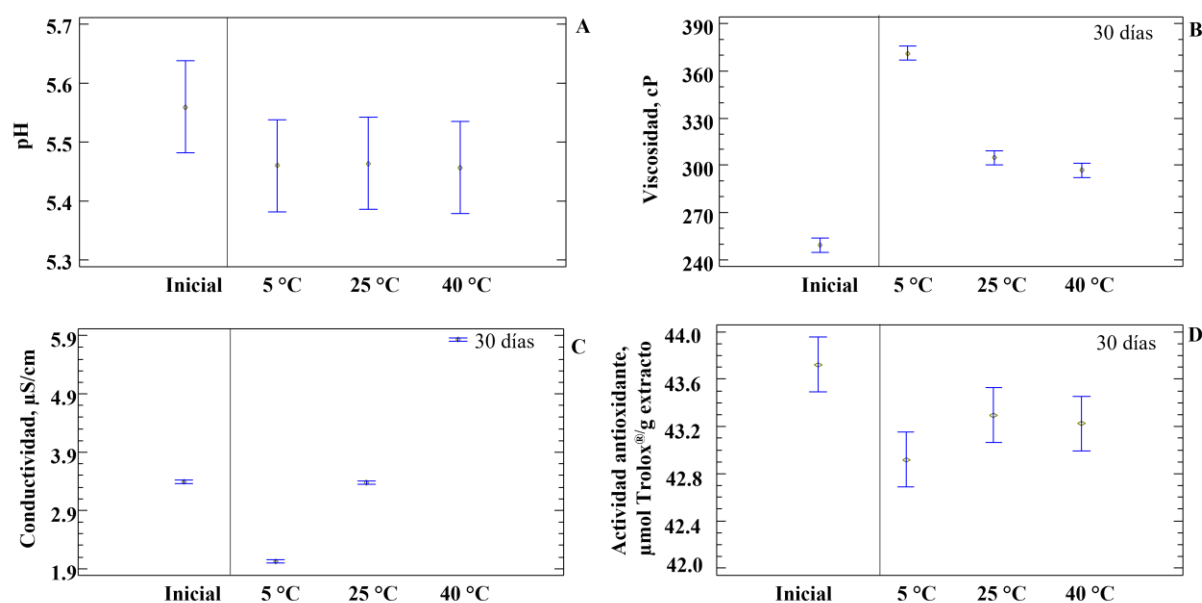


Tabla 14. Evaluación de pH, viscosidad, conductividad y actividad antioxidante de la microemulsión con extracto de *P. sarturianum*, almacenada bajo diferentes condiciones ($\bar{X} \pm s$, $n=3$).

Microemulsión	Condición de almacenamiento	Ph	Viscosidad, cP	Conductividad, $\mu\text{S/cm}$	Actividad antioxidante, $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g extracto
Base	Inicial	$6,52 \pm 0,084$	$302 \pm 2,1$	$1,05 \pm 0,018$	$0,064 \pm 0,005$
Con extracto de <i>P. sartorianum</i>	Inicial	$5,6 \pm 0,11^a$	$253 \pm 4,8^a$	$3,4 \pm 0,024^a$	$43,7 \pm 0,14^a$
	5 °C, 30 días	$5,46 \pm 0,036^a$	$371 \pm 1,5^c$	$2,019 \pm 0,0051^b$	$42,9 \pm 0,24^b$
	25 °C, 30 días	$5,46 \pm 0,021^a$	$305 \pm 2,8^b$	$3,38 \pm 0,011^a$	$43,3 \pm 0,12^{ab}$
	40 °C, 30 días	$5,45 \pm 0,015^a$	$297 \pm 4,2^b$	$5,83 \pm 0,035^c$	$43,2 \pm 0,19^b$

^{a-c} Los promedios para los diferentes parámetros evaluados con diferente letra en la misma columna poseen una diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$).

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

La microemulsión desarrollada presentó una viscosidad baja, lo cual es característico de las microemulsiones (Kreilgaard, 2002). Los valores de viscosidad estuvieron en un rango de 253-371 cP. La viscosidad de la microemulsión con extracto de *P. sartorianum* disminuyó significativamente ($p<0.05$) con respecto a la de la microemulsión base. Se observó que las tres condiciones de almacenamiento afectaron significativamente la viscosidad de la microemulsión ($p<0.05$), con respecto a la viscosidad inicial. El tiempo de almacenamiento influyó sobre la viscosidad de la microemulsión, debido a que todos los valores obtenidos fueron mayores que el valor inicial, y el más alto correspondió a la microemulsión almacenada a 5 °C.

La conductividad de la microemulsión con extracto de *P. sartorianum* presentó un orden de magnitud cercano al del agua Tipo 1. La conductividad de la microemulsión con extracto fue tres veces mayor que de la microemulsión base, debió a la incorporación del extracto. La conductividad varió entre 2 y 5,8 $\mu\text{S}/\text{cm}$. No hubo diferencia significativa entre los valores de la conductividad inicial de la microemulsión y la que se almacenó por 30 días a 25 °C.

Se observó que la microemulsión base no tuvo ninguna actividad antioxidante, mientras que la microemulsión con extracto de *P. sartorianum*, sí. La actividad antioxidante de la microemulsión almacenada durante 30 días a 25 °C no tuvo variación significativa con respecto a la medida en la recién preparada. Sin embargo, al almacenarla a 5 y 40 °C la actividad antioxidante disminuyó, aunque fue menor del 3%. Posiblemente, la baja temperatura permitió un empaquetamiento mayor de las microemulsiones, cambio en las fuerzas involucradas en la interfaz de las micelas O/W y la desestabilización de la microemulsión por floculación.

5. DISCUSIÓN

Las plantas aromáticas han sido empleadas desde antaño por sus propiedades preventivas y medicinales, también para mejorar los aromas y sabores de las comidas (Christaki y col. 2012). Colombia posee una biodiversidad alta en plantas, sin embargo, gran parte de las especies vegetales nativas continúan aún sin estudiar (Stashenko y Martínez, 2019). Estudios preliminares realizados en el Centro de Investigaciones CENIVAM, encontraron que las especies aromáticas *Calycolpus moritzianus*, *Cordia curassavica*, *Piper marginatum*, *Psidium sartorianum*, *Wedelia calycina*, que crecen en el Santander, son de interés para los sectores salud, agropecuario y cosmético, por la bioactividad de sus metabolitos secundarios. En esta investigación, se obtuvieron los AE de estas plantas por destilación asistida por la radiación de microondas y los extractos, usando solventes y la energía de ultrasonido.

Los AE y extractos de las plantas aromáticas han mostrado diferentes tipos de actividades biológicas, entre ellas, antimicrobiana, antifúngica, antimalárica, insecticida, citotóxicas, antioxidante y otras (Dhifi y col., 2016), varias propiedades biológicas de los AE fueron estudiadas por los diversos grupos colaboradores del Centro de Investigación Cenivam (Stashenko y Martínez, 2018). La actividad antioxidante o llamada también capacidad antioxidante describe la propiedad de una sustancia o mezcla de sustancias de prevenir o detener reacciones de oxidación que ocurren en otras moléculas (Sun y col., 2018). En el presente trabajo de investigación, la actividad antioxidante fue estudiada por dos metodologías que involucran diferentes mecanismos de acción. Para ABTS⁺, el mecanismo revela si las muestras evaluadas tienen la capacidad de ceder un electrón a una especie radicalaria; mientras que, el ensayo de decoloración de β -caroteno muestra si la muestra evaluada es capaz de donar un protón a los

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

radicales peroxilo generados por la degradación térmica del ácido linoleico, de esta manera, evitando la degradación del β -caroteno.

El extracto de *P. sarturianum* presentó una actividad antioxidante superior a los demás extractos y AE evaluados, sin embargo, su actividad fue más baja que la de los antioxidantes de referencia BHT y α -tocoferol. En algunos trabajos consultados (Sun y Ho, 2005; Duan y col., 2006; Topçu y col., 2007; Cao y col., 2009; Chen y col., 2012; Khalfallah y col., 2017) se encontró que las sustancias principales de comparación fueron el BHT y BHA; solo en el estudio Topçu y col. (2007), se comparó la actividad antioxidante de un extracto con la de los flavonoides quercetina y catequina.

En esta investigación, se comparó la actividad antioxidante, usando el ensayo de β -caroteno, del extracto de *P. sartorianum* con la de los flavonoides (apigenina, hidrokaemferol, epicatequina galato, erioditiol, kaemferol, luteolina, luteloina-7-O-glucósido, naringenina, pinocembrina, quercetina y quercetina-3-O-glucósido), ácidos fenólicos (ácidos cafeico, clorogénico, elágico, gálico, *p*-hidroxibenzoico y rosmarínico) y el ácido *trans*-cinámico, todos evaluados a la misma concentración (1 g/L). Los resultados mostraron que la actividad de *P. sarturianum* fue similar a quercetina, epicatequina galato, kaemferol y erioditiol, y a la de los ácidos gálico, cafeico y rosmarínico. Las características estructurales que más influyeron sobre la actividad antioxidante de los flavonoides evaluados fueron la presencia de un grupo hidroxilo en la posición C-3 del anillo C, en conjunto con un enlace doble C2-C3, y la presencia de un grupo catecol en anillo B. Estos resultados coinciden con los encontrados por Burda y Oleszek (2001), quienes evaluaron la actividad antioxidante de algunos flavonoides por el método de β -caroteno. Para los ácidos fenólicos, que no fueron evaluados por Burda y Oleszek, se observó que aquellos ácidos, con actividad antioxidante relativamente alta, tenían un grupo catecol en su estructura.

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

El AE de *P. marginatum* se obtuvo con un rendimiento menor que el reportado por Dutra y col. (2020). En nuestro estudio, el tiempo de destilación fue de una hora, mientras que Dutra y col. destilaron la planta durante tres horas. En cuanto a la composición química, un estudio realizado por Jaramillo-Colorado y col. (2015) en Colombia, describe la existencia de dos quimiotipos de esta planta, encontrados en los departamentos de Chocó y Bolívar. Las plantas recolectadas en el departamento del Chocó presentaron un AE rico en “*cis*-anetol” (46,3%), mientras que, el AE destilado de las plantas recolectadas en el departamento de Bolívar fue rico en germacreno D (36,6%).

El mayor número de investigaciones sobre la composición química del AE de *P. marginatum* se ha realizado en Brasil (de Souza y col., 2020; Dutra y col. 2020; Macêdo y col., 2020; Ribeiro y col., 2016); estos AE se caracterizaron por un contenido alto de fenilpropanoides como kakuol, sarisano, miristicina, *cis-p*-azarona, 2-metoxi-4,5-metilendioxil-propiofenona y exalatacina (Véase **Tabla 15**), en comparación con el AE estudiado en este trabajo de investigación. El AE *P. marginatum*, recolectado en Santander, contiene pocos compuestos oxigenados, *e.g.*, monoterpenoides, sesquiterpenoides o fenilpropanoides; los únicos fenilpropanoides detectados fueron safrol, *trans*-anetol y elimicina, en cantidades menores de 1%. Macêdo y col. (2020) mostraron que la composición química de *P. marginatum* varía, según el lugar de colecta de la planta. En lugares cálidos y secos, prevalecían plantas con los AE, ricos en hidrocarburos monoterpénicos, mientras que, en lugares húmedos, en los AE se encontró una cantidad más alta de compuestos oxigenados.

Tabla 15. Comparación de los compuestos principales en el AE de *P. marginatum* caracterizado en el presente estudio con los reportados en literatura científica.

Compuesto	Cantidad relativa, %					
	A	B	C	D	E	Estudio actual
α -Pineno	-	8,4	2,6	-	2,2	11,9
β -Pineno	-	6,5	1,8	-	2,2	9,7
α -Felandreno	-	6,9	-	-	-	7,3
Δ^3 -Careno	-	0,5	10,2	-	-	-
Limoneno	-	4,9	0,8	-	0,2	11,2
Kakuol	13	-	-	-	-	-
<i>trans</i> - β -Cariofileno	5,8	5,7	9,7	16	16	5,0
Biciclogermacreno	-	0,2	3,8	-	23	3,4
Miristicina	12,8	-	2,0	-	-	-
Sarisano	12,4	-	-	-	-	-
Metilenodioxil-3,4-propiofenona	-	-	23	-	-	-
Espatulenol	-	0,1	6,9	-	5,1	0,6
2-Metoxi-4,5-metilenodioxil-propiofenona	-	-	-	-	12	-
<i>cis</i> -Azarona	-	2,5	-	30	1,2	-
Exalatacina	-	9	-	-	1,0	-
Patchoulol	-	-	-	7,6	-	-

A: de Souza y col. (2020); **B:** Dutra y col. (2020), **C:** Macêdo y col. (2020); **D:** Ribeiro y col. (2016); **E:** Saavedra (2015).

El contenido alto de hidrocarburos monoterpénicos (51%) y sesquiterpénicos (21%) en el AE de *P. marginatum* influyó sobre su actividad antioxidante medida por los ensayos de ABTS⁺ y de β -caroteno. En el estudio realizado por Ruberto y Baratta (2000) se evaluó la actividad antioxidante, mediante el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, de diferentes tipos de compuestos encontrados comúnmente en los AE, entre estos, los terpenos mayoritarios identificados en *P. marginatum*, α - pineno, limoneno y β -pineno. La actividad antioxidante de estos terpenos fue baja (12.6-27.6%), comparada con la de monoterpenos y sesquiterpenos oxigenados.

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

Wojtunik y col. (2018) evaluaron también la actividad antioxidante de diferentes tipos de terpenos por el método colorimétrico de ABTS^{•+} y encontraron que α -pineno posee baja actividad antioxidante, debido a la ausencia de enlaces dobles conjugados en su estructura. Terpenos como α -terpineno, citral, *trans*- β -ocimeno, pulegona y β -mirceno poseen en sus estructuras enlaces dobles conjugados, y por tanto, poseen una actividad antioxidante más alta que el α -pineno.

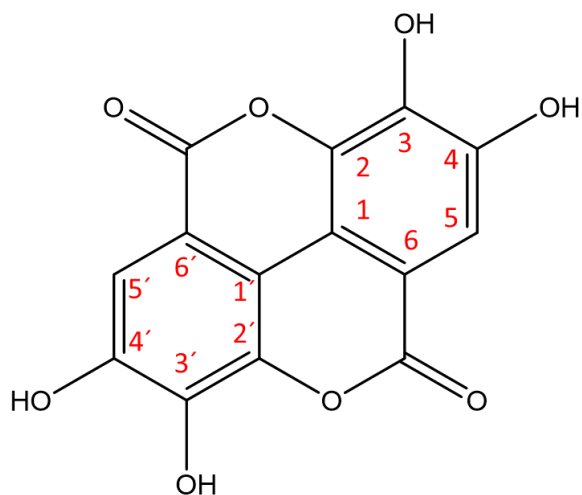
Los extractos obtenidos de las plantas aromáticas son mezclas multicomponente y representan un desafío para su análisis debido a la gran diversidad de estructuras químicas presentes, por lo que su estudio no es trivial (Wolfender y col., 2015). En esta investigación, se emplearon diferentes estrategias para estudiar la composición del extracto seleccionado, con un énfasis en aquellas estructuras que pudieran aportar a la actividad antioxidante. Las moléculas no volátiles fueron estudiadas por UHPLC-ESI-HRMS, tanto en modo de adquisición de iones positivos como negativos, y por HPLC-DAD; para las moléculas volátiles o volatilizables se usó GC/MS.

El análisis por ESI⁺-HRMS permite identificar en los extractos moléculas con la capacidad de formar cationes como es el caso de los flavonoides (Cuyckens y Claeys, 2004). En esta investigación, se reportaron por primera vez los flavonoides que están presentes en el extracto de *P. sartorianum*. En total, fueron 17 los compuestos identificados, en su mayoría glúcidos de miricetina. La miricetina, un flavonoide ampliamente estudiado, presente en frutas y vegetales, exhibe diversas propiedades farmacológicas, que incluyen antiinflamatoria, anticarcinogénica, antiangiogénica y anticancerígena (Miao y col., 2021); sin embargo, su presencia como aglicona no fue detectada en el extracto de *P. sarturianum*. Los glúcidos miricetina-3-*O*-galactósido y miricetina-3-*O*-ramnósido poseen una actividad antioxidante alta, medida por los métodos de xantina oxidasa, peroxidación lipídica y el método antirradicalario DPPH (Hayder y col., 2008);

además, estas sustancias han sido capaces de modular los patrones de expresión de genes celulares implicados en el estrés oxidativo, en la reparación del daño del ADN y en la apoptosis.

El análisis por HPLC-DAD reveló la presencia del ácido elágico (Véase **Figura 35**) en el extracto de *Psidium sartoriamun*, cuya identificación fue confirmada por ESI-HRMS. El ácido elágico se encuentra en una variedad de especies vegetales, especialmente, en frutos, *e.g.*, frambuesas, fresas, uvas, granadas, mango, guayaba, nueces, almendras y té verde (García-Niño y Zazueta, 2015). Se encuentra principalmente en forma de taninos hidrolizables denominados como elagitaninos, que son parte de los componentes estructurales de la pared y membrana celular (Vattem y Shetty, 2005). El ácido elágico es un dímero del ácido gálico, se encuentra en las vacuolas de las plantas, tanto en su forma libre como enlazado. Un gran número de derivados de ácido elágico son productos de su metilación, glucolisación y metoxilación. La actividad antioxidante de los diferentes derivados del ácido elágico disminuye con el grado de hidroxilación (Landete, 2011).

Figura 35. Estructura del ácido elágico.



MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

Diferentes estudios de revisión (García-Niño y Zazueta, 2015; Landete, 2011) han mostrado la gran variedad de actividades biológicas del ácido elágico, entre estas, antioxidante en ensayos *in vitro* (Zafrilla y col., 2001), estrogénica vía receptor estrogénico- α de células HELA, antiestrogénica en células derivadas del cáncer de mama MCF-7 (Papoutsis, y col., 2005), anti-inflamatoria por regulación negativa de INOS, COX-2, TNF- α y IL-6 en ratas (Umesalma y Sudhandiran, 2010), antimicrobiana (dosis-dependiente) contra *Helicobacter pylori* (Chung, 1998). También, en ensayos enzimáticos se ha comprobado la actividad neuroprotectora (Kwak y col., 2005) y en ensayos con ratones, las siguientes actividades: anti-apoptótica (Türk y col., 2010), antialérgica (Choi y col. 2009), antidepresiva (Dhingra y Chhillar, 2012), antiansiedad (Girish y col., 2013), nefroprotectora (El-Garhy y col., 2014), cardioprotectora (Kannan y Quine, 2013), hepatoprotectora (Lee y col. 2014), antidiabética R (Malini, y col., 2011) y antimalárica (*in vitro* e *in vivo*) (Fotie, 2010; Soh y col. 2009).

Según las mediciones realizadas (Véase **Sección 4.1.3.**), el ácido elágico a una concentración de 1 g/L, inhibió la oxidación del β -caroteno en un 64%. El estudio computacional de Zheng y col. (2020), mostró que la actividad antioxidante del ácido elágico se explica, principalmente, a través de un mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno (HAT, por sus siglas en inglés), en la mayoría de las matrices estudiadas, sin embargo, los autores mostraron que en aquellos más polares dominaba el mecanismo de pérdida secuencial de protón y la transferencia de electrón (SPLET, por sus siglas en inglés). Con base en las energías de enlace asociadas a cada uno de los grupos hidroxilo en el ácido elágico, se ha propuesto que por un mecanismo HAT, el ácido elágico pierde su primer átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo enlazado al carbono C3, secuencialmente, el radical formado pierde un átomo de hidrógeno del hidroxilo enlazado al carbono C4 y la estructura se estabiliza, formando una quinona. Estos mismos pasos ocurren

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

posteriormente sobre los carbonos C3' y C4', dando lugar, finalmente, a la formación de una diquinona. Por el mecanismo SPLET, se presume que se realiza una pérdida secuencial de protones de los grupos hidroxilo en el siguiente orden C3, C3', C4 y C4', lo que da lugar a la formación de un tetra-anión. El tetra-anión formado puede transferir secuencialmente cuatro electrones al medio, formando finalmente la diquinona (Zheng y col., 2020).

Según la base de datos de patentes *Espacenet* (<https://worldwide.espacenet.com>), hay 10.131 documentos que mencionan el ácido elágico (ecuación de búsqueda: “*ellagic acid*”, periodo:1872-2021, fecha de consulta 6 de junio de 2021). Las patentes encontradas más frecuentemente aparecen en las áreas de productos cosméticos y preparaciones de tocador (4.328 patentes), preparaciones para el cuidado de la piel (3.366) y preparaciones médicas que contienen ingredientes orgánicos activos (2.713). Los principales solicitantes de patentes han sido las compañías *L'Oréal* (351), *Ichimaru Pharcos* (261) y *Lion Corp.* (171). Los tres países con número de patentes más alto han sido los Estados Unidos (5.798), Japón (5.565) y China (4.440). Al enfocar la búsqueda en aquellas patentes en las que se empleó el ácido elágico en una microemulsión, se encontraron 347 patentes. Un ejemplo de éstas es la patente presentada por Wang y Zheng (2018), quienes elaboraron una microemulsión con oleato de etilo (10-20%), Tween[®] 80 (50-80%), PEG 400 (20-30%) y el ácido elágico, como principio activo, en concentraciones entre 0,3 y 0,5%. Los autores resaltaron el bajo costo de producción, la facilidad de preparación, el aumento de la solubilidad y biodisponibilidad del ácido elágico.

Las microemulsiones son sistemas termodinámicamente estables que permiten el encapsulamiento de AE, extractos, vitaminas, ácidos grasos y moléculas bioactivas como licopeno, fitoesteroles, péptidos, polifenoles y otras (Márquez-Fernández, 2009). Según la base de datos de *Scopus (Elsevier)*, en Colombia, se han publicado solo 25 artículos relacionados con

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

las microemulsiones {ecuación de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY (microemulsion) AND [LIMIT-TO (AFFILCOUNTRY, "Colombia")]*, periodo: 1990-2021, fecha de consulta 6 de junio de 2021}, sin embargo, ninguno de estos estudios tuvo relación con productos naturales a partir de la biodiversidad colombiana, por lo que este estudio es pionero en este campo.

La microemulsión desarrollada en el presente trabajo de investigación, que incorporó el extracto de *P. sartorianum*, presentó un pH que estuvo dentro del rango de pH de la piel (5,2 - 5,9) (Schmid-Wendtner y Korting, 2006). Valores de pH por fuera de este rango podrían afectar de manera negativa la microbiota de la piel (Korting y col., 1990), lo que podría influir en la aparición de enfermedades dermatológicas (Patiño y Morales, 2013). La microemulsión desarrollada presentó baja viscosidad ($253 \pm 4,8$ cP), que estuvo dentro del rango de viscosidades reportado por Moghimipour y col. (2013) (253,73-802,63 cP). La conductividad de la microemulsión del tipo O/W fue baja (3,4 μ S/cm) comparada con la desarrollada por Yahaya y col. (2021) (55,9 μ S/cm); lo cual se puede explicar por el contenido alto del propilenglicol presente en la microemulsión preparada en este trabajo y ausente en la de Yahaya. La microemulsión antioxidante fue estable a los 30 días de almacenamiento a 25 °C, según los parámetros evaluados, excepto la viscosidad, que incrementó en un 20 % . La microemulsión almacenada a las temperaturas de 5 y 40 °C, presentó inestabilidad en los siguientes parámetros: viscosidad, conductividad y actividad antioxidante. Posiblemente, la temperatura baja generó un empaquetamiento mejor de las gotas que conformaban la fase oleosa, lo que generó un cambio de las fuerzas involucradas en la interfaz de las micelas O/W, y la desestabilización de la microemulsión por floculación (Butt y col., 2013). Aunque el almacenamiento prolongado de la microemulsión antioxidante a temperatura alta, no alteró significativamente la cantidad del ácido

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

elágico, sí pudo haber afectado la estabilidad de los demás componentes, tanto del extracto como de aquellos que conforman la microemulsión.

La actividad antioxidante del extracto de *P. sartorianum* se debe, principalmente, al ácido elágico ($400 \pm 25,7$ mg/g de extracto), el componente mayoritario presente en el extracto. El análisis instrumental por técnicas cromatográficas y de espectrometría de masas mostró la presencia de otros componentes como flavonoles, flavanoles, flavanonas y sesquiterpenoles, que según literatura científica (Cos y col., 2004; Kumar y col., 2021; Yashima y col., 2021; Zhao y col. 2021; Gupta y col., 2008; Jin-Ting, 2010), podrían también aportar a la actividad antioxidante del extracto. En la **Tabla 16**, se presentan algunos de estos compuestos identificados y sus actividades biológicas reportadas en literatura; para el caso de aquellos glúcidos a los que no fue posible identificar el azúcar que contenían, se dio un ejemplo.

Tabla 16. *Revisión de literatura científica sobre las actividades biológicas de los compuestos identificados en el extracto hidroalcohólico de Psidium sartorianum, después de la destilación de la planta.*

Compuesto	N° CAS	Actividad biológica	Referencias
Proantocianidinas			
Galocatequin-(4 α -8)-galocatecol	68964-95-4	Antioxidante , antibacterial, antifúngico y antiprotozoario.	Cos y col., 2004
Galocatequin-(4 α -8)-catequina	79127-37-0	Antioxidante , antibacterial, antifúngico y antiprotozoario.	
Flavanoles			
Galocatequina	970-73-0	Antioxidante y anticancerígeno.	Kumar y col., 2021
Catequina	7295-85-4	Antioxidante , anticancerígeno, antibacterial y antialérgico.	Yashima y col., 2021

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

Continuación **Tabla 16.**

Epigallocatequina galato	989-51-5	Antioxidante , anticancerígeno, antileishmaniasis, antiviral, antibacterial, antifúngico, antiproliferativo, antiapoptótico.	Zhao y col. 2021; Sosa y col., 2020; Bartosikova y Necas, 2018
Epicatequina galato	1257-08-5	Antioxidante y antibacterial.	Gupta y col., 2008
Flavonoles			
Hibiscetina	577-24-2	Antioxidante.	Jin-ting, 2010
Hibiscetina-O-metilpentósido	-	No hay reportes	
Miricetina	529-44-2	Antinflamatorio, anticancerígena, anticarcinogénico y antiangiogénico.	Miao y col., 2021
Miricetina-3-O-arabinósido	132679-85-7	No hay reportes	-
Miricetina-3-O-galactósido	15648-86-9	Antioxidante y antigenotóxico.	Hayder y col. 2008
Miricetina-3-O-ramnósido	17912-87-7	Antioxidante y antigenotóxico.	
Guajavarina	22255-13-6	Antibacterial.	Prabu y col., 2006
Quercitrina	522-12-3	Antioxidante y antiviral.	Chioy y col., 2016; Uppugundla y col. 2009
Flavanonas			
Pinocembrina	68745-38-0	Antioxidante , antiinflamatorio, neuroprotector, antitumoral y antimicrobiano	Sayre y col. 2012
Pinostrobin	480-37-5	Antioxidante , antiinflamatorio, gastroprotector, antiviral, antifúngico, anticancerígeno y antinociceptivo.	Patel y col. (2016)
Pinocembrina-7-O-glucósido	75829-43-5	Antifúngico	Chen y col., 2020
Ácidos			
Ácido elágico	476-66-4	Antioxidante , estrogénico (en células HELA), antiestrogénico (células de mama MCF-7), antimicrobiano, antiviral, antiapoptótico, anti-alérgico y antidepresivo.	Landate, 2011; García-Niño y Zazueta, 2015

Continuación **Tabla 16.**

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

Ácido gálico	149-91-7	Antioxidante , antibacterial, antifúngico, antiviral, antiinflamatorio, anticancerígeno y antidiabético.	Kumar y col., 2021
Sesquiterpenoles			
β-Eudesmol	473-15-4	Antiangiogénico y antimutagénico.	Tsuneki y col., 2005; Miyazawa y col., 1996
Clovanediol	2649-64-1	No hay reportes.	-

Entre los AE seleccionados inicialmente en esta investigación, el de *P. marginatum* presentó, desde la percepción del autor, el mejor aroma, por sus notas frescas y cítricas, atribuidas al limoneno (Janicot, J., 2018), que fue el segundo componente más abundante en este AE. La incorporación del AE de *P. marginatum* logró enmascarar el olor a grasa de la microemulsión, lo que fue evidenciado por la presencia de sus en la fracción volátil, aislada por HS-SPME. En otras investigaciones (Li y col., 2019; Laothaweerungsawat y col. 2020), los AE sí ha sido empleados como ingredientes activos en microemulsiones, por ejemplo, Li y col. (2019) incorporaron el AE de citronela en una microemulsión y mejoraron sus propiedades antioxidantes. Las microemulsiones permiten que los AE tengan una dispersabilidad en agua mayor, una volatilidad y una oxidación menores (Pavoni y col., 2020).

La técnica MSPD figura actualmente entre los procedimientos analíticos que permiten superar las desventajas de los métodos de extracción tradicionales como (1) el uso de solventes y disposición de sus residuos; (2) procedimientos extra como la filtración; (3) ser laboriosos y (4) requerir de mayor tiempo en la marcha analítica (Wianowska y Gil, 2019). La técnica MSPD se ha aplicado a las matrices cosméticas como cremas, pasta para dientes (Tahmasebi y col. 2012), champú, jabón líquido, jabón de manos, maquillaje y otros (Sánchez-Prado y col. 2011), para la extracción de parabenos y otros preservantes (Liu y col., 2020). Sin embargo, no se encontraron

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

reportes sobre su uso para extraer flavonoides o ácidos fenólicos de plantas en matrices cosméticas. Por lo que la presente investigación es pionera en este campo, sin embargo, se requiere establecer, en futuras investigaciones, las respectivas figuras de mérito para esta metodología.

6. CONCLUSIONES

La actividad antioxidante de los AE y extractos, obtenidos por métodos destilativos y extractivos a partir de material vegetal de especies que crecen en el departamento de Santander (Colombia) se evaluó usando los métodos coloriméticos ABTS⁺ y β -caroteno. El extracto hidroalcohólico de la planta *Psidium sartorianum*, después de su destilación, mostró la actividad antioxidante más alta comparada con la de los demás extractos, AE o mezclas. La actividad antioxidante del extracto de *P. sartorianum* fue comparable con los compuestos individuales de origen natural como quercetina, keamferol, erioditiol, ácido gálico y rosmarinico, pero inferior a la de los antioxidantes sintéticos de referencia, BHT y α -tocoferol.

El análisis instrumental por GC/MS, HPLC-DAD y UHPLC-ESI^(+/-)-Orbitrap-HRMS permitió identificar los componentes del AE y del extracto incorporados a una microemulsión. En el extracto de *P. sartorianum*, empleado como ingrediente activo, se identificaron, por primera vez, dos proantocianidinas, cuatro flavanoles, ocho flavonoles, cuatro flavanonas, dos ácidos fenólicos, dos sesquiterpenoles y algunos hidrocarburos, aldehídos y cetonas de cadena media; el ácido elágico fue el compuesto más abundante ($400 \pm 25,7$ mg/g). En el AE de *Piper marginatum*, que fue incorporado como aromatizante, se identificaron 35 compuestos, entre ellos, el α -pineno (130 ± 15 mg/g) y el limoneno (130 ± 20 mg/g) fueron los compuestos mayoritarios; los hidrocarburos monoterpénicos (51%) representaron la familia de compuestos más abundante.

Se obtuvo una microemulsión con actividad antioxidante compuesta por agua, propilenglicol, Tween[®] 80, aceite de aguacate, extracto de *P. sartorianum* (ingrediente activo) y aceite esencial de *Piper marginatum* (aromatizante). La microemulsión desarrollada clasificó como O/W y Winsor IV y presentó baja acidez (pH= 5,6), baja viscosidad (253 cP), baja conductividad (3,4

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

$\mu\text{S/cm}$). El estudio de su estabilidad mostró que los parámetros pH, conductividad, contenido de ácido elágico, y la actividad antioxidante evaluados, no variaron significativamente después de que la microemulsión fue almacenada por 30 días a 25 °C. Estas características la distinguen como buena candidata en diferentes preparaciones cosméticas.

7. DIVULGACIÓN DE RESULTADOS

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo de investigación se presentaron en cuatro eventos científicos, a saber: (1) 50th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ESSENTIAL OILS, realizado del 9 al 11 de septiembre de 2019 en Viena (Austria), en modalidad póster, con el título de “*Use of essential oils and natural extracts of plants that grown in Santander as antioxidants in a cosmetic product*”; (2) I SIMPOSIO DE QUÍMICA-UIS, realizado del 3 al 4 de diciembre de 2020, de forma virtual, en modalidad de ponencia oral, con el título: “Evaluación de la actividad antioxidante de aceites esenciales, extractos y mezclas binarias, de plantas aromáticas que crecen en Santander”; (3) 23rd INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ADVANCES IN EXTRACTION TECHNOLOGIES (ExTech XXIII), realizado del 30 de junio al 2 de julio de 2021, de forma virtual, en modalidad de póster, con el título “*Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Piper marginatum and Varronia curassavica*” y (4) el 34° CONGRESO LATINOAMERICANO DE QUÍMICA (CLAQ 2020), realizado del 11 al 15 de octubre del 2021 en Cartagena (Colombia), en modalidad de ponencia oral, con el título: “Estudio de estabilidad y propiedades antioxidantes de una microemulsión que incorpora extracto de *Psidium sarturianum* y AE de *Piper marginatum*”.

8. RECOMENDACIONES

Se recomienda comparar la composición química de los extracto de *Psidium sartorianum*, obtenido de plantas frescas y después de su destilación.

Se recomienda analizar el extracto de *P. sarturianum* por GC-ToF-HRMS para comprobar la composición elemental de los compuestos no identificados por GC/MS en el presente estudio.

Se recomienda incluir ensayos de citotoxicidad, genotoxicidad, alergenicidad, entre otros, del AE de *Piper marginatum*, del extracto de *Psidium sartorianum* y de la microemulsión, previo al estudio del producto con voluntarios.

Se recomienda realizar pruebas de estabilidad en condiciones de almacenamiento normales, por periodos mucho más prolongados, e incluir pruebas de estabilidad en diferentes empaques.

9. REFERENCIAS

AABY, K., EKEBERG, D., SKREDE, G. (2007). Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria×ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11), 4395–4406.

ADAMS, R. P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th ed. Ed. *Allured Publishing Corporation*, Carol Stream, Illinois, EE. UU. 1-804.

AGATI, G., AZZARELLO, E., POLLASTRI, S., TATTINI, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science*, 196, 67-76.

ALAM, M. N., BRISTI, N. J., RAFIQUZZAMAN, M. (2013). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152.

ARIAS, G. (2012) Estudio de la composición química y la actividad antioxidante de aceites esenciales y extractos aislados de *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* y *Lippia citridora*, cultivadas en el municipio Sucre (Santander). Trabajo de investigación (Maestría). *Universidad Industrial de Santander*, 1-202.

ARIAS, J., MEJÍA, J., CÓRDOBA, Y., MARTÍNEZ, J. R., STASHENKO, E. E., DEL VALLE, J. M. (2020). Optimization of flavonoids extraction from *Lippia graveolens* and *Lippia origanoides* chemotypes with ethanol-modified supercritical CO₂ after steam distillation. *Industrial Crops and Products*, 146(1), 1-9.

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

BABUSHOK, V. I., LINSTROM, P. J., ZENKEVICH, I. G. (2011). Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 40(4), 1-47.

BADARINATH, A., RAO, K., CHETTY, C., RAMKANTH, S., RAJAN, T., GNANAPRAKASH, K. (2010). A review on *in-vitro* antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. *International Journal of PharmTech Research*, 2(2), 1276-1285.

BARKER, S. A. (2007). Matrix solid-phase dispersion (MSPD). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(2), 151-162.

BARTOSIKOVA, L., NECAS, J. (2018). Epigallocatechin gallate: a review. *Veterinární Medicína*, 63(10), 443–467.

BAYEUX, M., FERNANDES, A., FOGLIO, M., CARVALHO, J. (2002). Evaluation of the antiedematogenic activity of artemetin isolated from *Cordia curassavica* DC. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35(10), 1229-1232.

BIRBEN, E., SAHINER, U. M., SACKESEN, C., ERZURUM, S., KALAYCI, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9-19.

BRÚ, J., GUZMAN, J. D. (2016). Folk medicine, phytochemistry and pharmacological application of *Piper marginatum*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26(1), 767-779.

BRUMMER, R. (2006) Rheology essentials of cosmetic and food emulsions. 1^a ed. Ed. *Springer Science & Business Media*, Hamburgo, Alemania, 15-16.

BURDA, S., OLESZEK, W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2774-2779.

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

BUTT, H. J., GRAF, K., KAPPL, M. (2013). Physics and chemistry of interfaces. 3^a ed. Ed. John Wiley & Sons, Darmstadt, Alemania, 246-279.

CAMACHO, L., CISNEROS, C., URIBE, M. J., RIOS, A., DELGADO, F. (2004). Antifungal activity of fruit pulp extract from *Psidium sartorianum*. *Fitoterapia*, 75(3-4), 401-404.

CAO, L., SI, J., LIU, Y., SUN, H., JIN, W., LI, Z., LE PAN, R. (2009) Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant properties of *Mosla chinensis* Maxim. *Food Chemistry*, 115(3), 801-805.

CARDEAL, Z. L., GOMES DA SILVA, M. D. R., MARRIOTT, P. J. (2006). Comprehensive two-dimensional gas chromatography/mass spectrometric analysis of pepper volatiles. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(19), 2823–2836.

CHEN, X., ZHANG, Y., ZU, Y., YANG, L. (2012). Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Schisandra chinensis* fruits. *Natural Product Research*, 26(9), 842-849.

CHEN, C., WAN, C., PENG, X., CHEN, J. (2020). A flavonone pinocembroside inhibits *Penicillium italicum* growth and blue mold development in ‘Newhall’ navel oranges by targeting membrane damage mechanism. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 165(1), 1-7.

CHENG, Z., FAN, F., ZHAO, J., LI, R., LI, S., ZHANG, E., TIAN, Y. (2020). Optimization of the microemulsion formulation of curcuma oil and evaluation of its acaricidal efficacy against *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) (Acari: Tetranychidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 23(4), 1014-1022.

CHIEW, K., PHOON, M., PUTTI, T., TAN, B., CHOW, V. (2016). Evaluation of antiviral activities of *Houttuynia cordata* Thunb. extract, quercetin, quercetrin and cinanserin on murine coronavirus and dengue virus infection. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(1), 1-7.

CHOI, Y. H., YAN, G. H. (2009). Ellagic acid attenuates immunoglobulin E-mediated allergic response in mast cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32(6), 1118-1121.

CHRISTAKI, E., BONOS, E., GIANNENAS, I., FLOROU-PANERI, P. (2012). Aromatic plants as a source of bioactive compounds. *Agriculture*, 2(3), 228-243.

CHUARIENTHONG, P., LOURITH, N., LEELAPORNPISID, P. (2010). Clinical efficacy comparison of anti-wrinkle cosmetics containing herbal flavonoids. *International Journal of Cosmetic Science*, 32(2), 99-106.

CHUNG, J. G. (1998). Inhibitory actions of ellagic acid on growth and arylamine N-acetyltransferase activity in strains of *Helicobacter pylori* from peptic ulcer patients. *Microbios*, 93, 115–127

COS, P., BRUYNE, T., HERMANS, N., APERS, S., BERGHE, D., VLIETINCK, A. (2004). Proanthocyanidins in health care: Current and new trends. *Current Medicinal Chemistry*, 11(10), 1345–1359.

CUYCKENS, F., CLAEYS, M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(1), 1-15.

DAWIDOWICZ, A. L., OLSZOWY, M. (2014). Does antioxidant properties of the main component of essential oil reflect its antioxidant properties? The comparison of antioxidant

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

properties of essential oils and their main components. *Natural Product Research*, 28(22), 1952-1963.

DE HOFFMANN, E., STROOBANT, V. (2007). Mass spectrometry: principles and applications. 3ª ed. Ed. John Wiley & Sons, West Sussex, Reino Unido, 273-298.

DE SANTOS, B. V., CÉLIA, E. V. D. C. M., DE O, C., GRAY, A. I. (1998). Phenylalkanoids from *Piper marginatum*. *Phytochemistry*, 49(5), 1381-1384.

DE SÁ, A. Á. M., DOS SANTOS, E. W. P., SANTANA, M. H. D. S., SANTOS, A. D. J., DE ARAUJO, G. R. S., SANTANA, D. G., LIRA, A. A. M. (2020). Evaluation of the incorporation of essential oils in microemulsions as a promising formulation in the inhibition of tyrosinase. *Industrial Crops and Products*, 154(1), 1-11.

DE SOUZA, M. T., DE SOUZA, M. T., BERNARDI, D., KRINSKI, D., DE MELO, D. J., DA COSTA OLIVEIRA, D., ZAWADNEAK, M. A. C. (2020). Chemical composition of essential oils of selected species of *Piper* and their insecticidal activity against *Drosophila suzukii* and *Trichopria anastrephae*. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(12), 13056-13065.

DELGADO, S., ZAPATA, S., CANO, Y., OSORIO, J., VEGA, O. (2020) Evaluation of the antioxidant and physical properties of an exfoliating cream developed from coffee grounds. *Journal of Food Process Engineering*, 43(5), 1-10.

DHIFI, W., BELLILI, S., JAZI, S., BAHLOUL, N., MNIF, W. (2016). Essential oils chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. *Medicines*, 3(4), 1-16.

DHINGRA, D., CHHILLAR, R. (2012). Antidepressant-like activity of ellagic acid in unstressed and acute immobilization-induced stressed mice. *Pharmacological Reports*, 64(4), 796-807.

DÍAZ, T., MORA, F., VELASCO, J., DÍAZ, T., ROJAS, L., USUBILLAGA, A., JUAN, C. (2008). Chemical composition and *in vitro* antibacterial activity of the essential oil of *Calycolpus moritzianus* (O. Berg) burret from Mérida, Venezuela. *Natural Product Communications*, 3(6), 937-940.

DING, C., DING, Y., CHEN, H., ZHOU, J. (2017). Chemistry and bioactivity of *ent*-kaurene diterpenoids, en: Atta-ur-Rahman (Editor), *Studies in Natural Products Chemistry*, Ed. Elsevier, 54, 141-197.

DUAN, X., ZHANG, W., LI, X., WANG, B. (2006). Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Food Chemistry*, 95(1), 37-43.

DUTRA, K., WANDERLEY-TEIXEIRA, V., GUEDES, C., CRUZ, G., NAVARRO, D., MONTEIRO, A., TEIXEIRA, Á. (2020). Toxicity of essential oils of leaves of plants from the genus *Piper* with influence on the nutritional parameters of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Essential Oil Bearing Plants JEOBP*, 23(2), 213-229.

EL-GARHY, A. M., ABD EL-RAOUF, O. M., EL-SAYEH, B. M., FAWZY, H. M., ABDALLAH, D. M. (2014). Ellagic acid antiinflammatory and antiapoptotic potential mediate renoprotection in cisplatin nephrotoxic rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 28(10), 472-479.

.

ERNST, M., SILVA, D. B., SILVA, R. R., VÊNCIO, R. Z., LOPES, N. P. (2014). Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: from analytical platforms to data acquisition and processing. *Natural Product Reports*, 31(6), 784-806.

FEDERAL FOOD, DRUG, AND COSMETIC ACT, Título 21, Capítulo 9. Disponible en <https://www.fda.gov/cosmetics/cosmetics-guidance-regulation/cosmetics-laws-regulations>.

Fecha de última actualización: el 29/03/2018. Fecha de última consulta: 8 de agosto de 2021.

FERMIN, G. (2010). Myrtaceae in Venezuela: diversity, distribution and ethno-botanical aspects. *Acta Horticulturae*, (849), 39–48.

FERNÁNDEZ, E., PASSOS, G., MEDEIROS, R., DA CUNHA, F., FERREIRA, J., CAMPOS, M., CALIXTO, J. (2007). Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (–)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European Journal of Pharmacology*, 569(3), 228-236.

FERREIRA-NUNES, R., DA SILVA, S. M. M., DE SOUZA, P. E. N., DE OLIVEIRA MAGALHÃES, P., CUNHA-FILHO, M., GRATIERI, T., GELFUSO, G. M. (2018). Incorporation of *Eugenia dysenterica* extract in microemulsions preserves stability, antioxidant effect and provides enhanced cutaneous permeation. *Journal of Molecular Liquids*, 265, 408-415.

FLORES, G., WU, S., NEGRIN, A., KENNELLY, E. (2015). Chemical composition and antioxidant activity of seven cultivars of guava (*Psidium guajava*) fruits. *Food Chemistry*, 170(1), 327-335.

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

FOKOU, J. B. H., DONGMO, P. M. J., BOYOM, F. F. (2020). Essential oil's chemical composition and pharmacological properties, en: El- Shemy, H. (Editor), *Essential Oils-Oils of Nature*. Ed. *IntechOpen*, 13-36.

FOTIE, J. (2010). The potential of ellagic acid as a possible antimalarial drug candidate. *Current Bioactive Compounds*, 6(3), 161–177.

FRACASSETTI, D., COSTA, C., MOULAY, L., TOMÁS-BARBERÁN, F. (2013). Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). *Food Chemistry*, 139(1-4), 578–588.

FUNGILAB. (2021): <https://fungilab.com/>. Fecha de acceso: 29 de marzo de 2021.

GARCÍA, L., PIRES, G., OLIVEIRA, D., SILVA, L., GOMES, A., AMARAL, J., RUELA, A. (2021). Incorporation of glycolic extract of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) into microemulsions and emulgels for skincare. *Industrial Crops and Products*, 161(1), 1-10.

GARCÍA-NIÑO, W. R., ZAZUETA, C. (2015). Ellagic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in liver protection. *Pharmacological Research*, 97, 84-103.

GIRISH, C., RAJ, V., ARYA, J., BALAKRISHNAN, S. (2013). Involvement of the GABAergic system in the anxiolytic-like effect of the flavonoid ellagic acid in mice. *European Journal of Pharmacology*, 710(1), 49-58.

GIROTTI, A. W. (1985). Mechanisms of lipid peroxidation. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*, 1(2), 87–95.

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

GÓMEZ, N. E., WITTE, L., HARTMANN, T. (1999) Chemical defense in larval tortoise beetles: essential oil composition of fecal shields of *Eurypedus nigrosignata* and foliage of its host plant, *Cordia curassavica*. *Journal of Chemical Ecology*, 25(5), 1007-1027.

GRAMPUROHIT, N., RAVIKUMAR, P., MALLYA, R. (2011). Microemulsions for topical use—a review. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 45(1), 100-107.

GUPTA, J., SIDDIQUE, Y., BEG, T., ARA, G., AFZAL, M. (2008). A review on the beneficial effects of tea polyphenols on human health. *International Journal of Pharmacology*, 4(5), 314-338.

HALLIWELL, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35(5), 1147-1150.

HATHOUT, R. M., MANSOUR, S., MORTADA, N. D., GENEIDI, A. S., GUY, R. H. (2010). Uptake of microemulsion components into the stratum corneum and their molecular effects on skin barrier function. *Molecular Pharmaceutics*, 7(4), 1266–1273.

HAYDER, N., BOUHLEL, I., SKANDRANI, I., KADRI, M., STEIMAN, R., GUIRAUD, P., CHEKIR-GHEDIRA, L. (2008). *In vitro* antioxidant and antigenotoxic potentials of myricetin-3-O-galactoside and myricetin-3-O-rhamnoside from *Myrtus communis*: modulation of expression of genes involved in cell defence system using cDNA microarray. *Toxicology in vitro*, 22(3), 567-581.

HERNÁNDEZ, T., CANALES, M., AVILA, J., DURAN, A., CABALLERO, J., DE VIVAR, A., LIRA, R. (2003) Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *Journal of Ethnopharmacology*, 88(2-3), 181-188.

HERNÁNDEZ, D., OROZCO, J., SERRANO, R., DURÁN, A., MERAZ, S., JIMÉNEZ-ESTRADA, M., HERNANDEZ, T. (2014). Temporal variation of chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia curassavica* (Jacq.) Roemer and Schultes: Boraginaceae. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas BLACPMA*, 13(1), 100-108.

HERZ, W., KULANTHAIVEL, P. (1984). ent-Kauranes and 10 α -methyl-eudesman-8 α h, 12-olides from *Wedelia calycina* and *Wedelia hispida*. *Phytochemistry*, 23(10), 2271-2275.

HILL, C. B., ROESSNER, U. (2013). Metabolic profiling of plants by GC–MS. En: Weckwerth, W., Kahl, G. (Editores), *The Handbook of Plant Metabolomics*, Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemania, 1–23.

HOAR, T. P., SCHULMAN, J. H. (1943). Transparent water-in-oil dispersions: the oleopathic hydro-micelle. *Nature*, 152(3847), 102-103.

HORVATHOVA, E., NAVAROVA, J., GALOVA, E., SEVCOVICOVA, A., CHODAKOVA, L., SNAHNICANOVA, Z., SLAMENOVA, D. (2014). Assessment of antioxidative, chelating, and DNA-protective effects of selected essential oil components (eugenol, carvacrol, thymol, borneol, eucalyptol) of plants and intact *Rosmarinus officinalis* oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(28), 6632-6639.

HUANG, Y. L., CHEN, C. C., HSU, F. L., CHEN, C. F. (1998). Two tannins from *Phyllanthus tenellus*. *Journal of Natural Products*, 61(4), 523-524.

HUANG, D., OU, B., PRIOR, R. L. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856.

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

INTERNATIONAL TRADE CENTER (ITC), (2021): <https://www.trademap.org/>. Fecha de acceso: 9 de abril de 2021.

IOSET, J. R., MARSTON, A., GUPTA, M. P., HOSTETTMANN, K. (2000) Antifungal and larvicidal cordiaquinones from the roots of *Cordia curassavica*. *Phytochemistry*, 53(5), 613-617.

ISKANDARSYAH, H.; RAHMAN, A. (2018). Accelerated stability testing of anti-aging cream: Formation of myristic acid and stearic acid as degradation products. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 10(1), 1-5.

JANICOT J., LIMONENE, INCI BEAUTY (2018). Acceso el 6 de junio de 2021 de <https://incibeauty.com/en/ingredients/19372-limonene>.

JARAMILLO-COLORADO, B., JULIO-TORRES, J., DUARTE-RESTREPO, E., GONZALEZ-COLOMA, A., JULIO-TORRES, L. F. (2015). Estudio comparativo de la composición volátil y las actividades biológicas del AE de *Piper marginatum* Jacq Colombiano. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas BLACPM*, 14(5), 343-354.

JAYAPRAKASHA, G., SINGH, R., SAKARIAH, K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. *Food Chemistry*, 73(3), 285–290.

JIN-TING, W. (2010). Research advance on natural hibiscetin red pigment, *Journal of Cereals & Oils*, 11(1), 1-3.

KANNAN, M. M., QUINE, S. D. (2013). Ellagic acid inhibits cardiac arrhythmias, hypertrophy and hyperlipidaemia during myocardial infarction in rats. *Metabolism*, 62(1), 52-61..

KHALFALLAH, A., BERREHAL, D., BENSOUICI, C., KABOUCHE, A., SEMRA, Z., VOUTQUENNE-NAZABADIOKO, L., KABOUCHE, Z. (2017). Flavonoids, cytotoxic,

antioxidant and antibacterial activities of *Evax pygmaea*. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 2292-2296.

KHODDAMI, A., WILKES, M. A., ROBERTS, T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18(2), 2328-2375.

KIM, S., LEE, T. (2018) Stabilization of *L*-ascorbic acid in cosmetic emulsions. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 57, 193-198.

KORTING, H. C., HÜBNER, K., GREINER, K., HAMM, G., BRAUN-FALCO, O. (1990). Differences in the skin surface pH and bacterial microflora due to the long-term application of synthetic detergent preparations of pH 5.5 and pH 7.0. Results of a crossover trial in healthy volunteers. *Acta Dermato-Venereologica*, 70(5), 429-431.

KREILGAARD, M. (2002). Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, S77-S98.

KULISIC, T., RADONIC, A., KATALINIC, V., MILOS, M. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, 85(4), 633–640.

KUMAR, N., SARBON, N., RANA, S., CHINTAGUNTA, A., PRATHIBHA, S., INGILALA, S., DIRISALA, V. (2021). Extraction of bioactive compounds from *Psidium guajava* leaves and its utilization in preparation of jellies. *AMB Express*, 11(1), 1-9.

KWAK, H. M., JEON, S. Y., SOHNG, B. H., KIM, J. G., LEE, J. M., LEE, K. B., SONG, K. S. (2005). β -Secretase (BACE1) inhibitors from pomegranate (*Punica granatum*) husk. *Archives of Pharmacal Research*, 28(12), 1328-1332.

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

LANDETE, J. (2011). Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International*, 44(5), 1150–1160.

LAOTHAWEEERUNGSAWAT, N., NEIMKHUM, W., ANUCHAPREEDA, S., SIRITHUNYALUG, J., CHAIYANA, W. (2020). Transdermal delivery enhancement of carvacrol from *Origanum vulgare* L. essential oil by microemulsion. *International Journal of Pharmaceutics*, 579(1), 1-12.

LEE, J. H., WON, J. H., CHOI, J. M., CHA, H. H., JANG, Y. J., PARK, S., KIM, D. K. (2014). Protective effect of ellagic acid on concanavalin A-induced hepatitis via toll-like receptor and mitogen-activated protein kinase/nuclear factor κ B signaling pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(41), 10110-10117.

LI, Y. (2011). Antioxidants in biology and medicine: essentials, advances, and clinical applications. 1ª ed. Ed. *Nova Science Publishers*, Nueva York, Estados Unidos, 21-22.

LI, Y., FABIANO-TIXIER, A. S., CHEMAT, F. (2014). Essential oils as antioxidants. En: Sharma, S. K. (Editor), Essential oils as reagents in green chemistry, Ed. *Springer Briefs in Molecular Science*, Jaipur, India, 21-27.

LI, J. E., FAN, S. T., QIU, Z. H., LI, C., NIE, S. P. (2015). Total flavonoids content, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from *Mosla chinensis* Maxim. cv. Jiangxiangru. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1022-1027.

LI, Y., WANG, C., TAO, Z., ZHAO, Z., YOU, L., ZHENG, R., ZHANG, Z. (2019). Enhanced antioxidant and antiproliferative activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf essential oils in microemulsion. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7(18), 15173-15181.

LIU, Y., ZHANG, J., NIE, X., ZHANG, P., YAN, X., FU, K. (2020). Simultaneous determination of 11 preservatives in cosmetics and pharmaceuticals by matrix solid-phase dispersion coupled with gas chromatography. *Acta Chromatographica*, 32(3), 203-209.

LOPES, L. B., VANDEWALL, H., LI, H. T., VENUGOPAL, V., LI, H. K., NAYDIN, S., HASS, M. A. (2010). Topical delivery of lycopene using microemulsions: enhanced skin penetration and tissue antioxidant activity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(3), 1346-1357.

MACÊDO, C. G., FONSECA, M. Y. N., CALDEIRA, A. D., CASTRO, S. P., PACIENZA-LIMA, W., BORSODI, M. P. G., CASTRO, K. C. F. (2020). Leishmanicidal activity of *Piper marginatum* Jacq. from Santarém-PA against *Leishmania amazonensis*. *Experimental Parasitology*, 210(1), 1-7.

MALINI, P., KANCHANA, G., RAJADURAI, M. U. R. U. (2011). Antibabetic efficacy of ellagic acid in streptozotocin-induced diabetes mellitus in albino wistar rats. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 4(3), 124-128.

MANDEL, F. (2017). LC/MS for Everybody/for Everything? – LC/MS Tips, en: Kromidas, S. (Editor), *The HPLC-MS Handbook for Practitioners*. Ed. WileyVCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Blieskastel, Alemania, 141-167.

MARCO, G. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 45(9), 594-598.

MÁRQUEZ-FERNÁNDEZ, D. M. (2019). Nanoencapsulation of bioactive ingredients: trends in pharmaceutical industry and functional foods. *Vitae*, 26(2), 66-67.

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

MASTELIC, J., JERKOVIC, I., BLAŽEVIĆ, I., POLJAK-BLAŽI, M., BOROVIĆ, S., IVANČIĆ-BAĆE, I., MÜLLER, N. (2008). Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(11), 3989-3996.

MCCLEMENTS, D. (2012). Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17(5), 235-245.

MIAO, R., ZHAN, S., HU, X., YUAN, W., WU, L., CUI, S., QU, X. (2021) Myricetin and M10, a myricetin-3-O- β -D-lactose sodium salt, modify composition of gut microbiota in mice with ulcerative colitis. *Toxicology Letters*, 346, 7-15.

MICHIELIN, E., DE LEMOS WIESE, L., FERREIRA, E., PEDROSA, R., FERREIRA, S. (2011). Radical-scavenging activity of extracts from *Cordia verbenacea* DC obtained by different methods. *The Journal of Supercritical Fluids*, 56(1), 89-96.

MILLER, H. E. (1971). A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 48(2), 91-91.

MILLER, N., RICE-EVANS, C., DAVIES, M., GOPINATHAN, V., MILNER, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84(4), 407-412.

MIRALIAKBARI, H., SHAHIDI, F. (2008). Antioxidant activity of minor components of tree nut oils. *Food Chemistry*, 111(2), 421-427.

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

MITRA, S. (2003). Sample preparation techniques in analytical chemistry. 1^a ed. Ed. *John Wiley & Sons*. New Jersey, Estados Unidos, 1-35.

MIYAZAWA, M., SHIMAMURA, H., NAKAMURA, S. I., KAMEOKA, H. (1996). Antimutagenic activity of (+)- β -eudesmol and paeonol from *Dioscorea japonica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(7), 1647-1650.

MOGHIMIPOUR, E., SALIMI, A., EFTEKHARI, S. (2013). Design and characterization of microemulsion systems for naproxen. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 3(1), 63-71.

MOON, J. K., SHIBAMOTO, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1655-1666.

MOULIK, S. P., PAUL, B. K. (1998). Structure, dynamics and transport properties of microemulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 78(2), 99-195.

MULLEN, W., YOKOTA, T., LEAN, M. E., CROZIER, A. (2003). Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC-MSⁿ. *Phytochemistry*, 64(2), 617-624.

NAGULA, R., WAIRKAR, S. (2019). Recent advances in topical delivery of flavonoids: A Review. *Journal of Controlled Release*, 296, 190-201.

NICHOLS, J., KATIYAR, S. (2010). Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Archives of Dermatological Research*, 302(2), 71-83.

NIKI, E. (2015). Lipid oxidation in the skin. *Free Radical Research*, 49(7), 827-834.

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

NIST, STANDARD REFERENCE DATABASE; NIST/EPA/NIH Spectral Library with Search Program, Version 2.2 (2014), Gaithersburg, EE. UU.

NOHYNEK, G. J., ANTIGNAC, E., RE, T., TOUTAIN, H. (2010). Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 243(2), 239-259.

OLIVEIRA, D., AMARAL, J., GARCIA, L., DOS SANTOS, M., SILVA, L., ALMEIDA, M., RUELA, A. (2021). Associating chitosan and microemulsion as a topical vehicle for the administration of herbal medicines. *Carbohydrate Polymers*, 255 (1), 1-9.

OLIVERO-VERBEL, J., GONZÁLEZ-CERVERA, T., GÜETTE-FERNANDEZ, J., JARAMILLO-COLORADO, B., STASHENKO, E. E. (2010). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(4), 568-574.

OTTO, A., DU PLESSIS, J., WIECHERS, J. (2009). Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery. *International Journal of Cosmetic Science*, 31(1), 1-19.

PAPOUTSI, Z., KASSI, E., TSIAPARA, A., FOKIALAKIS, N., CHROUSOS, G. P., MOUSATSOU, P. (2005). Evaluation of estrogenic/antiestrogenic activity of ellagic acid via the estrogen receptor subtypes ER α and ER β . *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7715–7720

PATEL, N., JAISWAL, G., BHUTANI, K. (2016). A review on biological sources, chemistry and pharmacological activities of pinostrobin. *Natural Product Research*, 30(18), 2017-2027.

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

PATIL, V. M., MASAND, N. (2018). Anticancer potential of flavonoids: chemistry, biological activities, and future perspectives. En: Atta-ur-Rahman (Editor), *Studies in Natural Products Chemistry*, Ed. Elsevier, 401-430.

PATÍÑO, L. A., MORALES, C. A. (2013). Skin microbiota: The cutaneous ecosystem. *Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica*. 21(2), 47-158.

PAVONI, L., PERINELLI, D., BONACUCINA, G., CESPI, M., PALMIERI, G. (2020). An overview of micro-and nanoemulsions as vehicles for essential oils: Formulation, preparation and stability. *Nanomaterials*, 10(1), 1-24.

PIETTA, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035-1042.

PINO, J., BELLO, A., URQUIOLA, A., AGUERO, J., MARBOT, R. (2003). Leaf oils of *Psidium cymosum* Urb. and *Psidium sartorianum* Niedz. from Cuba. *Journal of Essential Oil Research JEOR*, 15(3), 187-188.

PIO, F., PAZ, S., LOPEZ, M., URIBE, M., WILLMS, K., LOPEZ, G., DELGADO, F. (2013). Antibacterial activity of extracts obtained from the nanchi (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth), arrayán (*Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied.) and ayale (*Crescentia alata* Kunth) fruits. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas BLACPMA*, 12(4), 356-364.

POLITEO, O., JUKIC, M., MILOS, M. (2007). Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. *Food Chemistry*, 101(1), 379–385.

POLJŠAK, B., DAHMANE, R. (2012). Free radicals and extrinsic skin aging. *Dermatology Research and Practice*, 1(1), 1-4.

PRABU, G., GNANAMANI, A., SADULLA, S. (2006). Guaijaverin—a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. *Journal of Applied Microbiology*, 101(2), 487-495.

RAO, T. N. (2018). Validation of analytical methods, en: Stauffer, M. T. (Editor), Calibration and Validation of Analytical Methods—A Sampling of Current Approaches, Ed. *InTechOpen*: Londres, Reino Unido, 131-141.

REGUEIRO, J., SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, C., VALLVERDÚ-QUERALT, A., SIMAL-GÁNDARA, J., LAMUELA-RAVENTÓS, R., IZQUIERDO-PULIDO, M. (2014). Comprehensive identification of walnut polyphenols by liquid chromatography coupled to linear ion trap–Orbitrap mass spectrometry. *Food Chemistry*, 152(1), 340–348.

REIGADA, J., TCACENCO, C., ANDRADE, L., KATO, M., PORTO, A., LAGO, J. (2007). Chemical constituents from *Piper marginatum* Jacq.(Piperaceae)—antifungal activities and kinetic resolution of (RS)-marginatumol by *Candida antarctica* lipase (Novozym 435). *Tetrahedron: Asymmetry*, 18(9), 1054-1058.

RIBEIRO, N., CAMARA, C., RAMOS, C. (2016). Toxicity of essential oils of *Piper marginatum* Jacq. against *Tetranychus urticae* Koch and *Neoseiulus californicus* (McGregor). *Chilean Journal of Agricultural Research*, 76(1), 71-76.

RINNERTHALER, M., BISCHOF, J., STREUBEL, M. K., TROST, A., RICHTER, K. (2015). Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules*, 5(2), 545-589.

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

RIVERO, G., PACHECO, D., MARTIN, L. M., SANCHEZ-URDANETA, A., QUIROS, M., ORTEGA, J. BRACHO, B. (2013). Flavonoids extracted from *Psidium* species (Myrtaceae) in Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 30(2), 217-24.

ROJAS, L. B., USUBILLAGA, A. (2000). Composition of the essential oil of *Satureja brownei* (SW.) Briq. from Venezuela. *Flavour and Fragrance Journal*, 15(1), 21-22.

RUBERTO, G., BARATTA, M. T. (2000). Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *food chemistry*, 69(2), 167-174.

RUCKENTEIN, E. (1999). Thermodynamics of microemulsion II, en: Ezrahi, S., Aserin, A., Garti, N. (Editores), Handbook of microemulsion science and technology, Ed. *CRC Press*, Nueva York, Estados Unidos, 45-58.

SAAVEDRA, R. (2015). Análisis y estudio comparativo de los extractos obtenidos con fluido supercrítico y de los aceites esenciales de diferentes plantas de género *Piper* (Trabajo de grado). *Universidad Industrial de Santander*, Bucaramanga, Colombia.

SAE-YOON, A., SAKDISET, P. (2020). Development of microemulsions containing *Glochidion wallichianum* leaf extract and potential for transdermal and topical skin delivery of gallic acid. *Scientia Pharmaceutica*, 88(4), 1-15.

SALEEM, H., ZENGİN, G., LOCATELLI, M., TARTAGLIA, A., FERRONE, V., HTAR, T. T., AHMED, N. (2020). *Filago germanica* (L.) Huds. bioactive constituents: Secondary metabolites fingerprinting and *in vitro* biological assays. *Industrial Crops and Products*, 152(1), 1-9.

SÁNCHEZ-PRADO, L., ALVAREZ-RIVERA, G., LAMAS, J., LORES, M., GARCIA-JARES, C., LLOMPART, M. (2011) Analysis of multi-class preservatives in leave-on and rinse-off

cosmetics by matrix solid-phase dispersion. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(10), 3293-3304.

SANTOS, A., DEFAVERI, A., BIZZO, H., SAN GIL, R., SATO, A. (2013). *In vitro* propagation, histochemistry, and analysis of essential oil from conventionally propagated and in vitro-propagated plants of *Varronia curassavica* Jacq. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49(4), 405-413.

SAYRE, C., TAKEMOTO, J., MARTINEZ, S., DAVIES, N. (2012). Chiral analytical method development and application to pre-clinical pharmacokinetics of pinocembrin. *Biomedical Chromatography*, 27(6), 681–684.

SCHAICH, K. M., TIAN, X., XIE, J. (2015). Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods*, 14(1), 111-125.

SCHMID-WENDTNER, M. H., KORTING, H. C. (2006). The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. *Skin Pharmacology and Physiology*, 19(6), 296-302.

SCHNEIDER, C. (2009). An update on products and mechanisms of lipid peroxidation. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(3), 315-321.

SCHULMAN, J., STOECKENIUS, W., PRINCE, L. (1959). Mechanism of formation and structure of micro emulsions by electron microscopy. *The Journal of Physical Chemistry*, 63(10), 1677-1680.

SCIARRONE, D., GIUFFRIDA, D., ROTONDO, A., MICALIZZI, G., ZOCCALI, M., PANTÒ, S., MONDELLO, L. (2017). Quali-quantitative characterization of the volatile constituents in

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

Cordia verbenacea DC essential oil exploiting advanced chromatographic approaches and nuclear magnetic resonance analysis. *Journal of Chromatography A*, 1524, 246-253.

SHAIN, L., MILLER, J. B. (1982). Pinocembrin: an antifungal compound secreted by leaf glands of eastern cottonwood. *Phytopathology*, 72(7), 877-880.

SHARMA, K., GULERIA, S., RAZDAN, V. K., BABU, V. (2020). Synergistic antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of some selected medicinal plants in combination and with synthetic compounds. *Industrial Crops and Products*, 154, 1-14.

SHON, M. (2003). Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of *Hymenochaetaceae*) extracts. *Food Chemistry*, 82(4), 593–597.

SIM, K. S., NURESTRI, A. S., NORHANOM, A. W. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of *Pereskia grandifolia* Haw (Cactaceae) extracts. *Pharmacognosy Magazine*, 6(23), 248-254.

SINGLA, R. K., A. K. DUBEY, A. GARG, R. K. SHARMA, M. FIORINO, S. M. AMEEN, M. A. HADDAD, M. AL-HIARY. (2019). Natural polyphenols: Chemical classification, definition of classes, subcategories, and structures. *Journal of AOAC International*, 102 (5):1397-1400

SJÖBLOM, J., LINDBERG, R., FRIBERG, S. E. (1996). Microemulsions-phase equilibria characterization, structures, applications and chemical reactions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 65, 125–287.

SMAOUI, S., HLIMA, H. B., CHOBBA, I. B., KADRI, A. (2017) Development and stability studies of sunscreen cream formulations containing three photo-protective filters. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, 1216-1222.

SMITH, V., WILKINSON, S. M. (2016). Cosmetics, en: Johansen, J. D., Lepoittevin, J. P., Thyssen, J. P (Editores), Quick guide to contact dermatitis, Ed. Berlin Heidelberg: Springer, 257-273.

SOH, P. N., WITKOWSKI, B., OLAGNIER, D., NICOLAU, M. L., GARCIA-ALVAREZ, M. C., BERRY, A., BENOIT-VICAL, F. (2009). *In vitro* and *in vivo* properties of ellagic acid in malaria treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(3), 1100-1106.

SOSA, A., MOYA ÁLVAREZ, A., BRACAMONTE, E., KORENAGA, M., MARCO, J., BARROSO, P. (2020). Efficacy of topical treatment with (–)-epigallocatechin gallate, a green tea catechin, in mice with cutaneous leishmaniasis. *Molecules*, 25(7), 1-9.

STALIKAS, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30(18), 3268-3295.

STASHENKO, E. E., JARAMILLO, B., MARTÍNEZ, J. (2004). Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. *Journal of Chromatography A*, 1025(1), 93-103.

STASHENKO, E. E., MARTÍNEZ, J. (2007). Sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid-phase micro-extraction. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(2), 235-242.

STASHENKO, E. E., RUIZ, C., MUÑOZ, A., CASTAÑEDA, M., MARTÍNEZ, J. (2008). Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils of *Lippia Origanoides* H.B.K. grown in Colombia. *Natural Product Communications*, 3(4), 563-566.

STASHENKO, E. E. (2009). Aceites esenciales. *Publicaciones UIS, Universidad Industrial de Santander*, Bucaramanga, Colombia, 13-15.

STASHENKO, E. E., MARTÍNEZ, J. (2010). GC y GC-MS: configuración del equipo versus aplicaciones. *Scientia Chromatographica*, 2(3), 25-51.

STASHENKO, E. E., MARTÍNEZ, J., CÁRDENAS-VARGAS, S., SAAVEDRA-BARRERA, R., DURÁN, D. (2013). GC–MS study of compounds isolated from *Coffea arabica* flowers by different extraction techniques. *Journal of Separation Science*, 36(17), 2901-2914.

STASHENKO, E. E., MARTÍNEZ, J. (2018). The Expression of Biodiversity in the Secondary Metabolites of Aromatic Plants and Flowers Growing in Colombia, en: El-Shemy, H. A. (Editor), Potential of essential oil. Ed. *InTech*: Londres, Reino Unido, 59-86.

STASHENKO, E. E., MARTÍNEZ, J. (2019). Study of essential oils obtained from tropical plants grown in Colombia, en: El-Shemy, H. A. (Editor), Essential Oils: Oils of Nature, Ed. *InTech*: Londres, Reino Unido. 403-451.

SU, J., FU, P., SHEN, Y., ZHANG, C., LIANG, M., LIU, R., ZHANG, W. (2008). Simultaneous analysis of flavonoids from *Hypericum japonicum* Thunb. ex Murray (Hypericaceae) by HPLC–DAD–ESI/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46(2), 342-348.

SUN, T., HO, C. (2005). Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chemistry*, 90(4), 743-749.

SUN, Y.; YANG, C.; TSAO, R. (2018) Nomenclature and general classification of antioxidant activity/capacity assays, en: Apak, R., Capanoglu, E., Shahidi, F., (Editores), Measurement of

antioxidant activity & capacity: Recent Trends and Applications, Ed. *John Wiley & Sons Ltd.*: Hoboken, NJ, Estados Unidos, 1–19.

TADTONG, S., WATTHANACHAIYINGCHAROEN, R., KAMKAEN, N. (2014). Antimicrobial constituents and synergism effect of the essential oils from *Cymbopogon citratus* and *Alpinia galanga*. *Natural Product Communications*, 9(2), 277-280.

TAHMASEBI, E., YAMINI, Y., MEHDINIA, A., ROUHI, F. (2012). Polyaniline-coated Fe₃O₄ nanoparticles: An anion exchange magnetic sorbent for solid-phase extraction. *Journal of Separation Science*, 35(17), 2256-2265.

TOPÇU, G., AY, M., BILICI, A., SARIKÜRKÇÜ, C., ÖZTÜRK, M., ULUBELEN, A. (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, 103(3), 816-822.

TSUNEKI, H., MA, E., KOBAYASHI, S., SEKIZAKI, N., MAEKAWA, K., SASAOKA, T., KIMURA, I. (2005). Antiangiogenic activity of β -eudesmol *in vitro* and *in vivo*. *European Journal of Pharmacology*, 512(2-3), 105-115.

TUCKER, A., MACIARELLO, M., LANDRUM, L. R. (1995). Volatile leaf oils of American Myrtaceae. III. *Psidium cattleianum* Sabine, *P. friedrichsthalianum* (Berg) Niedenzu, *P. guajava*, *P. guineense*., and *P. sartorianum* (Berg) Niedenzu. *Journal of Essential Oil Research JEOR*, 7(2), 187-190.

TULER, A., CARRIJO, T., FERRERIA, M., PEIXOTO, A. (2017). Flora of Espírito Santo: *Psidium* (Myrtaceae). *Rodriguésia*, 68(5), 1791-1805.

TUNIT, P., KIETINUN, S., SRIYAKUL, K., TUNGSUKRUTHAI, P., CHITTASUPHO, C. (2020). Enhancement of antioxidant activity by the combination of *Moringa oleifera* and *Perilla frutescens* seed oils in microemulsion. *Key Engineering Materials*, 859, 100–106.

TÜRK, G., ÇERİBAŞI, A. O., SAKIN, F., SÖNMEZ, M., ATEŞŞAHİN, A. (2010). Antiperoxidative and anti-apoptotic effects of lycopene and ellagic acid on cyclophosphamide-induced testicular lipid peroxidation and apoptosis. *Reproduction, Fertility and Development*, 22(4), 587-596.

UMESALMA, S., SUDHANDIRAN, G. (2010). Differential inhibitory effects of the polyphenol ellagic acid on inflammatory mediators NF- κ B, iNOS, COX-2, TNF- α , and IL-6 in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon. *Carcinogenesis Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 107, 650–655.

UPPUGUNDLA, N., ENGELBERTH, A., VANDHANA RAVINDRANATH, S., CLAUSEN, E., LAY, J., GIDDEN, J., CARRIER, D. (2009). Switchgrass water extracts: extraction, separation and biological activity of rutin and quercitrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(17), 7763–7770.

VANDEPUTTE, O. M., KIENDREBEOGO, M., RAJAONSON, S., DIALLO, B., MOL, A., EL JAZIRI, M., BAUCHER, M. (2009). Identification of catechin as one of the flavonoids from *Combretum albiflorum* bark extract that reduces the production of quorum-sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(1), 243–253.

VATTEM, D., SHETTY, K. (2005). Biological functionality of ellagic acid: a review. *Journal of Food Biochemistry*, 29(3), 234–266.

VELANDIA, S., FLECHAS, M., STASHENKO, E. E., OCAZIONEZ, R. (2016). Proposal to select essential oils from colombian plants for research based on its cytotoxicity. *Vitae*, 23(1), 18-29.

VELDE, V., LAVIE, D., ZELNIK, R., MATIDA, A., PANIZZA, S. (1982). Cordialin A and B, two new triterpenes from *Cordia verbenacea* DC. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 2697-2700.

VICENTINI, F. T., SIMI, T. R., DEL CIAMPO, J. O., WOLGA, N. O., PITOL, D. L., IYOMASA, M. M., FONSECA, M. J. (2008). Quercetin in W/O microemulsion: *in vitro* and *in vivo* skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated *in vivo*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69(3), 948-957.

VILLARROEL, B., YANDRI, H., HENRÍQUEZ GUZMÁN, W., CRESCENTE, O., LANZA, J. G. (2015) Aceite esencial de *Wedelia calycina* (ASTERACEAE): composición química, actividad antibacteriana y antifúngica. *Saber*, 27(1), 87-93.

VIUDA-MARTOS, M., RUIZ NAVAJAS, Y., SÁNCHEZ ZAPATA, E., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J., PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. (2010). Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(1), 13-19.

WANG, S., MECKLING, K. A., MARCONE, M. F., KAKUDA, Y., TSAO, R. (2011). Synergistic, additive, and antagonistic effects of food mixtures on total antioxidant capacities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(3), 960–968.

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

WANG, H., YIH, K., YANG, C., HUANG, K. (2017). Antioxidant activity and major chemical component analyses of twenty-six commercially available essential oils. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(4), 881-889.

WANG, J., ZHENG, D. (2018). Ellagic acid self-microemulsion and preparation method thereof. China. Patente N° CN108324686A.

WEI, W., LI, S., CHENG, L., HAO, E., HOU, X., ZHOU, H., YAO, X. (2021). Comprehensive characterization of the chemical constituents in Yiganmingmu oral liquid and the absorbed prototypes in cynomolgus monkey plasma after oral administration by UPLC-Q-TOF-MS based on the self built components database. *Chinese Medicine*, 16(1), 1-21.

WIANOWSKA, D., GIL, M. (2019). New insights into the application of MSPD in various fields of analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry TRAC*, 112(1), 29-51.

WILEY 138 L, MASS SPECTRAL DATABASE; John WILEY & SONS, (1990), EE. UU.

WOJTUNIK-KULESZA, K., CIESLA, L., WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M. (2018). Approach to determination a structure-antioxidant activity relationship of selected common terpenoids evaluated by ABTS⁺ radical-cation assay. *Natural Product Communications*, 13(3), 295-298.

WOLFENDER, J., MARTI, G., THOMAS, A., BERTRAND, S. (2015). Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. *Journal of Chromatography A*, 1382, 136–164.

YAHAYA, A. D., KORMIN, F., MOHAMED-ANUAR, N. A. F., GHAZALI, M. I., ZAINOL-ABIDIN, N. A., ABU-BAKAR, M. F., SABRAN, S. F. (2021). Development of cinnamon

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

essential oil blends microemulsion as natural preservatives for topping creams. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 736(1), 1-9.

YANISHLIEVA, N., MARINOVA, E., POKORNÝ, J. (2006). Natural antioxidants from herbs and spices. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(9), 776-793.

YÁÑEZ-RUEDA, X., BETANCUR-GALVIS, L., AGUDELO-GÓMEZ, L. S., ZAPATA, M. B., CORREA-ROYERO, J., MESA-ARANGO, A. C., STASHENKO, E. E. (2009). Composición química y actividad biológica de aceites esenciales de *Calycolpus moritzianus* recolectado en el Norte de Santander, Colombia. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 41(3), 259-267.

YAO, Y., LUONG, T. N., LEPIK, M., AFTAB, N., FONG, V. H., VIEIRA, A. (2012). Synergism of antioxidant phytochemicals: comparisons among purified polyphenols and dietary-plant extracts. *Acta Horticulturae*, 939, 121–127.

YASHIMA, M., SATO, Y., KAZAMA, I. (2021). Catechin synergistically potentiates mast cell-stabilizing property of caffeine. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 17(1), 1-7.

ZAFRILLA, P., FERRERES, F., TOMÁS-BARBERÁN, F. A. (2001). Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) jams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3651-3655.

ZHAO, J., BLAYNEY, A., LIU, X., GANDY, L., JIN, W., YAN, L., WANG, C. (2021). EGCG binds intrinsically disordered N-terminal domain of p53 and disrupts p53-MDM2 interaction. *Nature Communications*, 12(1), 1-11.

ZHENG, Y., FU, Z., DENG, G., GUO, R., CHEN, D. (2020). Free radical scavenging potency of ellagic acid and its derivatives in multiple H^+/e^- -processes. *Phytochemistry*, 180(1), 1-9.

ZHU, F., XU, J., KE, Y., HUANG, S., ZENG, F., LUAN, T., OUYANG, G. (2013). Applications of *in vivo* and *in vitro* solid-phase microextraction techniques in plant analysis: a review. *Analytica Chimica Acta*, 794, 1-14.

9. ANEXOS

Anexo 1. Curvas de calibración para la cuantificación de la actividad antioxidante por los métodos ABTS⁺ y β-caroteno de AE y extractos.

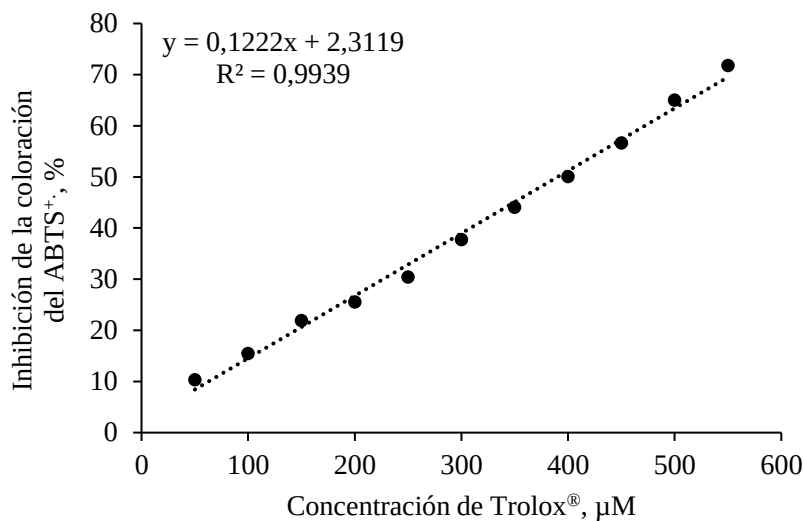


Figura A1-1. Curva de calibración para la cuantificación de la actividad antioxidante por el método de decoloración del ABTS⁺, usando Trolox[®] como sustancia de referencia.

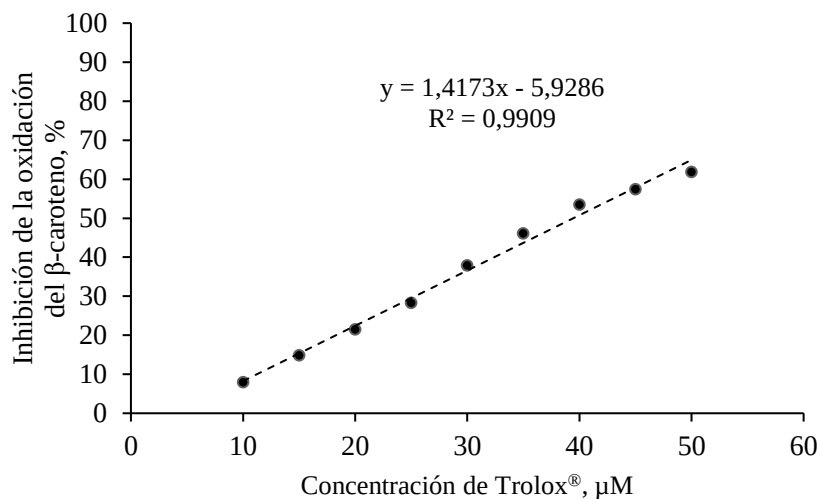


Figura A1-2. Curva de calibración para la cuantificación de la actividad antioxidante por el método de decoloración del β-caroteno, usando Trolox[®] como sustancia de referencia.

Anexo 2. Actividad antioxidante medida por el ensayo de ABTS⁺ de las mezclas binarias.

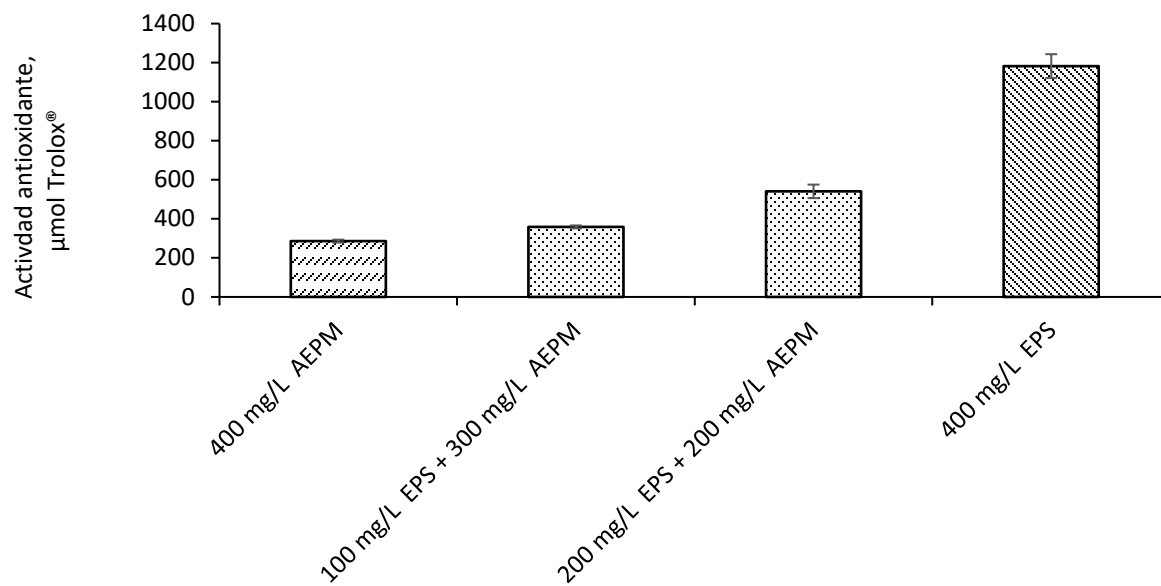


Figura A2-1. Actividad antioxidante medida por el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺ de la mezcla binaria-3. AEPM: aceite esencial de *Piper marginatum*; EPS: extracto de *Psidium sartorianum*.

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

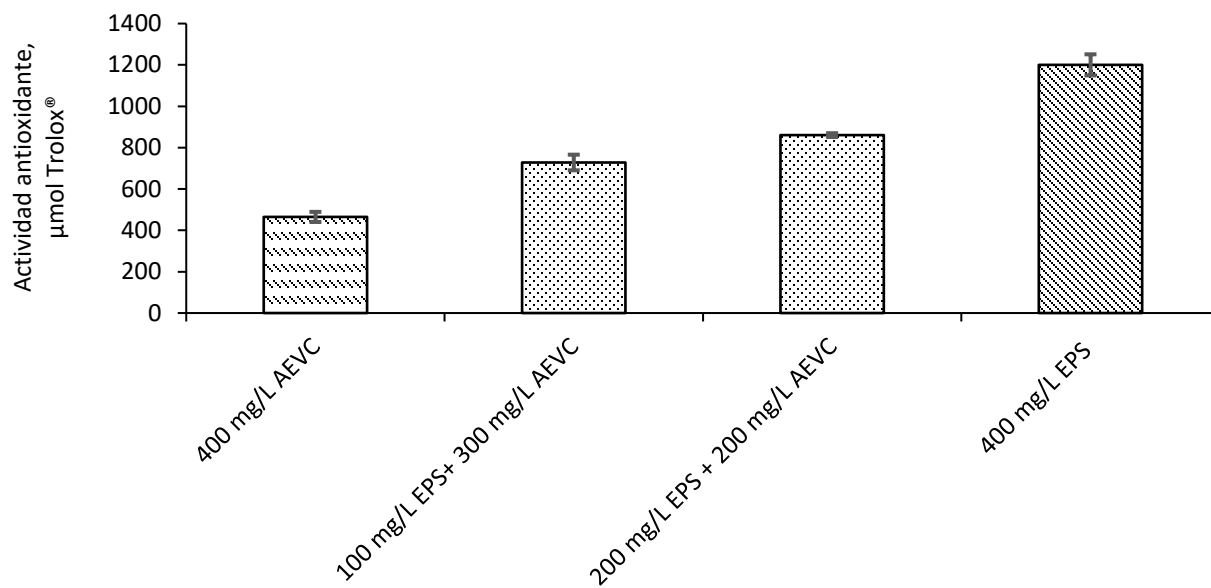


Figura A2-2. Actividad antioxidante medida por el ensayo de decoloración del catión-radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$ de la mezcla binaria-4. AEVC: aceite esencial de *Varronia curassavica*; EPS: extracto de *Psidium sartorianum*;

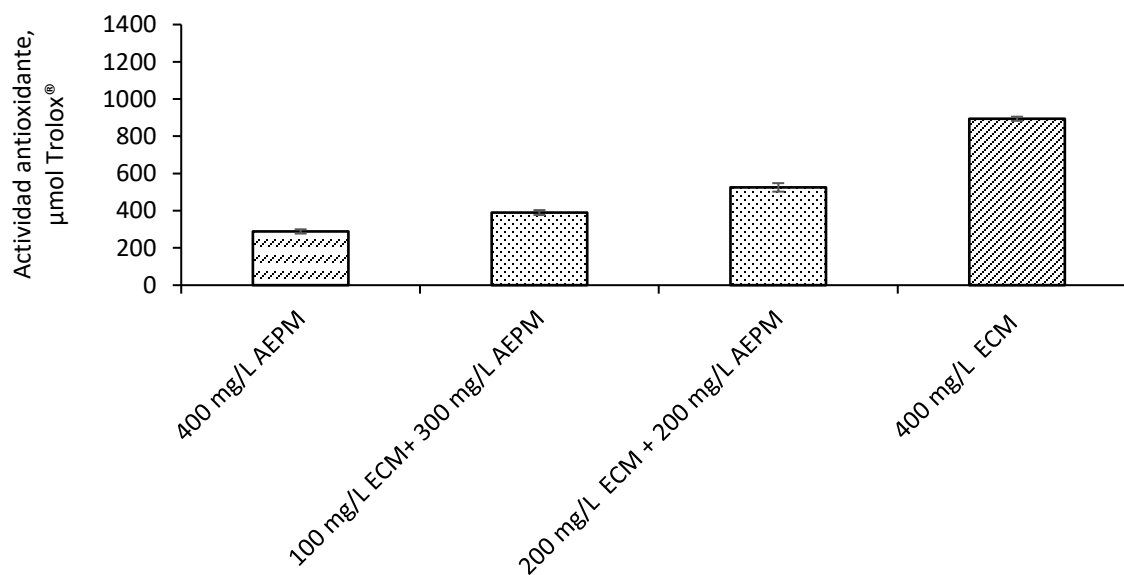


Figura A2-3. Actividad antioxidante medida por el ensayo de decoloración del catión-radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$ de la mezcla binaria-5. AEPM: aceite esencial de *Piper marginatum*; ECM: extracto de *Calycolpus moritzianus*.

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

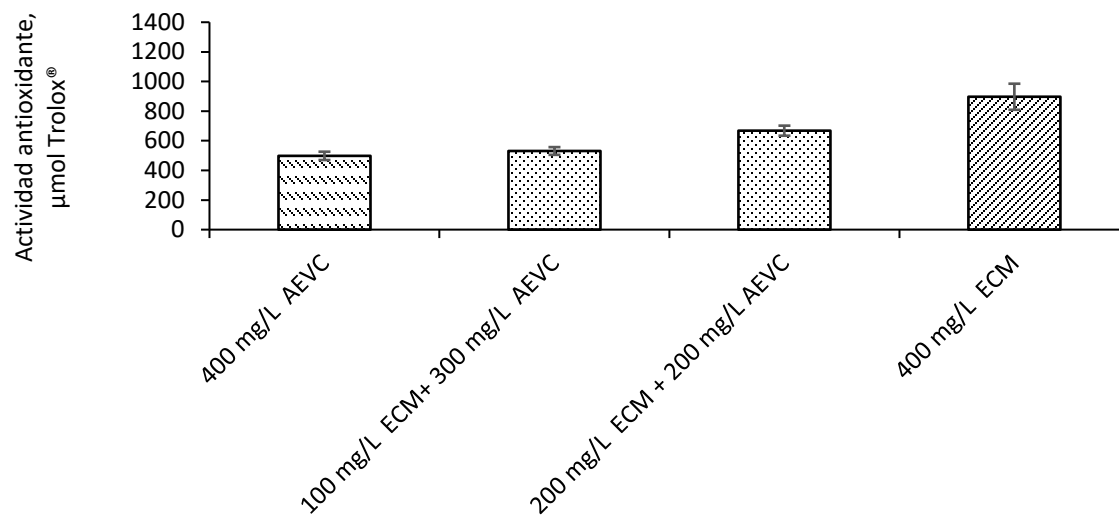


Figura A2-4. Actividad antioxidante medida por el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+} de la mezcla binaria-6. AEVC: aceite esencial de *Varronia curassavica*; ECM: extracto de *Calycolpus moritzianus*.

Anexo 3. Perfil cromatográfico obtenido por GC/FID y espectros de masas de los componentes mayoritarios obtenidos por GC-TOF-HRMS del AE de *Piper marginatum*.

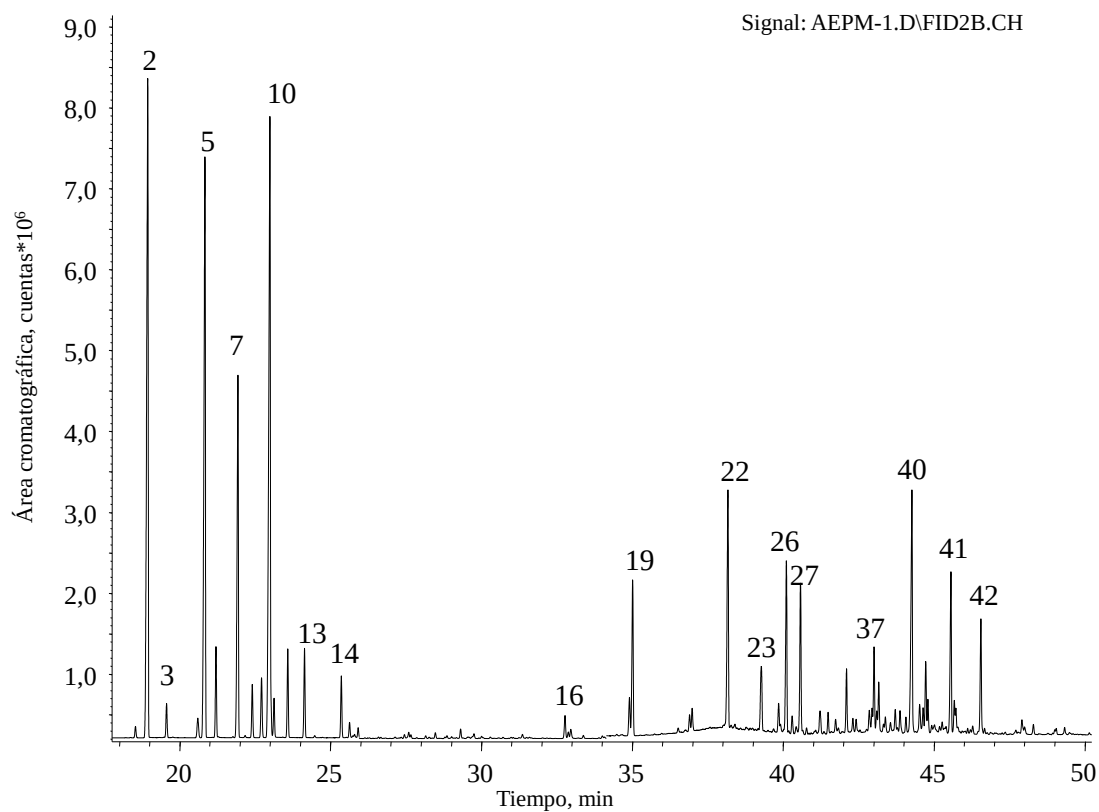


Figura A3-1. Perfil cromatográfico obtenido por GC/FID del AE de *Piper marginatum*, columna DB-5 (60 m). Inyección *split* (1:30). Véase la identificación de los picos en la **Tabla 6**.

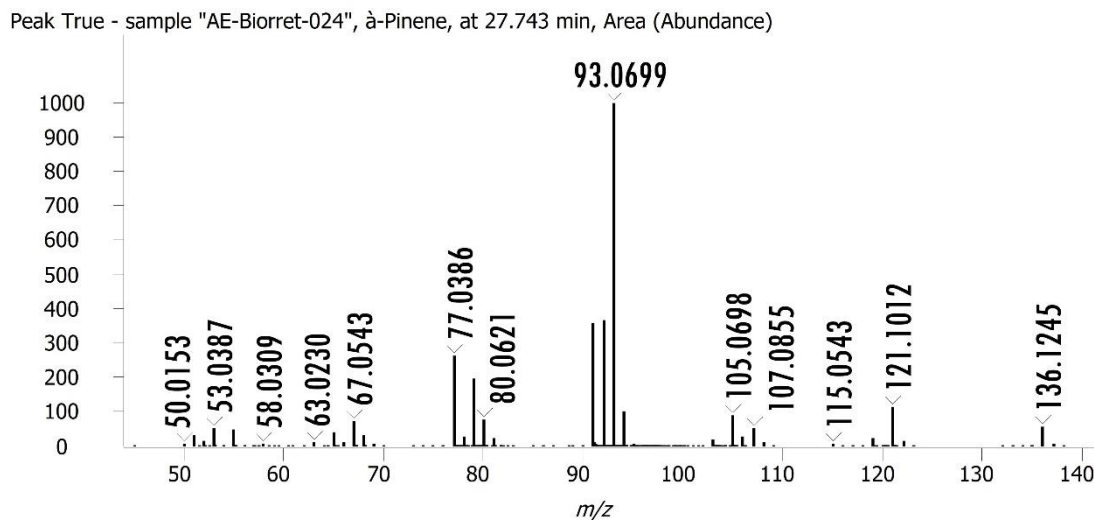


Figura A3-2. Espectro de masas obtenido por GC-ToF-HRMS (columna Rxi-5MS) del α -pineno presente en el AE de *Piper marginatum*.

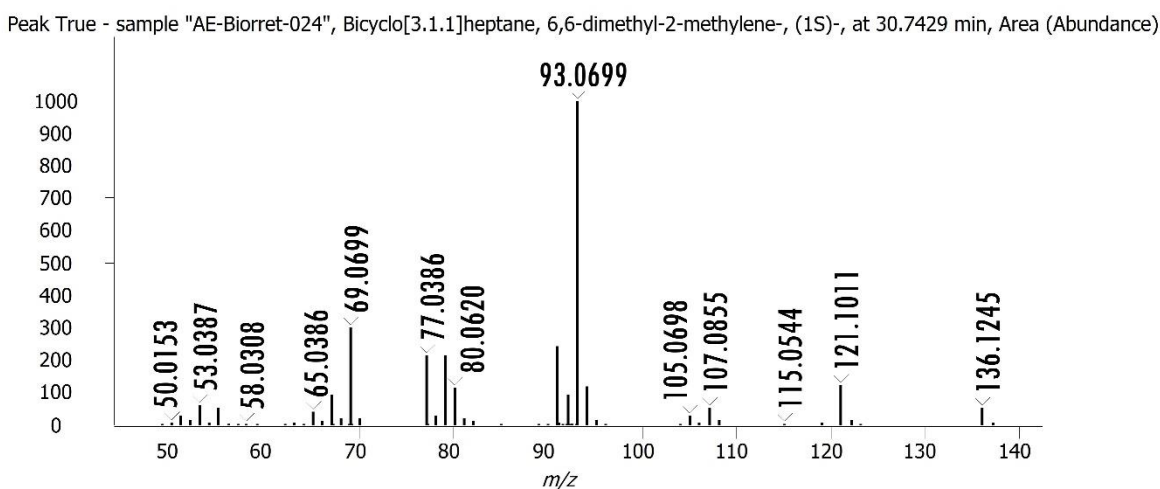


Figura A3-3. Espectro de masas obtenido por GC-ToF-HRMS (columna Rxi-5MS) del β -pineno presente en el AE de *Piper marginatum*.

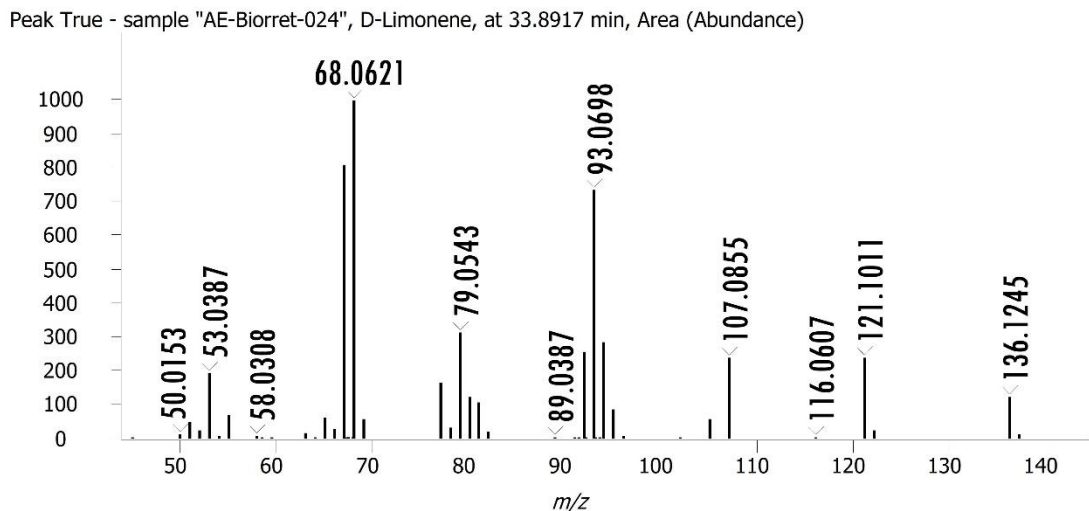


Figura A3-4. Espectro de masas obtenido por GC-ToF-HRMS (columna Rxi-5MS) del limoneno presente en el AE de *Piper marginatum*.

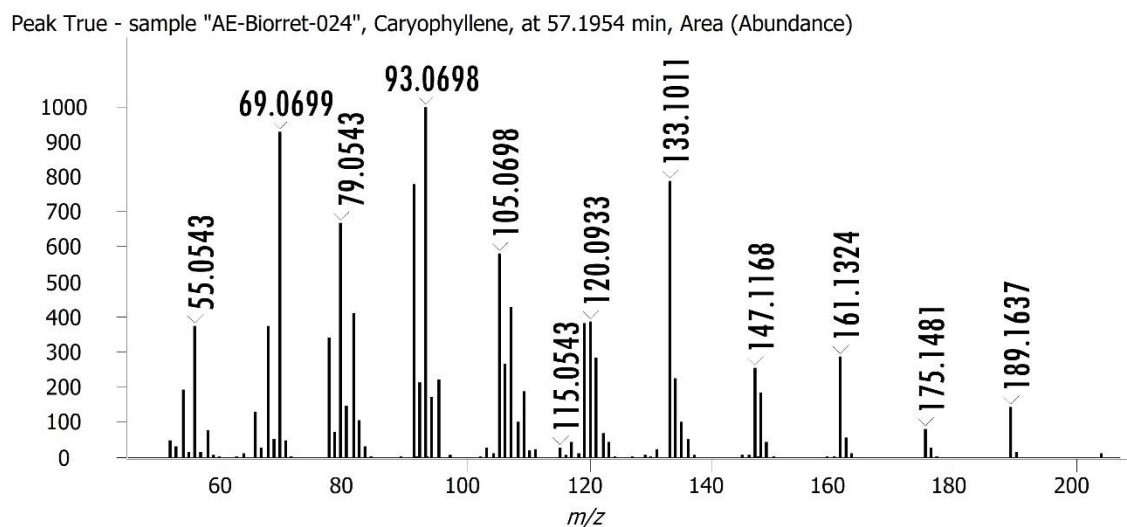


Figura A3- 5. Espectro de masas obtenido por GC-ToF-HRMS (columna Rxi-5MS) del *trans*-β-cariofileno presente en el AE de *Piper marginatum*.

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

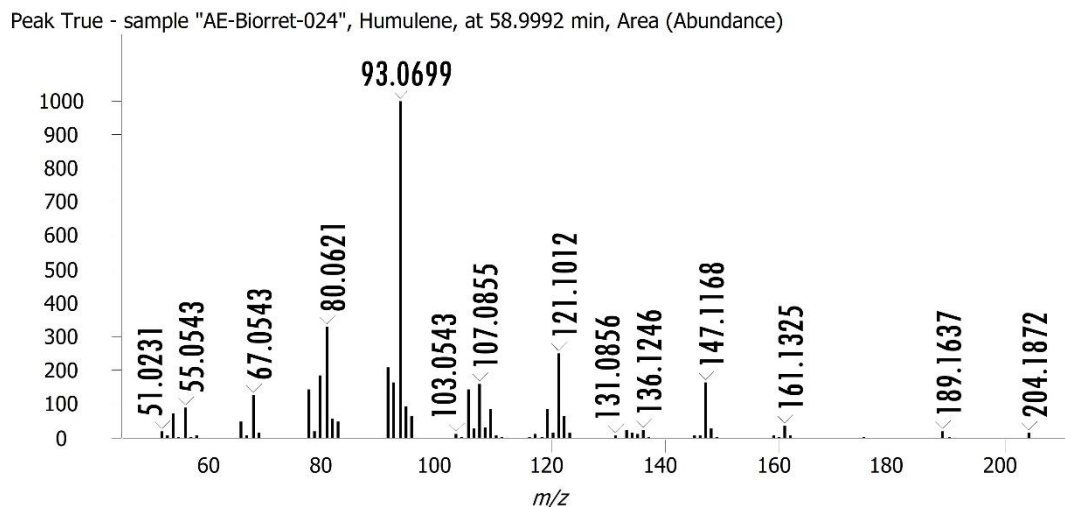


Figura A3-6. Espectro de masas obtenido por GC-ToF-HRMS (columna Rxi-5MS) del α -humuleno presente en el AE de *Piper marginatum*.

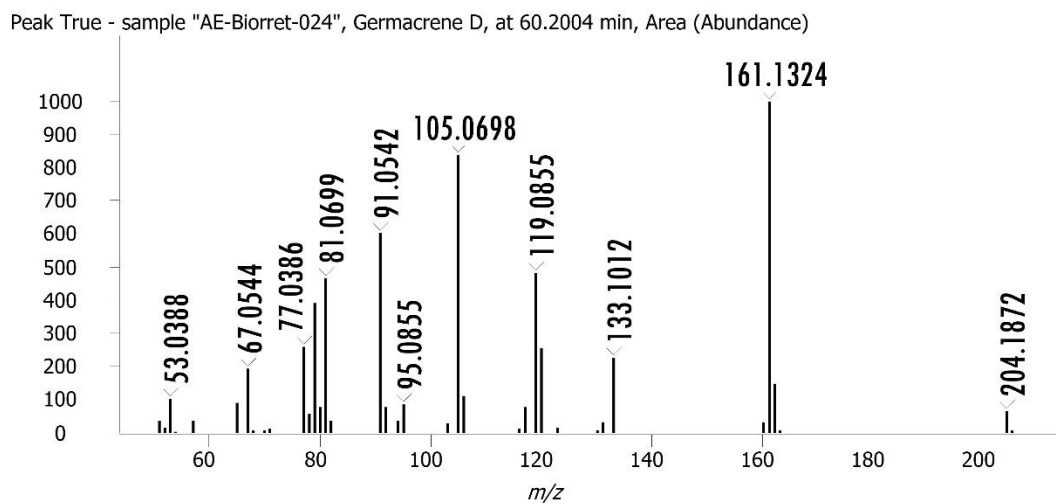


Figura A3-7. Espectro de masas obtenido por GC-ToF-HRMS (columna Rxi-5MS) del germacreno D presente en el AE de *Piper marginatum*.

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

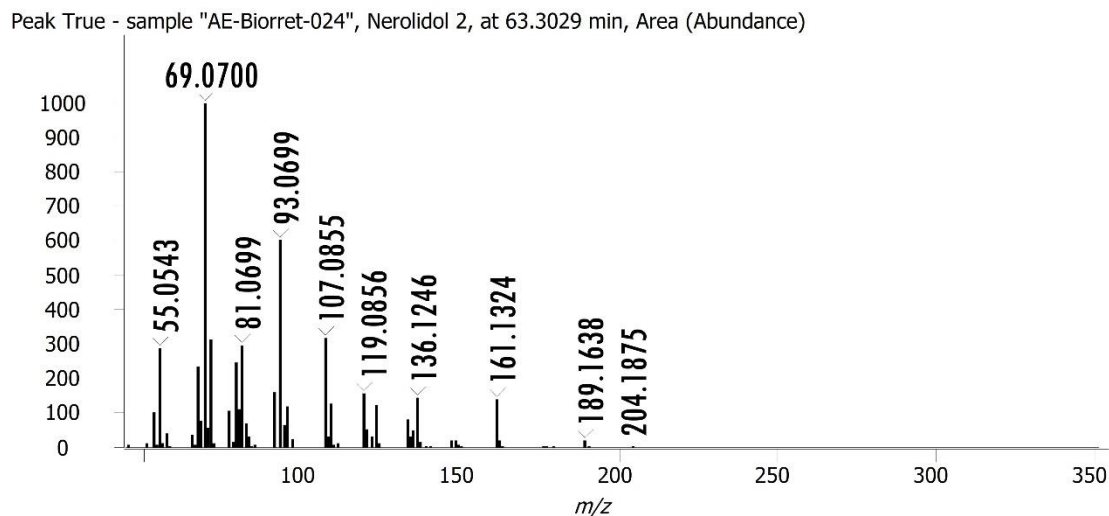


Figura A3- 8. Espectro de masas obtenido por GC-ToF-HRMS (columna Rxi-5MS) del *trans*-nerolidol presente en el AE de *Piper marginatum*.

Anexo 4. Curvas de calibración para la cuantificación de los compuestos presentes en el AE de *Piper marginatum*.

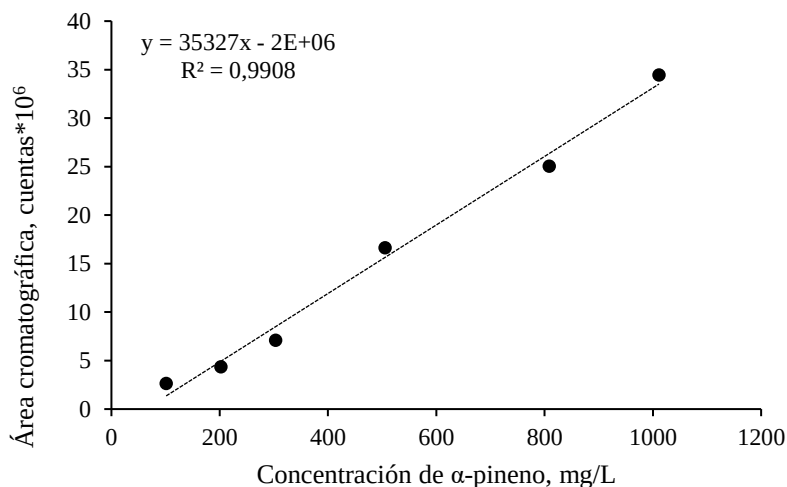


Figura A4-1. Curva de calibración de α -pineno obtenida por GC/FID para la cuantificación de hidrocarburos monoterpénicos, monoterpenos oxigenados y compuestos oxigenados no isoprenoide de menos de 15 átomos de carbono (nivel de concentración bajo).

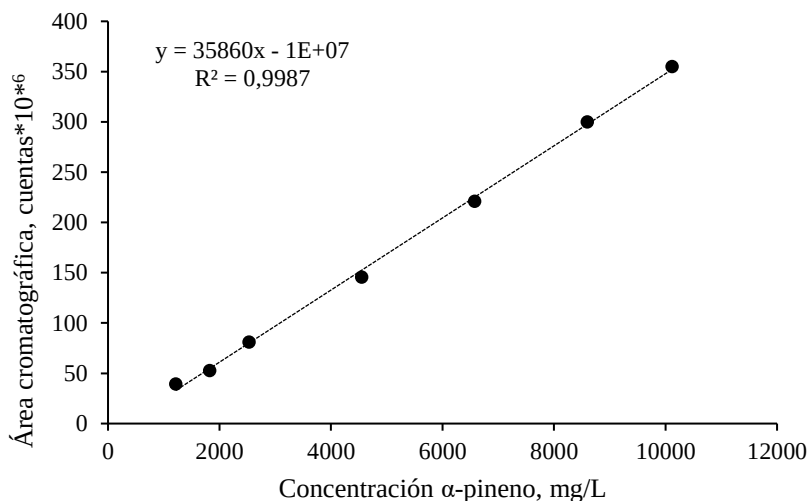


Figura A4-2. Curva de calibración de α -pineno obtenida por GC/FID para la cuantificación de hidrocarburos monoterpénicos, monoterpénos oxigenados y compuestos oxigenados no isoprenoide de menos de 15 átomos de carbono (nivel de concentración alto).

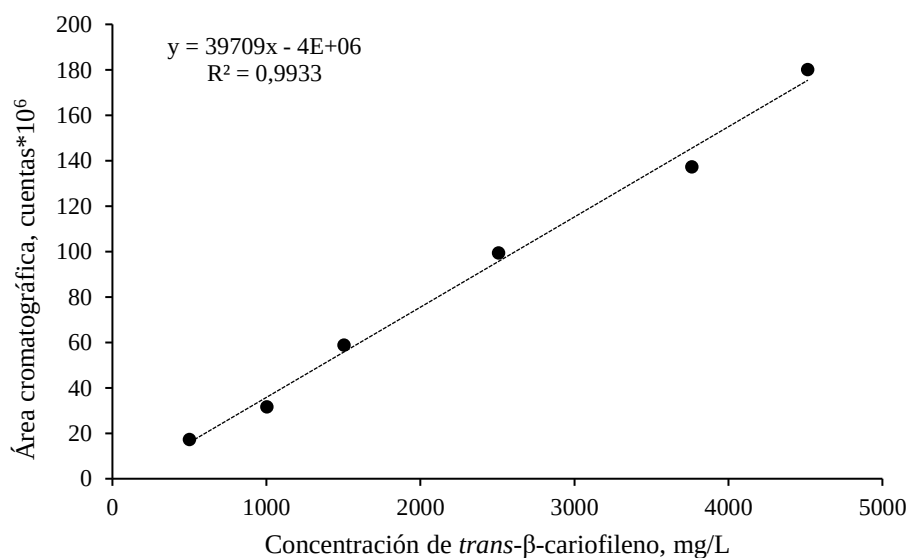


Figura A4-3. Curva de calibración de *trans*-β-cariofileno obtenida por GC/FID para la cuantificación de hidrocarburos sesquiterpénicos, sesquiterpenos oxigenados y compuestos oxigenados no isoprenoide de 15 átomos de carbono (nivel bajo).

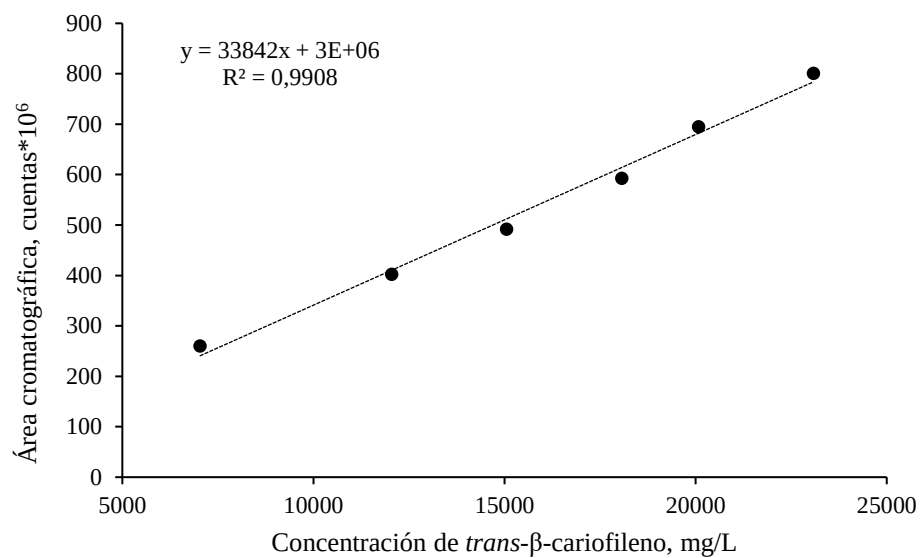


Figura A4-4. Curva de calibración *trans*-β-cariofileno obtenida por GC/FID para la cuantificación de hidrocarburos sesquiterpénicos, sesquiterpenos oxigenados y compuestos oxigenados no isoprenoide de 15 átomos de carbono (nivel alto).

Anexo 5. Espectros de masas obtenidos por GC/MS del extracto hidroalcohólico de *Psidium sartorianum*, obtenido del material vegetal después de su destilación.

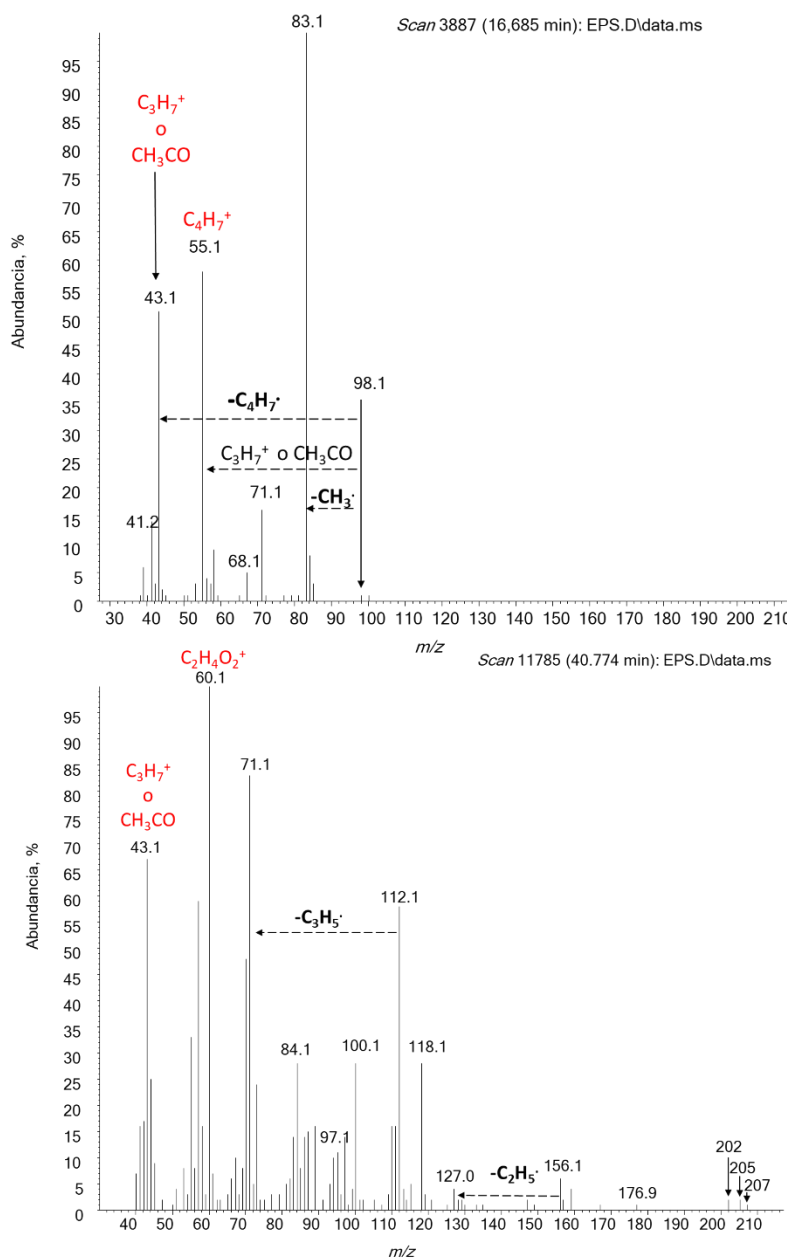


Figura A5-1. Espectros de masas de los compuestos no identificados por GC/MS en el extracto de *Psidium sartorianum*, obtenido del material vegetal después de su destilación, **A.** N° 10 ($t_R=16,7$ min) y **B.** 16 ($t_R=40,8$ min).

Anexo 6. Corrientes iónicas extraídas (EIC) obtenidas por UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-HRMS de los compuestos identificados de manera confirmatoria en el extracto de *Psidium sartorianum*, después de la destilación de la planta.

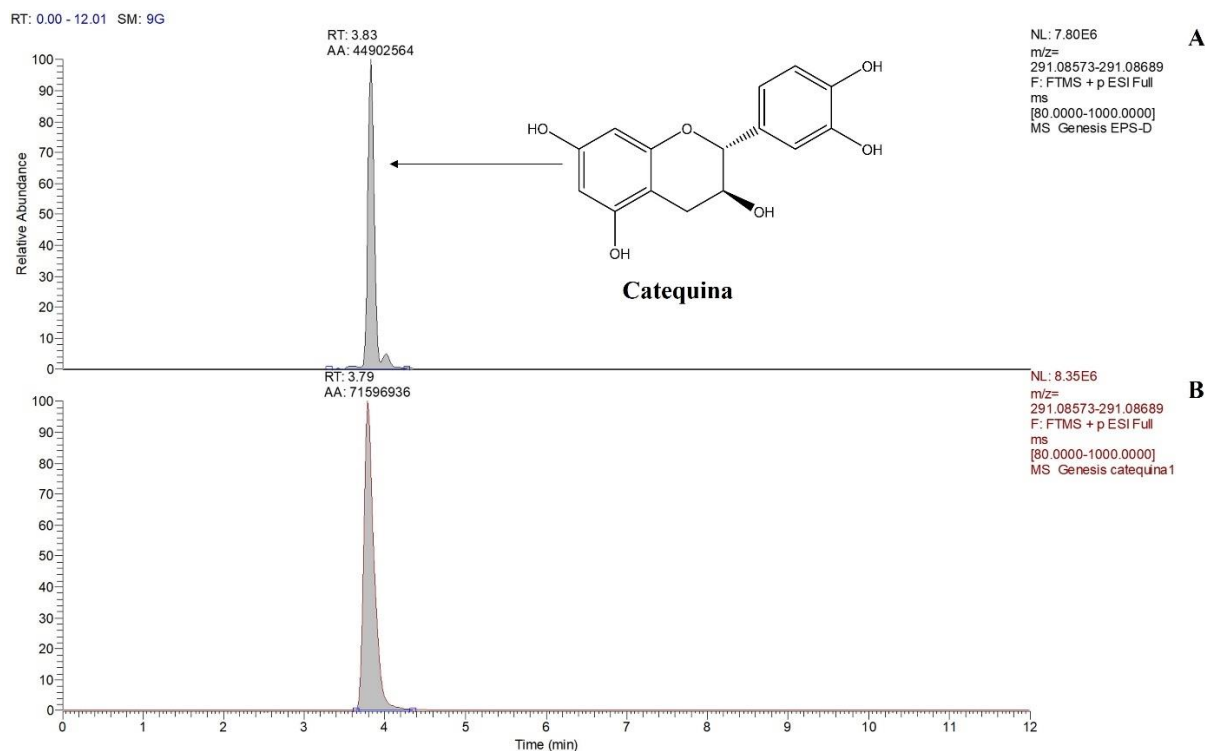


Figura A6- 1. Corrientes iónicas extraídas (EIC) obtenidas por UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-HRMS de **A.** Catequina presente en el extracto de *Psidium sartorianum*, después de la destilación de la planta y **B.** Sustancia patrón, catequina (*PhytoLab GmbH & Co.*, Vestenbergsgreuth, Alemania).

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

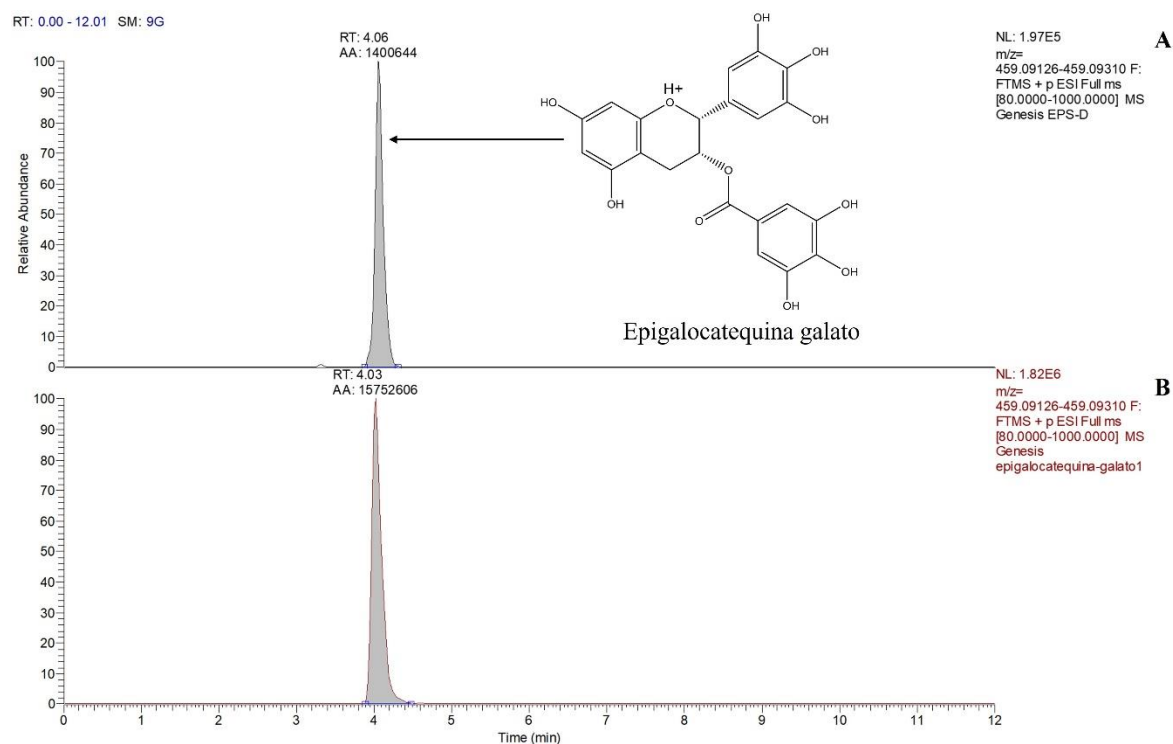


Figura A6- 2. Corrientes iónicas extraídas (EIC) obtenidas por UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-HRMS de **A.** Epigallocatequina galato presente en el extracto de *Psidium sartorianum*, después de la destilación de la planta y **B.** Sustancia patrón, epigallocatequina galato (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EE. UU.).

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

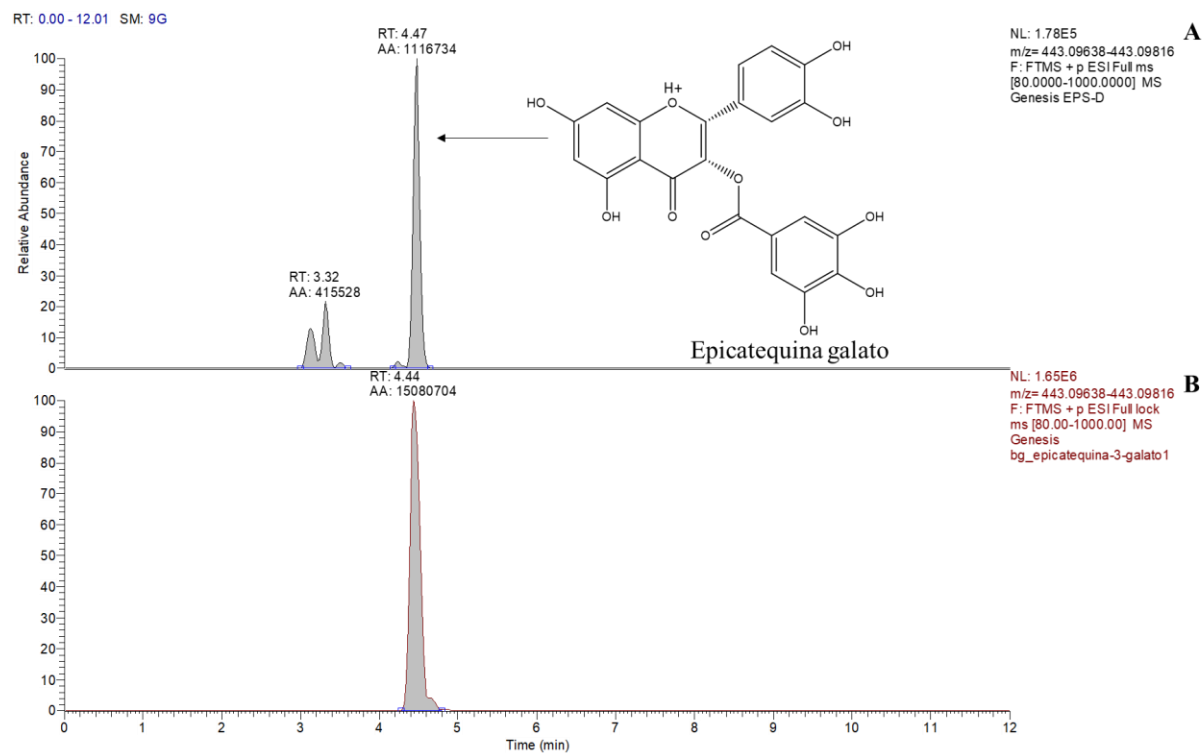


Figura A6- 3. Corrientes iónicas extraídas (EIC) obtenidas por UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-HRMS de **A.** Epicatequina galato presente en el extracto de *Psidium sartorianum*, después de la destilación de la planta y **B.** Sustancia patrón, epicatequina galato (*PhytoLab GmbH & Co.*, Vestenbergsgreuth, Alemania).

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

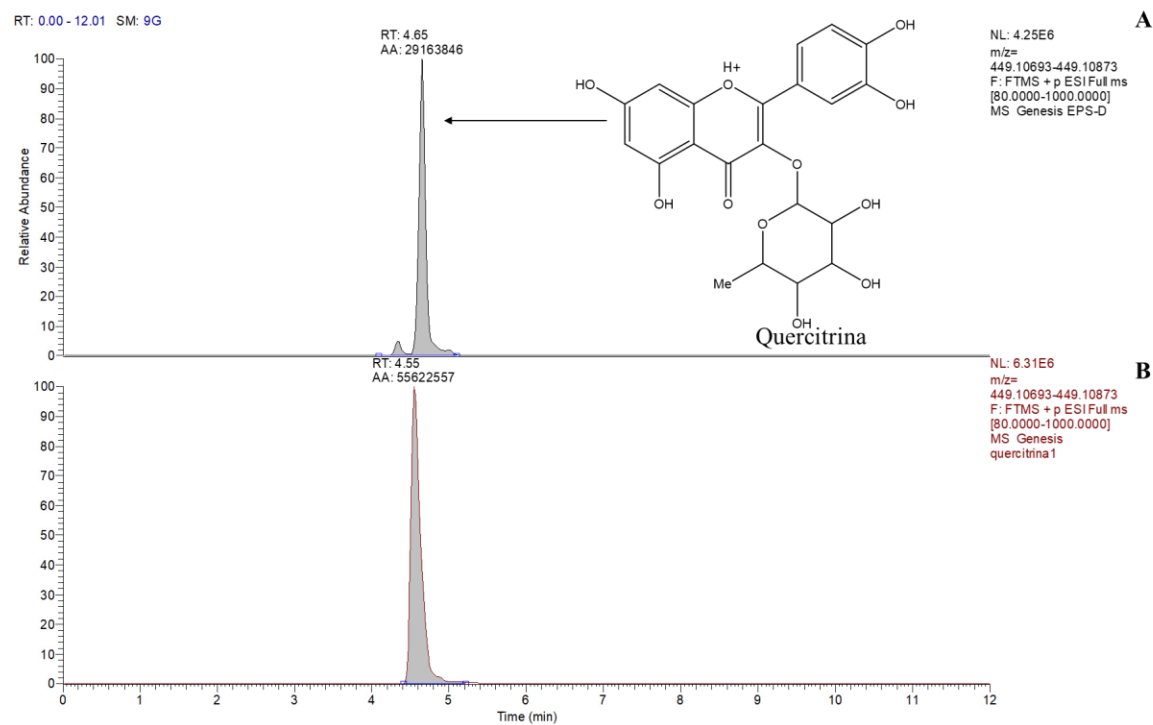


Figura A6- 4. Corrientes iónicas extraídas (EIC) obtenidas por UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-HRMS de **A.** Quercitrina presente en el extracto de *Psidium sartorianum*, después de la destilación de la planta y **B.** Sustancia patrón, quercitrina (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EE. UU.).

MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

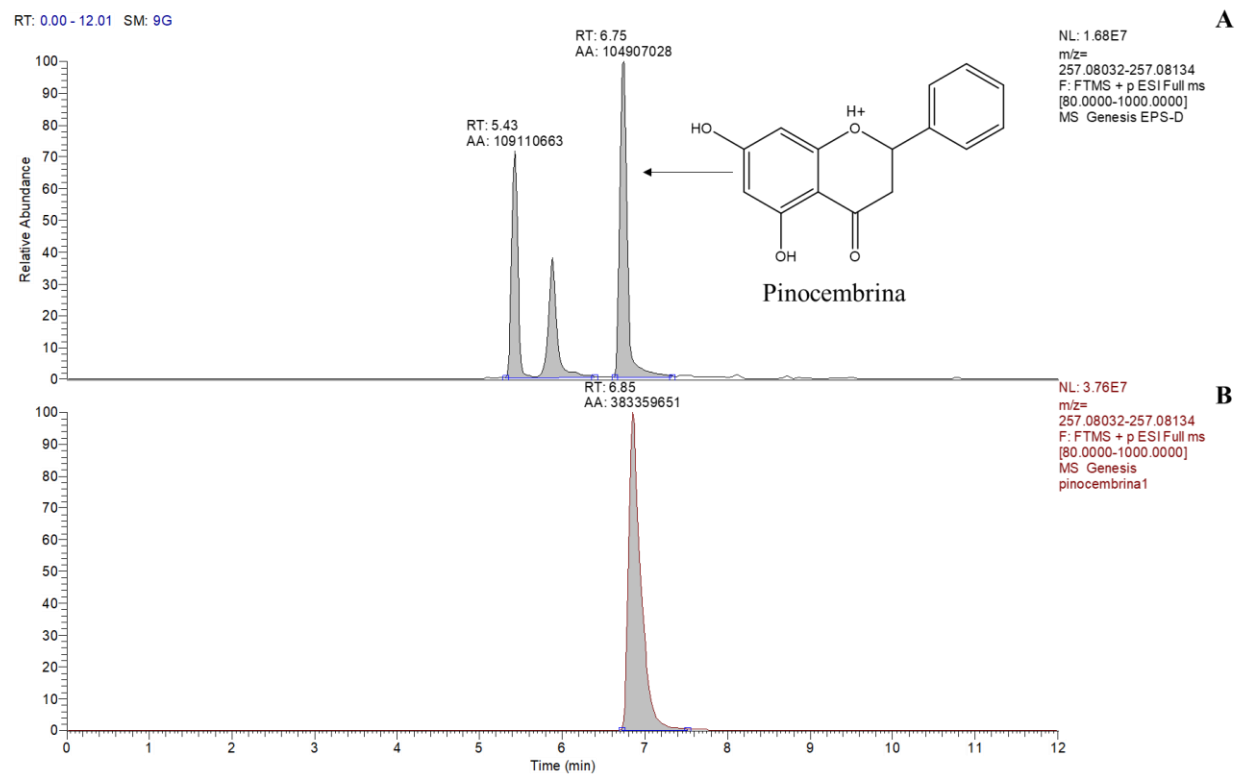
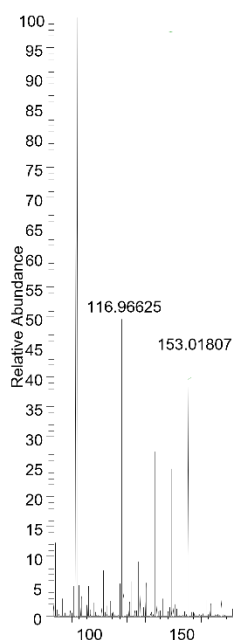


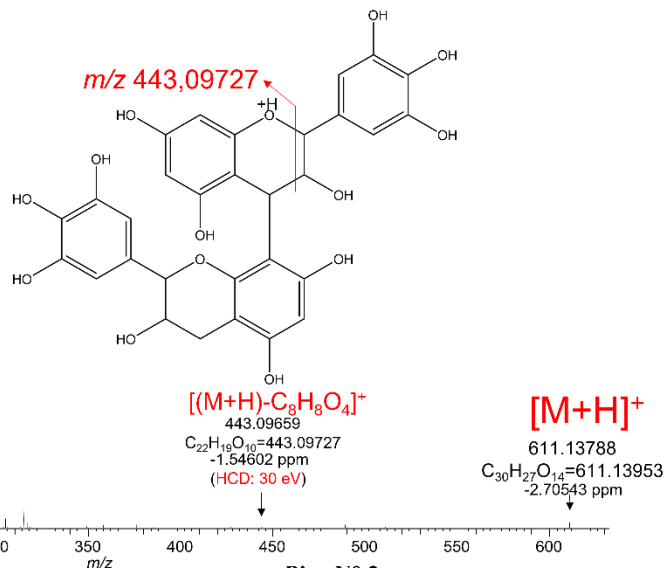
Figura A6- 5. Corrientes iónicas extraídas (EIC) obtenidas por UHPLC-ESI⁺-Orbitrap-HRMS de **A.** Pinocembrina presente en el extracto de *Psidium sartorianum*, después de la destilación de la planta y **B.** Sustancia patrón, (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EE. UU.).

Anexo 7. Espectros de masas obtenidos por [ESI⁺-HRMS] de los flavonoides identificados en el extracto de *Psidium sartorianum*, después de la destilación de la planta.

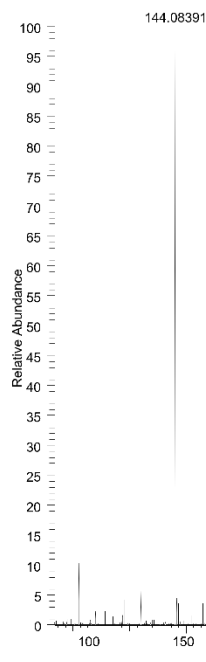
EPS-D#712 RT:3.13 AV:1 NL:1.76E7
F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.0000@hcd20.00 [80.0000-1000.0000]



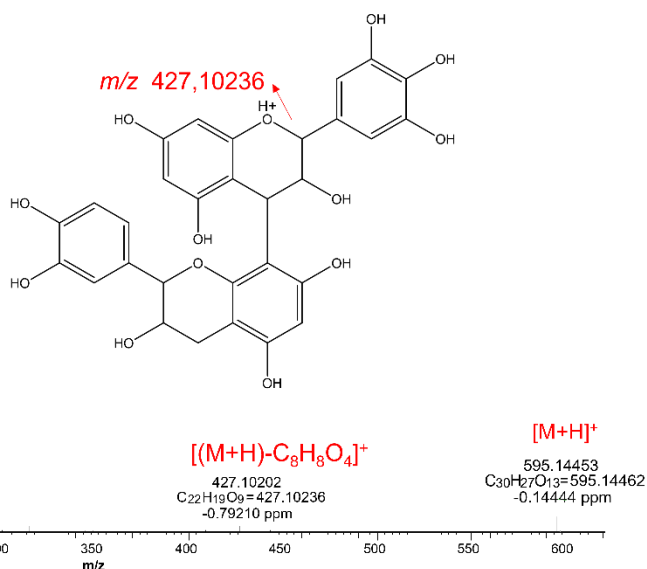
Pico N° 1
Galocatequina-(4α-8)-galocatecol
(HCD: 20 V)



EPS-D#781 RT:3.41 AV:1 NL:8.82E7
F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.0000@hcd10.00 [80.0000-1000.0000]

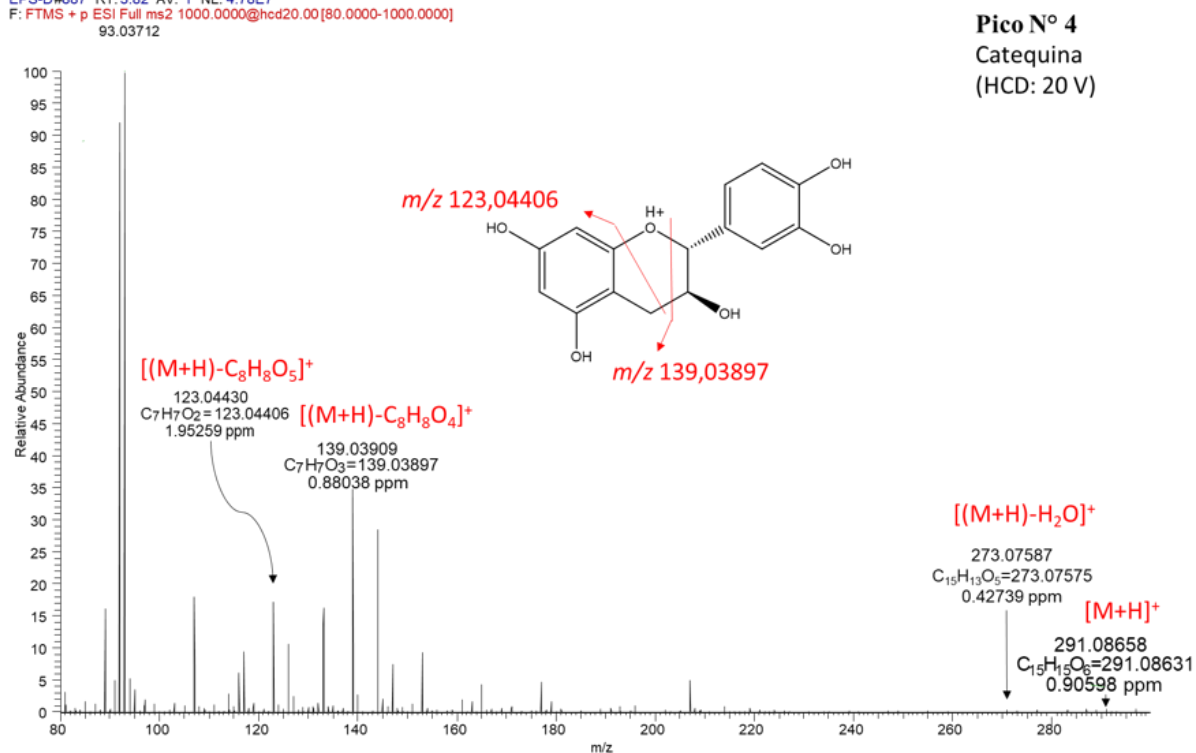
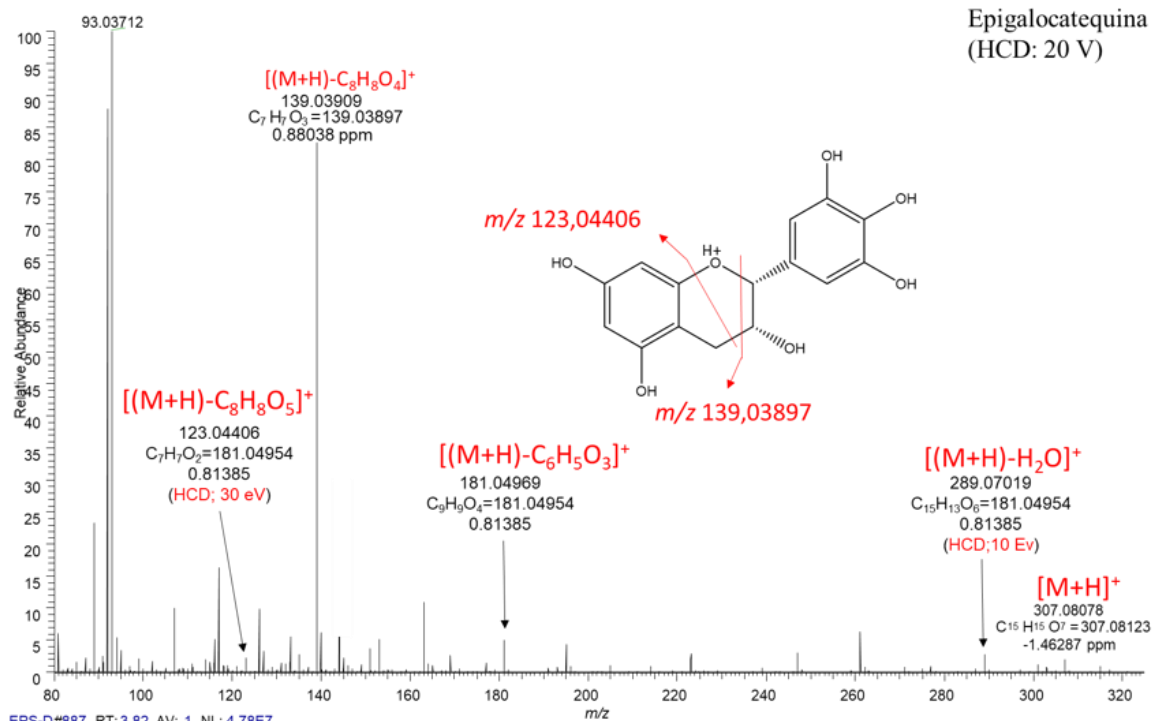


Pico N° 2
Galocatequin-(4α-8)- catequina
(HCD: 10 V)



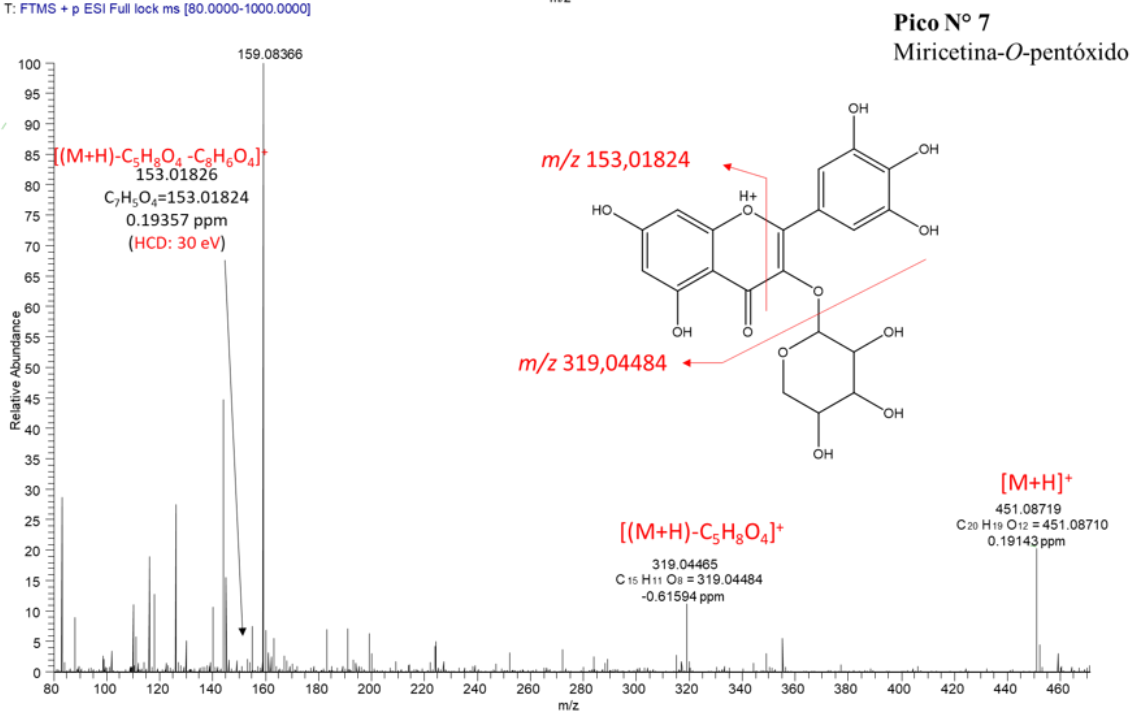
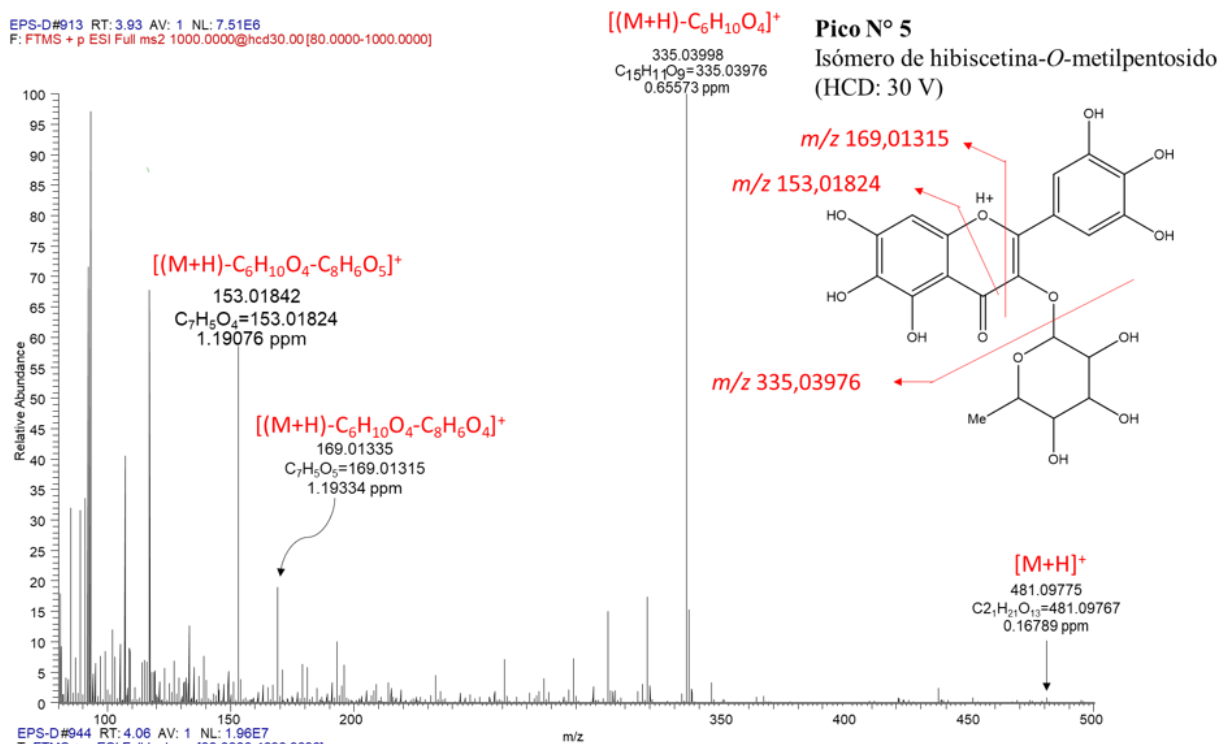
MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

EPS-D #787 RT: 3.43 AV: 1 NL: 3.58E7
F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.0000@hcd20.00 [80.0000-1000.0000]



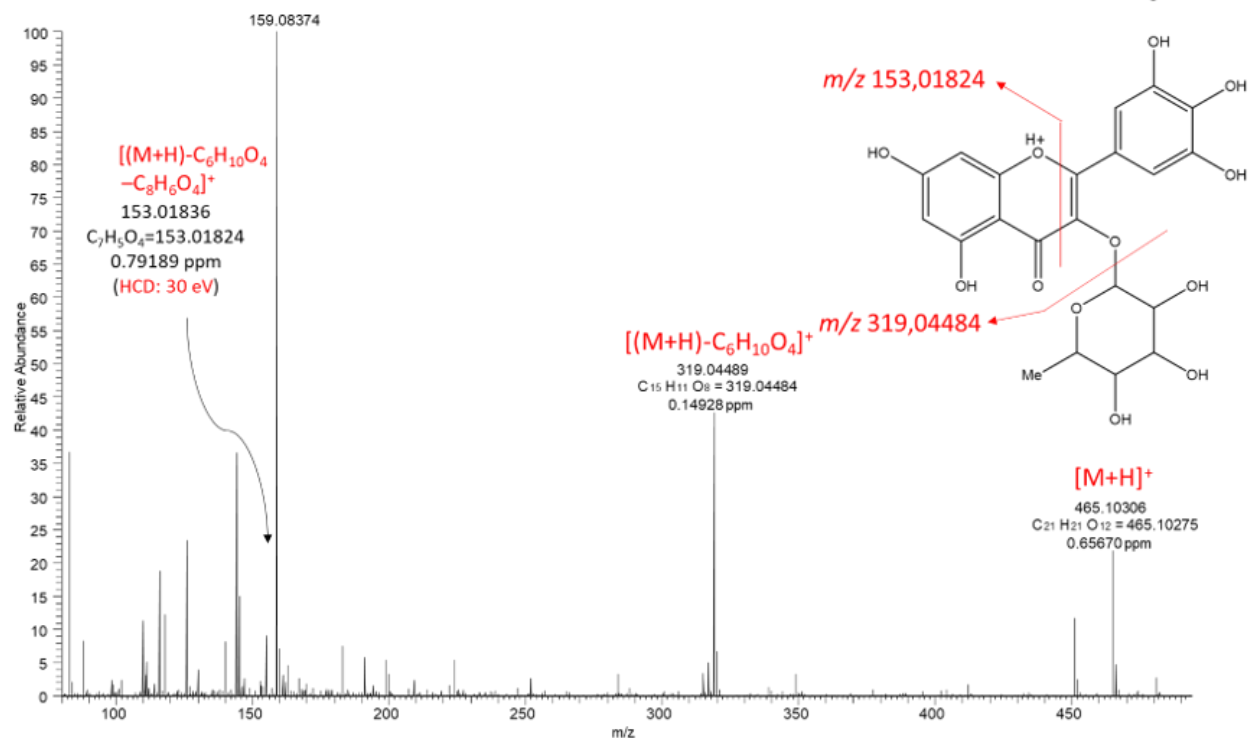
MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

EPS-D#913 RT: 3.93 AV: 1 NL: 7.51E6
F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.0000@hcd30.00[80.0000-1000.0000]

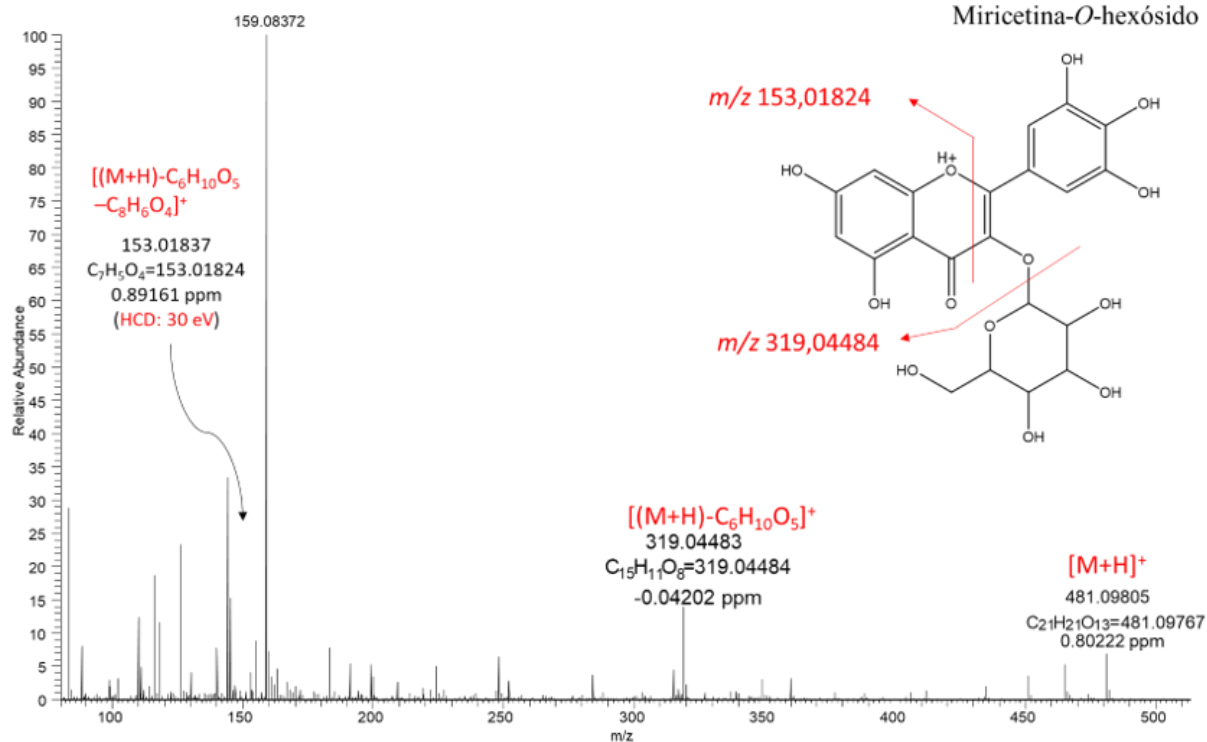


MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

EPS-D#964 RT: 4.14 AV: 1 NL: 2.20E7
T: FTMS + p ESI Full lock ms [80.0000-1000.0000]



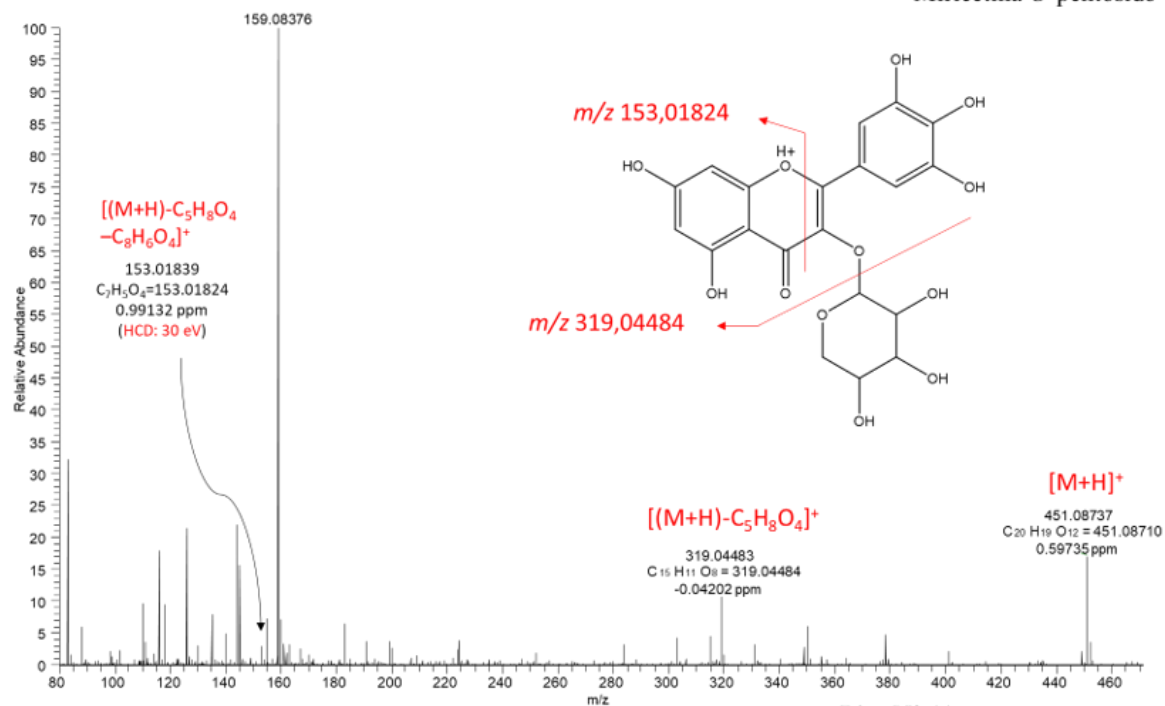
EPS-D#969 RT: 4.16 AV: 1 NL: 2.26E7
T: FTMS + p ESI Full lock ms [80.0000-1000.0000]



MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

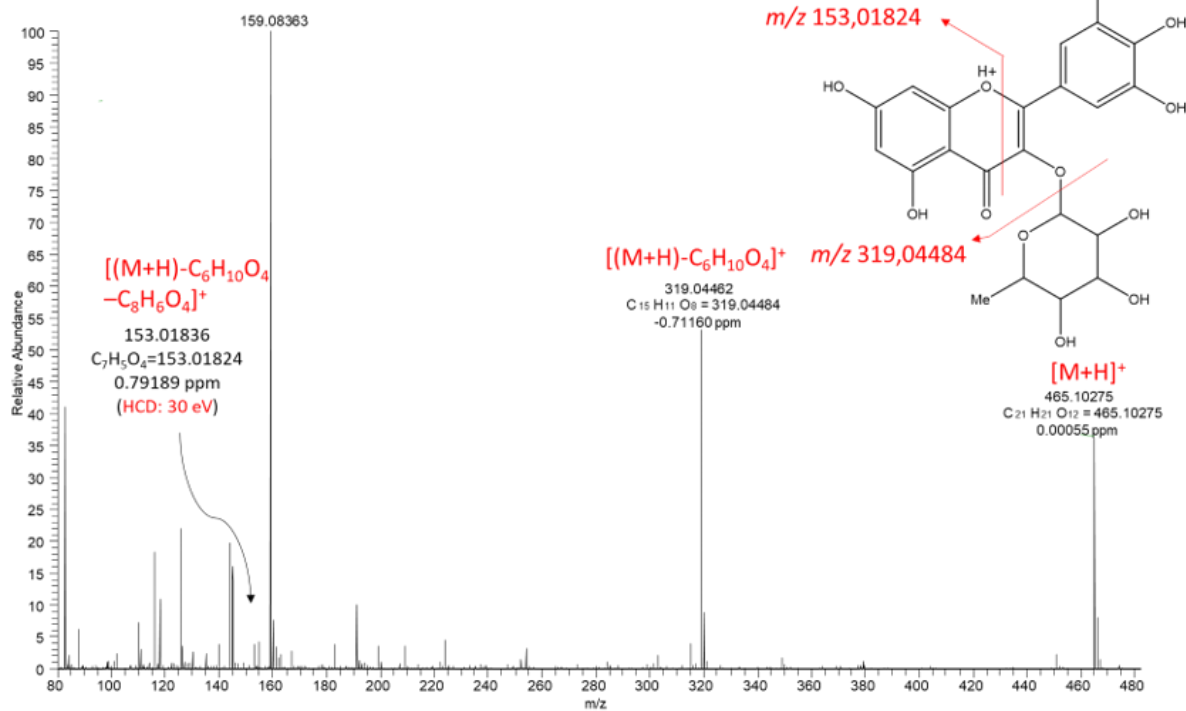
EPS-D#1009 RT: 4.33 AV: 1 NL: 2.90E7
T: FTMS + p ESI Full lock ms [80.0000-1000.0000]

Pico N° 10
Miricetina-*O*-pentósido



Pico N° 11
Isómero de miricetina-*O*-metilpentósido

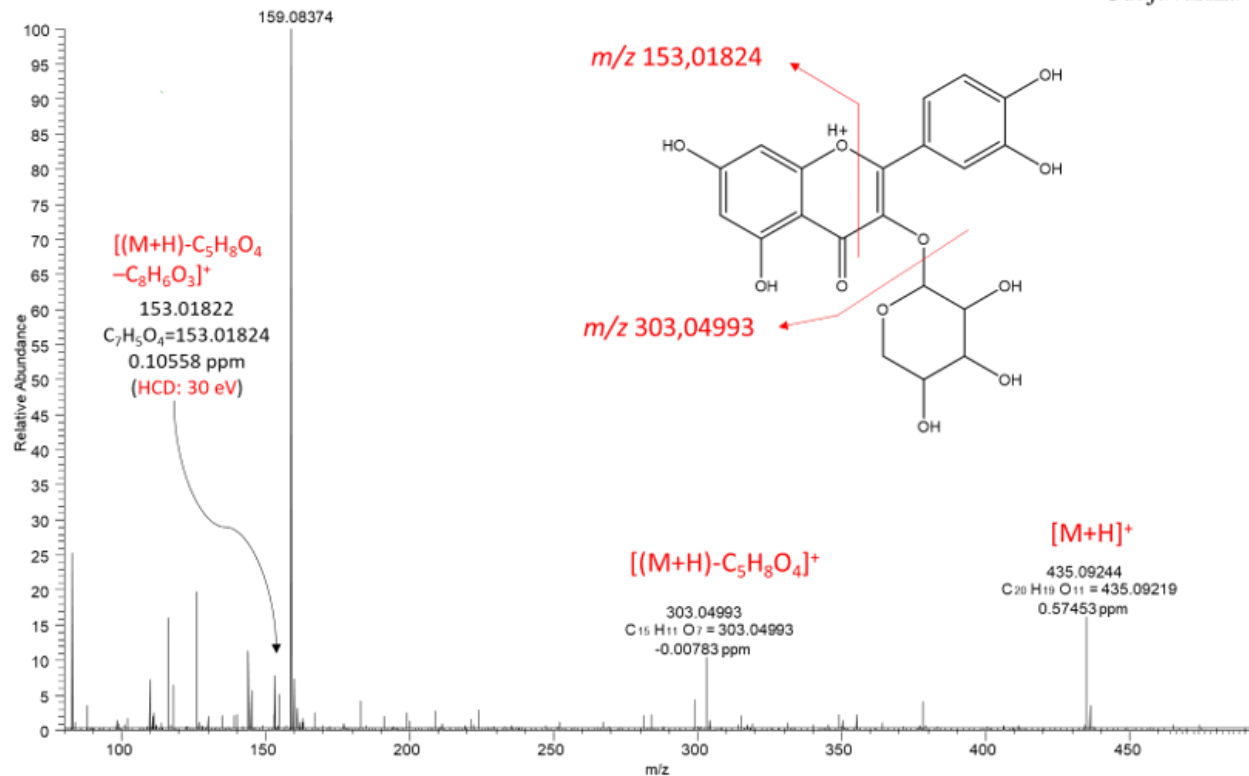
EPS-D#1024 RT: 4.39 AV: 1 NL: 2.76E7
T: FTMS + p ESI Full lock ms [80.0000-1000.0000]



MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

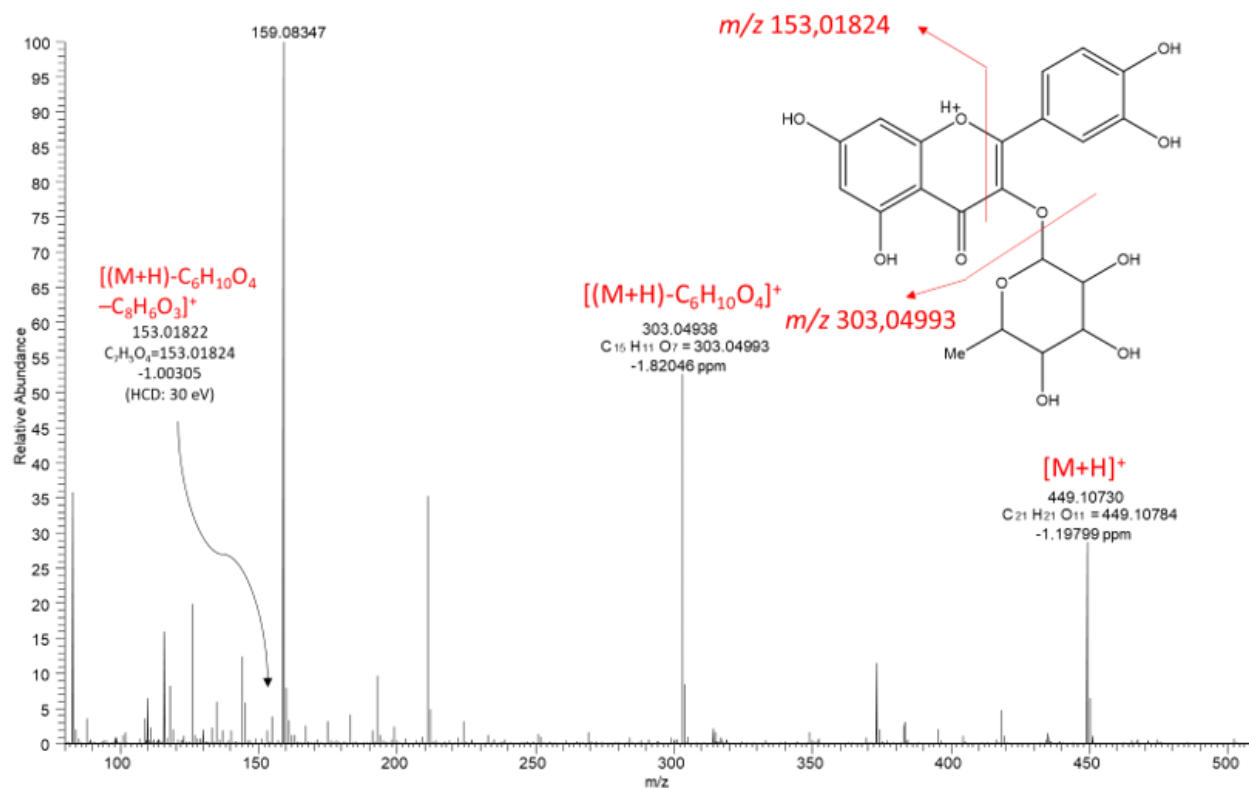
EPS-D#1069 RT: 4.57 AV: 1 NL: 4.37E7
T: FTMS + p ESI Full lock ms [80.0000-1000.0000]

Pico N° 13
Guajavarina



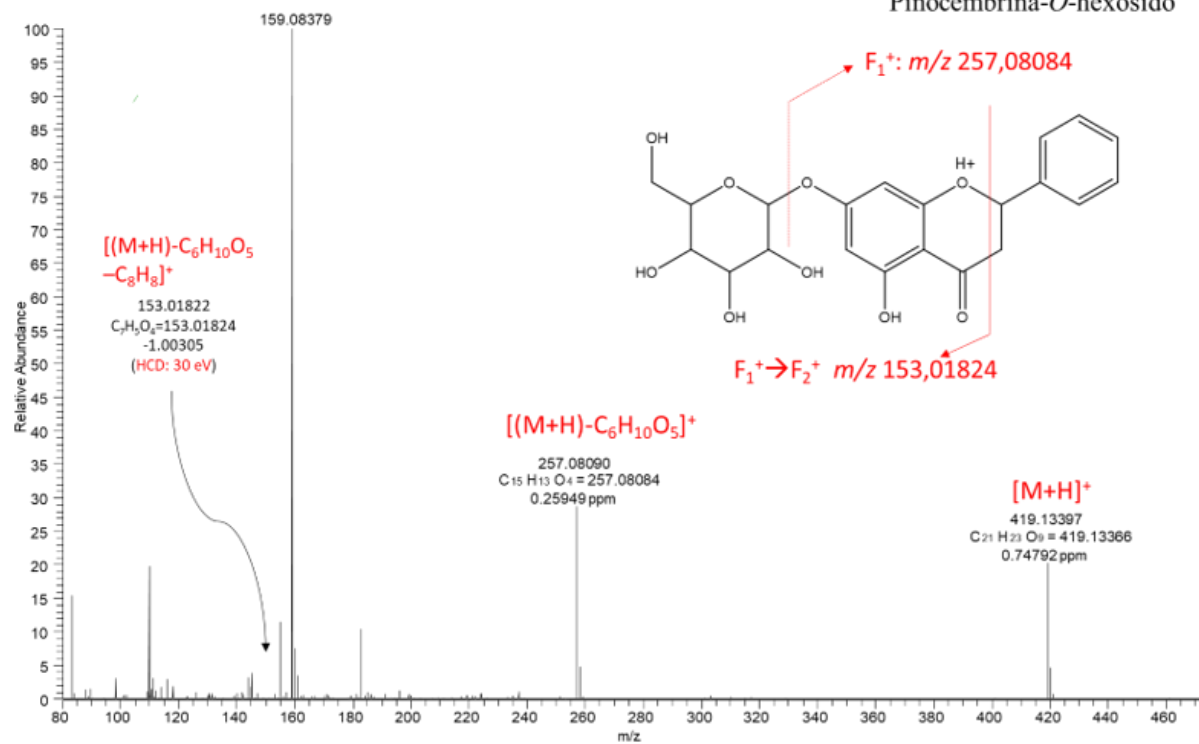
EPS-D#1089 RT: 4.65 AV: 1 NL: 3.86E7
T: FTMS + p ESI Full lock ms [80.0000-1000.0000]

Pico N° 14
Quercitrina



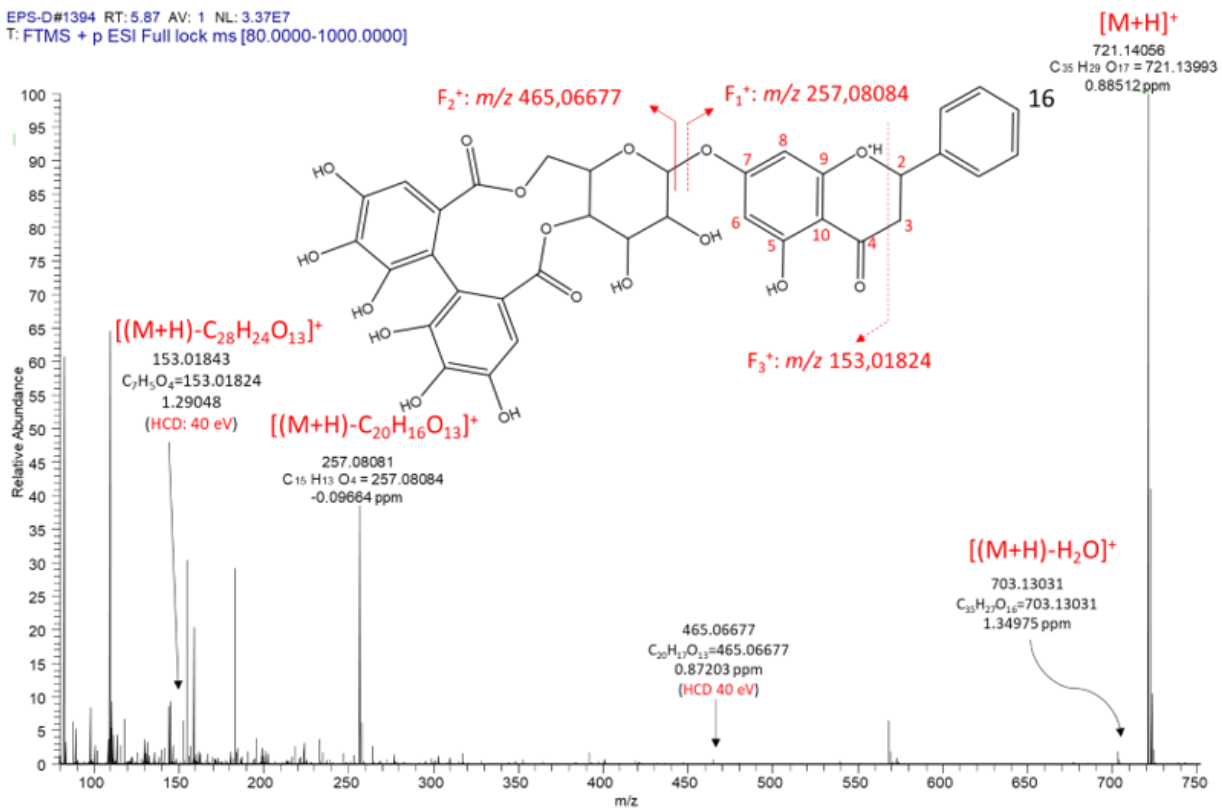
MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

EPS-D#1284 RT: 5.43 AV: 1 NL: 1.20E8
T: FTMS + p ESI Full lock ms [80.0000-1000.0000]



Pico N° 16
Pinocembrina-*O*-[4'',6''-hexahidroxi difenoil]-hexósido

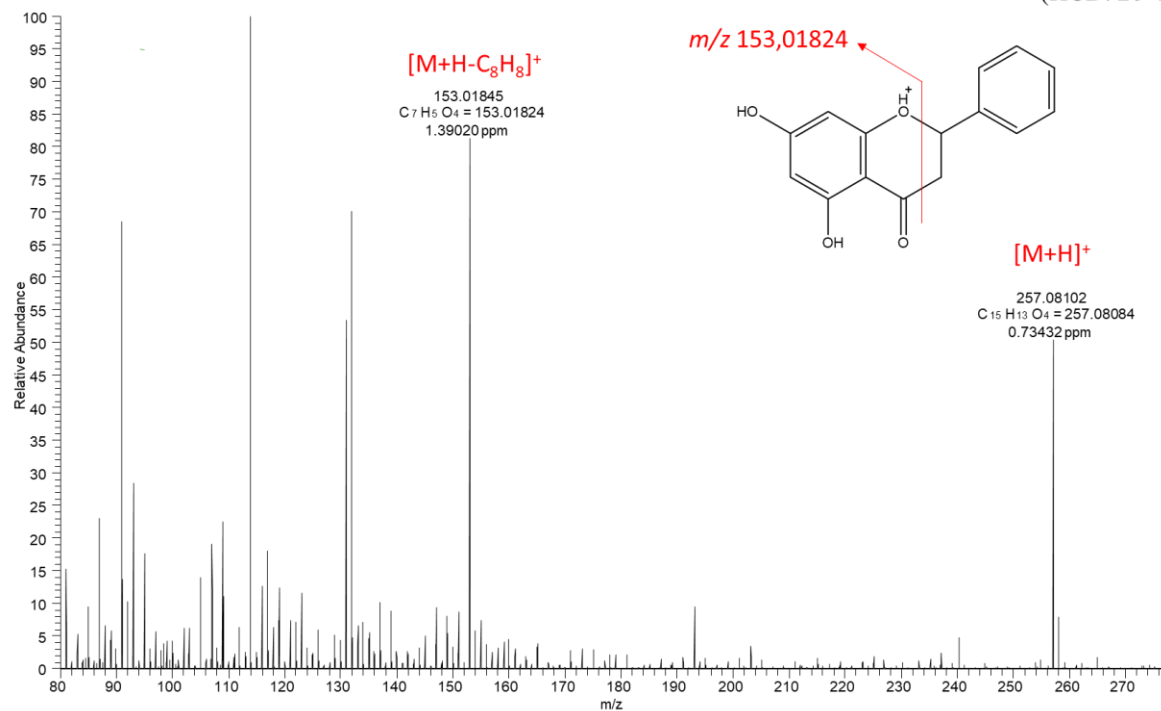
EPS-D#1394 RT: 5.87 AV: 1 NL: 3.37E7
T: FTMS + p ESI Full lock ms [80.0000-1000.0000]



MICROEMULSIÓN ANTIOXIDANTE

EPS-D#1617 RT: 6.76 AV: 1 NL: 7.05E6
F: FTMS + p ESI Full ms2 1000.0000@hcd20.00[80.0000-1000.0000]

Pico N.º 17
Pinocembrina
(HCD: 20 V)



Anexo 8. Máximos de absorción de los picos cromatográficos obtenidos en el análisis por HPLC-DAD del extracto de *Psidium sartorianum*, después de la destilación de la planta. Columna C₁₈ Gemini.

Tiempo, min	Compuesto	λ , nm
8,71	Ácido gálico	272 ^{max} , 228
13,44	Elagitanino	234 ^{max}
16,06	N.I.	234 ^{max}
17,78	N.I.	232 ^{max} , 280 ^h
18,86	Catequina	230 ^{max} , 278 ^h
19,75	N.I.	232 ^{max} , 272 ^h
20,72	N.I.	232 ^{max} , 272 ^h
32,01	N.I.	228 ^{max} , 274 ^h
34,00	Miricetina- <i>O</i> -pentósido	254 ^{max} , 362
34,71	Miricetina- <i>O</i> -pentósido	254 ^{max} , 360
35,36	Ácido elágico	254 ^{max} , 368
38,15	N.I.	226 ^{max} , 250, 358
38,57	Quercetrina	228 ^{max} , 256, 350
39,91	N.I.	226 ^{max} , 254, 364
43,31	N.I.	226 ^{max} , 266, 346
43,72	N.I.	226 ^{max} , 268, 334
44,58	Derivado de flavona	228 ^{max} , 284
50,37	Derivado de flavona	230 ^{max} , 282
58,31	Pinocembrina	294 ^{max} , 230
60,53	N.I.	326 ^{max} , 282

N.I.: no identificado.