

**ESTUDIO DEL USO DE MEZCLAS DE ACEITES ESENCIALES Y
EXTRACTOS DE *Lippia origanoides*, *Rosmarinus officinalis* Y *Salvia
officinalis* COMO ANTIOXIDANTES NATURALES EN CREMAS
COSMÉTICAS**

**VIVIANA ROCÍO ROJAS GÓMEZ
MARY ANDREA SANTAMARÍA TORRES**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2011

**ESTUDIO DEL USO DE MEZCLAS DE ACEITES ESENCIALES Y
EXTRACTOS DE *Lippia origanoides*, *Rosmarinus officinalis* Y *Salvia
officinalis* COMO ANTIOXIDANTES NATURALES EN CREMAS
COSMÉTICAS**

**VIVIANA ROCÍO ROJAS GÓMEZ
MARY ANDREA SANTAMARÍA TORRES**

Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Químico

**Directores:
Elena Stashenko, Química, Ph. D.
Jairo René Martínez, Químico, Ph. D.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2011

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Martha Gómez y Hernando Rojas y mi hermana Paola por su inmenso amor, por su dedicación y gran sacrificio que me ha permitido convertirme en la persona que ahora soy.

Viviana R.

A mis padres Ricardo y Ligia, y mi hermano tato a quienes más quiero por cuidar y querer siempre lo mejor para mí.

Mary A.

DEDICATORIA

A Dios, por guiar siempre mi camino y dotarme con la fuerza y sabiduría para tomar las mejores decisiones a lo largo no solo del presente trabajo sino de mi vida entera.

A la Dra. Elena E. Stashenko y al Dr. Jairo René por sus valiosas enseñanzas, por su paciencia y por su dedicación a lo largo del tiempo que forme parte del grupo de investigación.

A mis padres por ser mi bastón en los momentos difíciles, por creer en mis capacidades, por demostrarme que soy lo más importante en su vida.

A mi hermana Paola, por ser mi motor, mi motivo para seguir adelante, y superarme y ser un buen ejemplo para ella.

A mi mejor amiga y compañera de tesis, por ser mi confidente y estar siempre cuando la necesito, por impulsarme siempre a seguir adelante, por ser como una hermana para mí.

A Myriam O., por ser como una segunda madre para mí, por darme su cariño, confianza y creer siempre en mí.

A mis amigos Juanfer, Cori, Jenny, Andrés, Andrea G., Jorge Gaitán, Yuri, Laura M., Freys, por apoyarme, escucharme, acompañarme, por estar siempre ahí compartiendo tristezas y alegrías, aprendiendo de nuestros errores, y que formaron parte importante en la realización de la tesis.

Viviana R.

DEDICATORIA

Dedico este proyecto de tesis a Dios, por cuidarme y darme fortaleza para continuar.

A los Doctores Elena E. Stashenko y Jairo René Martínez por sus aportes académicos, apoyo oportuno y valiosísimas correcciones.

A mis padres y mi hermano, por su cariño y amor, porque siempre han velado por mi bienestar y educación siendo mí apoyo en todo momento, sin dudar nunca de mi inteligencia y capacidad.

A mi compañera de tesis, Vivi, por su amistad, su confianza hacia mí, por haberme hecho reír todo el tiempo y por su gran esfuerzo y tesón en momentos de decline y cansancio

Y mis amigos que de alguna forma, son parte de esta culminación: Cori, Andrea Gómez, Jenny Oviedo, Jorge Gaitán, Juan Fernando, Yuri, Freys, el profe Jose Carlos, la secre de química Myriam, Laura Carreño.

Mary P.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	24
1 ESTADO DEL ARTE	26
1.1 CIENCIOMETRÍA	26
1.2 PRODUCTOS COSMÉTICOS	30
1.2.1 Cremas cosméticas	31
1.3 ACEITES ESENCIALES	32
1.3.1 <i>Rosmarinus officinalis</i>	32
1.3.2 <i>Lippia origanoides</i>	35
1.3.3 <i>Salvia officinalis</i>	36
1.4 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES	38
1.4.1 Hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHd)	38
1.4.2 Extracción con fluido supercrítico (CO ₂)	39
1.5 SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES	40
1.5.1 Cromatografía de gases	40
1.5.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	41
1.6 RADICALES LIBRES	42
1.6.1 Procesos de producción de radicales libres	42
1.7 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	43
1.8 ANTIOXIDANTES	46
1.9 MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	46
1.10 PEROXIDACIÓN LIPÍDICA	47
1.11 MONITOREO DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA	50
1.12 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	51
1.13 DERIVATIZACIÓN EN SPME	55
1.14 ALDEHÍDOS VOLÁTILES	57
2 PARTE EXPERIMENTAL	59
2.1 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS DE LABORATORIO	59

2.2	PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN	61
2.2.1	Obtención de aceites esenciales por el método MWHD	61
2.2.2	Obtención de extractos por el método SFE (CO ₂)	62
2.3	PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS POR GC-MS	63
2.3.1	Análisis GC en columna apolar	64
2.3.2	Identificación	65
2.3.3	Cuantificación	66
2.4	VALIDACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO	67
2.4.1	Análisis por GC/ECD del derivado PFPH del hexanal	67
2.4.2	Determinación de la reproducibilidad de las áreas cromatográficas del derivado PFPH del hexanal	68
2.5	DISEÑO DE LOS SISTEMAS LIPÍDICOS PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	68
2.5.1	Generación del hexanal en los sistema lipídico I y II sometido a la radiación UVA	69
2.5.2	Derivación y extracción simultánea por HS-SPME del hexanal sobre la fibra	70
2.6	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE <i>IN-VITRO</i> DE LOS AE DE <i>Salvia officinalis</i> , <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Lippia origanoides</i>	70
2.6.1	Estudio de la actividad antioxidante <i>in-vitro</i> de los AE y extractos	70
2.6.2	Estudio de la posible interacción entre dos posibles antioxidantes	71
3	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	72
3.1	CARACTERIZACIÓN DE LOS AE Y EXTRACTOS	72
3.2	ANÁLISIS POR GC/ECD DEL DERIVADO PFPH DEL HEXANAL	86
3.3	ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE LOS AE Y EXTRACTOS EN ESTUDIO	87
3.3.1	Evaluación del Sistema Lipídico I, utilizando antioxidantes de origen natural y sintético	87

3.3.2	Evaluación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> de los aceites esenciales y extractos en el Sistema Lipídico I	88
3.3.3	Estudio de la interacción de dos antioxidantes en el Sistema Lipídico I	91
3.3.4	Evaluación del Sistema Lipídico II, utilizando antioxidantes de origen natural y sintético	95
3.3.5	Evaluación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> de los aceites esenciales y extractos en el sistema lipídico II	96
3.3.6	Estudio de la posible interacción entre dos antioxidantes	99
4	CONCLUSIONES	104
5	RECOMENDACIONES	105
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
	BIBLIOGRAFÍA	114
	ANEXOS	124

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Composición de la crema cosmética (o/w) empleada en este estudio.	32
Tabla 2. Principales metabolitos secundarios presentes en el AE de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. de diferentes orígenes.	34
Tabla 3. Principales metabolitos secundarios presentes en el AE de <i>Lippia origanoides</i> procedente de diferentes orígenes.	36
Tabla 4. Principales metabolitos secundarios presentes en el AE de <i>Salvia officinalis</i> L.	38
Tabla 5. Especies reactivas derivadas del oxígeno.	44
Tabla 6. Lista de reactivos y solventes usados en el presente estudio.	59
Tabla 7. Condiciones usadas para llevar a cabo la extracción de metabolitos secundarios por SFE.	63
Tabla 8. Rendimientos (%) de los AE y extractos obtenidos por las técnicas MWHD y SFE, respectivamente.	72
Tabla 9. Compuestos principales (>1.0%) en el AE obtenido de hojas <i>L. origanoides</i> por MWHD.	74
Tabla 10. Compuestos principales (>1.0%) en el extracto obtenido de hojas <i>L. origanoides</i> por SFE (CO ₂).	75
Tabla 11. Compuestos principales (>1.0%) en el AE de <i>Salvia officinalis</i> obtenido por MWHD de sus hojas.	77
Tabla 12. Compuestos principales (>1.0%) en el extracto de <i>Salvia officinalis</i> obtenido SFE (CO ₂) de sus hojas.	79
Tabla 13. Compuestos principales (>1.0%) en el AE de <i>Rosmarinus officinalis</i> por MWHD de sus hojas.	82

Tabla 14.	Compuestos principales (>1.0%) en el extracto de <i>Rosmarinus officinalis</i> obtenido por SFE (CO ₂) de sus hojas.	84
Tabla 15.	Reproducibilidad de los t _R del derivado PFPH en la solución-patrón de hexanal y en los diferentes Sistemas Lipídicos estudiados.	86
Tabla 16.	Efecto protector de la vitamina E y del BHT, en el Sistema Lipídico I (aceite de girasol).	88
Tabla 17.	Efecto protector de los aceites esenciales en estudio, en el Sistema Lipídico I (aceite de girasol).	89
Tabla 18.	Efecto protector de los extractos en estudio en el Sistema Lipídico I (aceite de girasol).	91
Tabla 19.	Actividad antioxidante de las mezclas de aceites esenciales en el Sistema Lipídico I, evaluada a través de medición del hexanal.	92
Tabla 20.	Actividad antioxidante medida a través de la cuantificación del hexanal de las mezclas de extractos, empleadas en el Sistema Lipídico I.	94
Tabla 21.	Efecto protector de la vitamina E y BHT, en el Sistema Lipídico II [crema cosmética (o/w)] sometido a radiación a la luz UVA.	96
Tabla 22.	Efecto protector de los aceites esenciales bajo estudio, en el Sistema Lipídico II [crema cosmética, (o/w)].	97
Tabla 23.	Efecto protector de los extractos bajo estudio, en el Sistema Lipídico II [crema cosmética, (o/w)].	98
Tabla 24.	Efecto protector de las mezclas de AE, en el Sistema Lipídico II [crema cosmética (o/w)].	99
Tabla 25.	Efecto protector de las mezclas de extractos, en el Sistema Lipídico II [crema cosmética(o/w)].	101

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Número de publicación en función del tiempo y la ecuación de búsqueda: $t=$ (antioxidant*) refined by: $t=$ (cosmetic) and $t=$ (essential oil); Fuente: <i>ISI Web of Knowledge</i> . Fecha de consulta: 13/02/2011.	27
Figura 2. Número de publicaciones sobre antioxidantes y aceites esenciales, en función del tiempo. Ecuación de búsqueda: $t=$ (antioxidant*) refined by: $t=$ (essential oil); Fuente: <i>ISI Web of Knowledge</i> . Fecha de consulta: 13/02/2011.	28
Figura 3. Número de publicaciones sobre antioxidantes y aceites esenciales, por países, durante la última década. Ecuación de búsqueda: $t=$ (antioxidant*) refined by: $t=$ (essential oil). Fuente: <i>ISI Web of Knowledge</i> . Fecha de consulta: 13/02/2011.	29
Figura 4. Planta de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. Fotografía tomada en CENIVAM el 17 de noviembre de 2010.	33
Figura 5. Planta de <i>Lippia origanoides</i> . Fotografía tomada en CENIVAM el 17 de noviembre de 2010.	35
Figura 6. Planta de <i>Salvia officinalis</i> L. Fotografía proyecto “Fortalecimiento de las unidades productivas de aceites esenciales de climas templado y frío y productos de valor agregado en Santander” (CENIVAM).	37
Figura 7. Reacción de Fenton con óxidos de nitrógeno.	43
Figura 8. Reacción de Fenton con iones de metales de transición.	43
Figura 9. Formación de radicales de ácidos grasos ($R\cdot$) por abstracción de un hidrógeno $H\cdot$, iniciadas por ERO o cualquier RL.	47

Figura 10.	Estabilización de los radicales de ácidos grasos (R [•]) por medio de rearrreglos intramoleculares y formación de peróxidos por reacción de éstos radicales con oxígeno.	47
Figura 11.	Ataque de un radical peróxido (ROO [•]) a una molécula vecina, abstrayendo H [•] y propagando la reacción en cadena.	48
Figura 12.	Formación de radicales alcoxilo (RO [•]) en presencia de metales divalentes, en el proceso de finalización de la peroxidación lipídica.	48
Figura 13.	Productos finales generados durante el proceso de peroxidación lipídica.	49
Figura 14.	Generación del hexanal durante la oxidación del ácido linoléico.	50
Figura 15.	Esquema del dispositivo comercial de SPME. Fotografía tomada en el Laboratorio de Cromatografía de la UIS.	52
Figura 16.	Diferentes modos de extracción por la técnica SPME.	53
Figura 17.	Reacción de derivación de los aldehídos con pentaflúorfenilhidracina (PFPH).	58
Figura 18.	Montaje para hidrodestilación asistida por microondas. Fotografía tomada en CENIVAM, el 17 de Noviembre de 2010.	62
Figura 19.	Extractor SFE-2000 (Thar technologies, Pittsburgh EE.UU.). Fotografía tomada en CENIVAM, el 17 de Noviembre de 2010.	63
Figura 20.	Cromatógrafo de gases <i>Agilent Technologies 6890 Plus Series GC System</i> acoplado a un detector selectivo de masas <i>Agilent Technologies 5973 Network</i> , equipado con un puerto de inyección <i>split/splitless</i> y un inyector automático <i>Agilent 7863</i> . Fotografía tomada en el Laboratorio de Cromatografía de la UIS, el 17 de noviembre de 2010.	65

- Figura 21.** Cromatógrafo de gases HP-5890 *Series II*, equipado con un puerto de inyección *split/splitless*, columna HP-5 (30 m, 0.25 mm di, 0.25 μ m, fase estacionaria: 5 % fenil poli(metilsiloxano)) y detector de captura de electrones (ECD, ^{63}Ni), un inyector automático HP 7683, y un sistema de datos HP *ChemStation* HP Rev. A.06.03. Fotografía tomada en el Laboratorio de Cromatografía de la UIS, el 17 de noviembre de 2010. 67
- Figura 22.** Reactor UVA utilizado para el estudio de la peroxidación lipídica en los sistemas estudiados. Fotografía tomada en CENIVAM, el 17 de septiembre de 2010. 69
- Figura 23.** Perfiles cromatográficos típicos del AE y extracto obtenidos de hojas de *Lippia origanoides*. **A.** MWHD. **B.** SFE. Columna DB-5 (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV). 73
- Figura 24.** Perfiles cromatográficos típicos del AE y extracto obtenidos de hojas de *Salvia officinalis*. **A.** MWHD. **B.** SFE. Columna DB-5 (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV). 76
- Figura 25.** Perfiles cromatográficos típicos del AE y extracto obtenidos de hojas de *Rosmarinus officinalis*. **A.** MWHD. **B.** SFE. Columna DB-5 (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV). 81
- Figura 26.** Evaluación del efecto protector de la vitamina E y del BHT, contra la peroxidación lipídica del aceite de girasol, acelerada por la radiación UVA. 88
- Figura 27.** Evaluación del efecto protector de los AE en estudio, contra la peroxidación lipídica del aceite de girasol, acelerada por la radiación UVA 90
- Figura 28.** Evaluación del efecto protector de los extractos en estudio, contra la peroxidación lipídica del aceite de girasol, acelerada por la radiación UVA. 91
- Figura 29.** Evaluación del efecto protector de las mezclas de AE contra la peroxidación lipídica del aceite de girasol, 92

acelerada por la radiación UVA.

- | | | |
|-------------------|--|-----|
| Figura 30. | Evaluación del efecto protector de las mezclas de extractos contra la peroxidación lipídica del aceite de girasol, acelerada por la radiación UVA. | 94 |
| Figura 31. | Evaluación del efecto protector de la vitamina E y BHT, contra la peroxidación lipídica de la crema cosmética (o/w), acelerada por la radiación UVA. | 96 |
| Figura 32. | Evaluación del efecto protector de AE, contra la peroxidación lipídica de la crema cosmética (o/w), acelerada por la radiación UVA. | 97 |
| Figura 33. | Evaluación del efecto protector de extractos, contra la peroxidación lipídica de la crema cosmética (o/w), sometida a la radiación UVA. | 98 |
| Figura 34. | Evaluación del efecto protector de las mezclas de los AE, contra la peroxidación lipídica del Sistema Lipídico II, sometido a la radiación UVA. | 100 |
| Figura 35. | Evaluación del efecto protector de extractos, contra la peroxidación lipídica de la crema cosmética (o/w), acelerada por la radiación UVA. | 101 |

LISTA DE ANEXOS

	pág.
ANEXO A Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD (Columna HP-5, 30 m), del hexanal, analizado en forma de su derivado hidrazónico, y generado en los Sistemas Lipídicos irradiados en el reactor UVA.	114
ANEXO B Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD (Columna HP-5, 30 m), donde se muestra el efecto protector en el Sistema Lipídico I (aceite de girasol), de los antioxidantes de referencia, sometido a la irradiación con la luz UVA.	116
ANEXO C Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD (Columna HP-5, 30 m), donde se muestra el efecto protector de los AE en estudio en el Sistema Lipídico I (aceite de girasol), sometido a la irradiación con la luz UVA.	118
ANEXO D Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD (Columna HP-5, 30 m), donde se muestra el efecto protector en el Sistema Lipídico I (aceite de girasol), sometido a la irradiación con la luz UVA, de los extractos de las plantas bajo estudio.	120
ANEXO E Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD (Columna HP-5, 30 m), donde se muestra el efecto protector en el Sistema Lipídico I (aceite de girasol), sometido a la irradiación con la luz UVA, de las mezclas binarias (1:1), de los AE de plantas las bajo estudio.	122
ANEXO F Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD (Columna HP-5, 30 m), donde se muestra el efecto protector en el Sistema Lipídico I (aceite de girasol),	124

sometido a la irradiación a la luz UVA, de las mezclas binarias (1:1), de los extractos de plantas las bajo estudio.

- ANEXO G** Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD 126
(Columna HP-5, 30 m), donde se muestra el efecto protector en el Sistema Lipídico II (crema cosmética, o/w), de los antioxidantes de referencia, sometido a la irradiación con la luz UVA.
- ANEXO H** Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD 128
(Columna HP-5, 30 m), donde se muestra el efecto protector en el Sistema Lipídico II (crema cosmética, o/w), sometido a la irradiación con la luz UVA, de los AE de las plantas bajo estudio.
- ANEXO I** Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD 130
(Columna HP-5, 30 m), donde se muestra el efecto protector en el Sistema Lipídico II (crema cosmética, o/w), sometido a la irradiación con la luz UVA, de los extractos de las plantas bajo estudio.
- ANEXO J** Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD 132
(Columna HP-5, 30 m), donde se muestra el efecto protector en el Sistema Lipídico II (crema cosmética), sometido a la irradiación con la luz UVA, de las mezclas binarias (1:1), de los AE de plantas las bajo estudio.
- ANEXO K** Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD 134
(Columna HP-5, 30 m), donde se muestra el efecto protector en el Sistema Lipídico II (crema cosmética), sometido a la irradiación a la luz UVA, de las mezclas binarias (1:1), de los extractos de plantas las bajo estudio.

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AA	Actividad antioxidante.
ABTS^{•+}	2,2'-Azinobis-(3-etilbenzotiazolina-ácido sulfónico)
AE	Aceite(s) esencial(es).
BHA	Butilhidroxianisol.
BHT	Butilhidroxitolueno.
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales.
C.s.p.	Cantidad suficiente permitida.
c.s.	Cantidad suficiente.
ca.	<i>Circa</i> (Aproximadamente).
CCV	Compuestos carbonílicos volátiles.
e.g.	<i>Exempli gratia</i> (Por ejemplo).
et al.	<i>Et alii</i> (y otros).
d_f	Espesor de la fase estacionaria, μm .
DPPH^{\cdot}	<i>α,α-Diphenyl-β-Picrylhydrazyl Radical</i> (Radical α,α -difeníl- β -picrilhidracilo).
ERO	Especies reactivas de oxígeno.
ESR	Resonancia electrónica de espín.
eV	Electrón – Voltio.
f.e.	Fase estacionaria.
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de ionización en llama).
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases o cromatógrafo de gases, según el contexto).
GC-ECD	<i>Gas Chromatography with Electron Capture Detector</i> (Cromatografía de gases con detector de captura de electrones).

GC-FID	<i>Gas Chromatography with Flame Ionization Detector</i> (Cromatografía de gases de alta resolución con un detector de ionización en llama).
Gp	Galato de propilo.
HD	Hidrodestilación.
HP	<i>Hewlett-Packard</i> .
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia).
HS	<i>Headspace</i> (Espacio de cabeza).
HS-SPME	<i>Headspace Solid - Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida en el modo <i>headspace</i>).
<i>i.e.</i>	<i>id ets</i> (Es decir, o sea).
Ik	Índice de retención de Kováts.
INCI	<i>International Nomenclature of Cosmetic Ingredients</i> (Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos).
IR	Infrarrojo.
L	Longitud de la columna cromatográfica (m).
Istd	<i>Internal Standard</i> (Estándar interno) asistida por la radiación de microondas).
MSD	<i>Mass Spectrometric Detector</i> (Detector selectivo de masas).
MWHD	<i>Microwave - Assisted Hydro - Distillation</i> (Hidrodestilación asistida por radiación de microondas).
PDMS/DVB	Poli(dimetilsiloxano)/Divinilbenceno.
PFPH	Pentaflúorfenilhidracina.
PL	Peroxidación lipídica.
ppm	Partes por millón.
RL	Radical libre.
rpm	Revoluciones por minuto.
SDE	<i>Simultaneous Distillation- Solvent Extraction</i> (Destilación-Extracción simultánea con solvente).
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Dodecil sulfato de sodio).

SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i> (Extracción con fluido supercrítico).
SPME	<i>Solid-Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida).
TBHQ	<i>ter</i> -Butil-hidroxi-quinona.
TCD	<i>Thermal Conductivity Detector</i> (Detector de conductividad térmica).
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i> (Cromatografía de capa fina).
UVA	Ultravioleta A.

RESÚMEN

TÍTULO: ESTUDIO DEL USO DE MEZCLAS DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS DE *Lippia origanoides*, *Rosmarinus officinalis* Y *Salvia officinalis* COMO ANTIOXIDANTES NATURALES EN CREMAS COSMÉTICAS*

Autores: VIVIANA ROCÍO ROJAS GÓMEZ
MARY ANDREA SANTAMARÍA TORRES**

Palabras clave: Antioxidantes, aceites esenciales, cosméticos, radiación ultravioleta, HS-SPME, *Lippia origanoides*, *Rosmarinus officinalis* y *Salvia officinalis*.

Los antioxidantes surgieron como una consecuencia de la necesidad de conservar los alimentos y otros productos susceptibles a la degradación oxidativa, sin embargo, la presencia de conservantes sintéticos como el butilhidroxitolueno (BHT), el butilhidroxianisol (BHA), la terbutilhidroquinona (TBHQ) y el galato de propilo (Gp) tanto en alimentos como en productos cosméticos presenta serias restricciones a nivel internacional por sus efectos nocivos para la salud del consumidor.

Esta investigación se orienta en aprovechar la capacidad antioxidante que las plantas *Lippia origanoides*, *Rosmarinus officinalis* y *Salvia officinalis* presentan, a través de la evaluación del efecto protector de los aceites esenciales, extractos de estas plantas y sus mezclas binarias, en una crema cosmética.

La medida de la actividad antioxidante se realizó monitoreando el hexanal como producto del deterioro oxidativo del ácido linoléico presente en la crema cosmética por la exposición a radiación UVA; para lo cual se emplearon la microextracción en fase sólida en modo *headspace* (HS-SPME), y la cromatografía de gases con detector de captura de electrones (GC-ECD) para la medición del derivado hidrazónico obtenido por derivación del hexanal con pentafluorfenilhidrazina (PFPH).

Los resultados obtenidos muestran que la mezcla de extractos romero-salvia en concentración 0,5% (p/p) presenta el efecto protector (88%), más alto de todas las mezclas evaluadas en este estudio, y superior al ejercido por los antioxidante de referencia vitamina E y BHT.

*Trabajo de grado

**Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Directores: Elena E. Stashenko y Jairo R. Martínez

ABSTRACT

STUDY OF THE USE OF A BLEND OF *Lippia origanoides*, *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* ESSENTIAL OILS AND EXTRACTS AS NATURAL ANTIOXIDANTS IN COSMETIC CREAMS*

Authors: VIVIANA ROCÍO ROJAS GÓMEZ
MARY ANDREA SANTAMARÍA TORRES**

Keywords: Antioxidant, essential oil, cosmetic, ultraviolet radiation, HS-SPME *Lippia origanoides*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*.

Antioxidants emerged as a consequence of the need to preserve food and other products which are susceptible to oxidative degradation. Nevertheless, the presence of synthetic preservatives such as butylhydroxytoluene (BHT), butylhydroxyanisole (BHA), di-tert-butylhydroquinone (TBHQ) and propyl gallate (Gp), in food and cosmetic products poses serious restrictions on the international standards of consumption due to their harmful effects on the consumer's health.

This research aimed to examine the performance of *Lippia origanoides*, *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* essential oils, extracts and their binary mixtures, as protective antioxidants, when used as ingredients of a cosmetic cream.

The extent of lipid peroxidation was followed by evaluating the release of hexanal, which is the main final product of linoleic acid degradation, a fatty acid present in all the lipid systems studied. Lipid peroxidation was induced by exposure to UVA radiation. Headspace solid phase micro extraction (HS-SPME) and gas chromatography with electron capture detection (GC-ECD) were used to determine hexanal with high sensitivity as its pentafluorophenylhydrazine (PFPH) hydrazone derivative.

The results showed that the mixture of rosemary and sage extracts at 0,5% (w/w) concentration had the highest protective effect (88%), superior to that exhibited by the reference antioxidants vitamin E and BHT.

*Graduation project.

**Science Faculty, School of Chemistry, Directors, Elena E. Stashenko and Jairo R. Martínez

INTRODUCCIÓN

Gracias a la diversidad de especies vegetales que posee Colombia y a estudios fotoquímicos realizados, se han encontrado plantas con una alta aplicabilidad industrial y con potente actividad biológica. Esta investigación se orienta en aprovechar la capacidad antioxidante que las plantas *Lippia origanoides*, *Rosmarinus officinalis* y *Salvia officinalis* presentan, a través de la evaluación del efecto protector de sus aceites esenciales, extractos y sus mezclas binarias, en una crema cosmética.

Los antioxidantes sintéticos surgieron como una consecuencia de la necesidad de conservar los alimentos y otros productos susceptibles a la degradación oxidativa y, al mismo tiempo, que fuesen una alternativa más económica con relación a los antioxidantes naturales. Sin embargo, los conservantes sintéticos como el butilhidroxitolueno (BHT), el butilhidroxianisol (BHA), la terbutilhidroquinona (TBHQ) y el galato de propilo (Gp), tanto en alimentos como en productos cosméticos, genera serias restricciones a nivel internacional, por sus efectos nocivos para la salud del consumidor [1].

Estas sustancias han sido experimentadas en animales, encontrándose, que pueden ocasionar efectos nocivos, tales como la proliferación de células en el tubo digestivo, en el caso del BHA, lesiones hemorrágicas, debidas al BHT, así como la potencialización de la acción de algunos carcinógenos [1]. Aunque muchos de estos efectos han sido evaluados en animales y, tal vez, esos resultados no son extrapolables a los seres humanos debido a las diferencias fisiológicas y anatómicas, los consumidores, sin embargo, intuyen que existen sustancias naturales menos perjudiciales que las sintéticas.

Esta situación ha llevado a una disminución en la demanda de estos productos y provocó grandes pérdidas económicas a las industrias no sólo de cosméticos, sino de alimentos y de fármacos, etc [2]. Esto ha impulsado a estos sectores a invertir en la búsqueda de nuevas alternativas que permitan reducir o, mejor

aún, reemplazar estos preservantes sintéticos por unos naturales, que no presenten daño en la salud.

Para sustituir los preservantes sintéticos, una de las mejores alternativas consiste en buscar otros, de origen natural, que de igual o mejor manera ayuden a proteger el producto e incrementar su tiempo de vida útil, sin causar efectos secundarios en la salud del consumidor. Ciertas sustancias de origen natural pueden presentar algún tipo de actividad fungicida, bactericida, antioxidante o farmacológica, entre otras. Las sustancias con mayor aplicación en la industria cosmética, farmacológica, agroquímica y orgánica, son los aceites esenciales, debido a que presentan un conjunto de compuestos químicos con diversa actividad biológica.

Los agentes antioxidantes incluyen aquellos que tienen la capacidad de inhibir la oxidación ocasionada por radicales libres. Se han encontrado algunas plantas cuyos aceites esenciales han probado ser efectivos como antioxidantes, cuando se les compara con los productos sintéticos en las mismas condiciones experimentales, y que permiten ser incorporados en alimentos y cosméticos, principalmente. Los aceites esenciales de ciertas plantas poseen componentes con actividad antioxidante que se incrementa al realizar sus varias combinaciones [3]. Con base en estos antecedentes, en el presente trabajo, se espera encontrar una mezcla de los aceites esenciales o extractos de *Lippia origanoides*, *Rosmarinus officinalis* y *Salvia officinalis*, capaz de sustituir los agentes antioxidantes sintéticos convencionales, tales como el BHT y el BHA, utilizados en cremas cosméticas.

Por otra parte, ya que la composición química de los aceites esenciales depende de las condiciones climáticas de cultivo de plantas aromáticas y del método de extracción, la presente investigación incluye la caracterización de aceites y extractos obtenidos y usados en los ensayos de actividad antioxidante.

1 ESTADO DEL ARTE

1.1 CIENCIOMETRÍA

En la actualidad, la academia cuenta con mecanismos que permiten consultar el estado de producción intelectual, para así planificar investigaciones y facilitar la toma de decisiones, vislumbrar tendencias, encontrar oportunidades y evitar dificultades, a la hora de abordar un tema de investigación específico.

Por ello, en la bibliometría se emplean herramientas como buscadores de *internet* y bases de datos, que permiten procesar una gran cantidad de datos sobre los estudios relacionados con un tema particular.

La bibliometría permite estudiar aspectos cuantitativos de la actividad científica de una disciplina. Se puede obtener información tan específica como el país, la institución que publica, el área, el año de publicación, las revistas, entre otras.

Realizar una valoración bibliométrica implica analizar los estudios realizados actualmente sobre la actividad antioxidante relacionada con bases cosméticas y aceites esenciales, lo que permite evaluar la viabilidad de la investigación en proceso, el aporte a la comunidad científica y el deber con el entorno social y económico.

Para el análisis bibliométrico se utilizó como principal fuente de información la *Web of Science (ISI Web of Knowledge)*, debido a que allí se ingresaron diferentes ecuaciones de búsqueda, con el fin de evaluar la que presentara una mejor valoración del tema en estudio. Las ecuaciones fueron "*essential oil and cosmetics*", con 65 publicaciones en la última década, "*antioxidant and cosmetics*", con 147 publicaciones y "*antioxidant and essential oil*", con 1290 publicaciones, siendo esta última la ecuación de búsqueda con más resultados generados y de mayor relevancia (**Figura 1**).

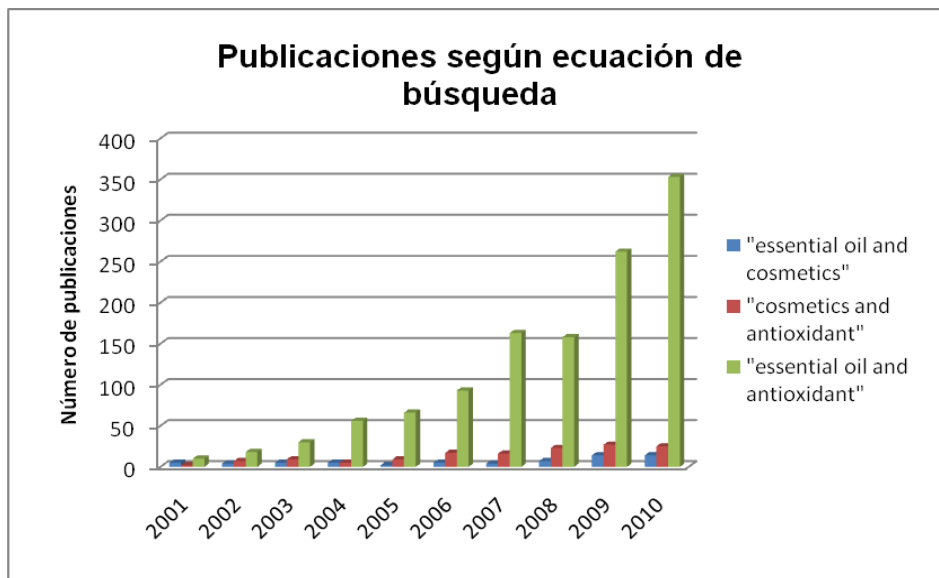


Figura 1. Número de publicación en función del tiempo y la ecuación de búsqueda: $t = (\text{antioxidant}^*)$ refined by: $t = (\text{cosmetic})$ and $t = (\text{essential oil})$; Fuente: *ISI Web of Knowledge*. Fecha de consulta: 13/02/2011.

Análisis cuantitativo de publicaciones por años

Después de elegir la mejor ecuación de búsqueda, la **Figura 2** muestra las publicaciones que se han realizado, por año, sobre antioxidantes y aceites esenciales; esta figura sólo incluye las publicaciones realizadas en los últimos 10 años (2001-2010); se puede observar, que sólo hasta el año 2006 comienza a demostrarse mayor interés sobre este campo de estudio; también se observa, que desde esta fecha hasta el momento, el número de publicaciones va en gran aumento y que el 2010 fue el año con mayor cantidad de dichas publicaciones.



Figura 2. Número de publicaciones sobre antioxidantes y aceites esenciales, en función del tiempo. Ecuación de búsqueda: t= (antioxidant*) refined by: t= (essential oil); Fuente: *ISI Web of Knowledge*. Fecha de consulta: 13/02/2011.

Análisis cuantitativo de publicaciones por países

La **Figura 3** muestra los países que más han publicado sobre el estudio de antioxidantes en cosméticos. Para este análisis cuantitativo, se descubrió que el país con el mayor número de artículos sobre el tema es Turquía seguido de Irán, Italia y Grecia.



Figura 3. Número de publicaciones sobre antioxidantes y aceites esenciales, por países, durante la última década. Ecuación de búsqueda: t= (antioxidant*) refined by: t= (essential oil). Fuente: ISI Web of Knowledge. Fecha de consulta: 13/02/2011.

De la búsqueda realizada, se destacan los siguientes artículos, ya que suministran información necesaria y relevante para el abordaje del tema en estudio, pues fueron pieza importante en la elección de las plantas, para la posterior evaluación de la capacidad antioxidante de sus aceites esenciales y extractos:

- WANG, W., WU. N., ZU. Y.G., FU, Y.J., Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components, *J. Food Chem.*, **2008**, 108, 1019-1022.
- BOZIN, B., MLMICA-DUKIC, N., SAMOJLIR, I., JOVIN, E., Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., lamiaceae) essential oils, *J. Agric. Food. Chem.*, **2007**, 55, 7879-7885.

- STASHENKO E, RUÍZ C, MUÑOZ A, CASTAÑEDA M, MARTÍNEZ J, Composition and antioxidant activity of essential oils of *Lippia origanoides* HBK grown in Colombia, *Nat. Prod. Commun.*, **2008**, 3, 563-566.

1.2 PRODUCTOS COSMÉTICOS

Los productos cosméticos son sustancias o preparados químicos que se aplican sobre la piel con el fin de mejorar su aspecto, cumplir funciones higiénicas, preventivas y decorativas. Los maquillajes, desodorantes, cremas, perfumes, tintes y jabones, entre otros, son cosméticos. Su uso se remonta a la antigüedad, desde los tiempos egipcios cuando los faraones y sus esposas los utilizaban no solamente con un mero significado superficial, sino como un reflejo de su estructura social y cultura [4]. Este concepto sigue manteniéndose en la actualidad, sin embargo, hoy en día las personas se encuentran sometidas a un contacto directo con sustancias tóxicas, tales como el humo del tabaco y gases de exhosto de los carros, contaminantes de las industrias y las radiaciones UV, que poco a poco desfavorablemente afectan el organismo, contaminándolo con sustancias nocivas, que causan irritaciones, envejecimiento prematuro, impurezas en la piel, afectan su pH, etc; ello obliga a las personas a buscar protección contra estos agentes contaminantes. Se pueden encontrar diferentes tipos de cosméticos, pero básicamente todos incluyen un principio activo que garantiza la función para la que han sido diseñados y fabricados los cosméticos, de un excipiente responsable de la forma de presentación del cosmético (si es un líquido o sólido, si es un aerosol o una espuma), así como de espesantes, suavizantes, emolientes, humectantes, conservantes, colorantes y perfumes presentes [5]. Una formulación cosmética debe respetar la integridad de la piel, mantener su pH fisiológico o permitir un retorno rápido a la normalidad, además, debe tener una perfecta inocuidad toxicológica y microbiana.

1.2.1 Cremas cosméticas

Este tipo de cremas se utilizan para proteger la piel de las agresiones ambientales (intemperie, polución, etc.) y para corregir sus eventuales disfunciones (piel grasa, seca, etc.) [4].

El desarrollo de la formulación final es una combinación de arte y ciencia, y ambos tienen un papel importante en el uso del producto para el consumidor. Una vez que el tipo de formulación se determina, se seleccionan los ingredientes y se completan las pruebas de seguridad adecuadas, la eficacia, la conservación y la estabilidad, el producto queda listo para ser introducido en el mercado.

Los ingredientes se seleccionan en función de sus cualidades cosméticas: extensibilidad, deslizamiento, capacidad filmógena, carácter no graso, etc.

El tipo más popular de emulsión utilizada en productos de cuidado de la piel y cosmeceúticos es el aceite en el agua. Se presenta, a continuación, una composición genérica de emulsiones aceite/agua (o/w):

Fase oleosa:

- Uno o varios ésteres grasos líquidos: ca. 10%.
- Un aceite vegetal o un triglicérido sintético: 5%
- Uno o varios derivados de lanolina: 2%

Fase acuosa:

- Glicerina o sorbitol: 5%
- Carbopol 934 ó 940: 0,1%
- Hidróxido sódico para neutralizar: cantidad suficiente
- Conservante: 0,25 %
- Antioxidante: 0,5-1,0%

Perfume: 0,1%

Un par de emulsionantes: 5%

La crema cosmética (o/w) empleada en esta investigación fue suministrada por LABORATORIOS MYN & CIA LTDA (Bogotá, Colombia), y su composición se presenta en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Composición de la crema cosmética (o/w) empleada en este estudio.

NOMBRE COMERCIAL	NOMBRE INCI	CANTIDAD
Agua desionizada	Water (Agua)	C.s.p. 100%
VITAMINA F	Linoleic Acid (and) Linolenic Acid	c.s.
PROPILENO GLICOL	Propylene Glycol	c.s.
GLICERINA	Glycerin	c.s.
ACEITE MINERAL	Mineral Oil	c.s.
ALCOHOL CETÍLICO	Cetyl Alcohol	c.s.
ACIDO ESTEÁRICO	Stearic Acid	c.s.
EMULGIN B1	Ceteareth-12	c.s.
EMULGIN B2	Ceteareth-20	c.s.
Palmitato de Isopropilo	Isopropyl Palmitate	c.s.
HIDRÓXIDO DE SODIO	Sodium Hydroxide	c.s.
CARBOPOL ULTREX 10	Carbomer	c.s.
METIL PARABENO	Methylparaben	c.s.
Dimeticona	Dimethicone	c.s.
Propil parabeno	Propylparaben	c.s.

1.3 ACEITES ESENCIALES

1.3.1 *Rosmarinus officinalis*

La especie *Rosmarinus officinalis* es una planta que pertenece a la familia *Lamiaceae*, originaria de las costas del Mediterráneo y conocida comúnmente como romero.

Esta planta es un subarbusto, ascendente, con abundantes ramificaciones y puede alcanzar una altura de hasta dos metros. Se caracteriza por ser perenne, de hojas pequeñas y delgadas, casi lineares de aspecto brillante, tallos resinosos y flores llamativas de color variante de azul a blancas o

rosadas, que prosperan principalmente en clima frío (**Figura 4**). Las partes aéreas de la planta poseen un olor aromático alcanforado y su sabor es pronunciado, algo amargo y astringente [6].



Figura 4. Planta de *Rosmarinus officinalis* L. Fotografía tomada en CENIVAM el 17 de noviembre de 2010.

El romero puede ser cultivado a diferentes altitudes y en una amplia variedad de climas. Para su reproducción se recomienda la propagación mediante la utilización de semillas o esquejes en suelos arenosos muy permeables y bien drenados [7].

Esta planta se usa como antiséptico, antiespasmódico, antidepresivo, diurético, digestivo, carminativo, insecticida [8-10]. El AE de romero es incorporado tradicionalmente en tratamientos de reumatismo, úlceras, heridas y en la elaboración de tónicos para el cabello.

En medicina es muy utilizado por sus propiedades estimulantes; se presume, que por el alto contenido de alcanfor [9], mientras que en industrias farmacéuticas, cosméticas y de alimentos se utiliza como fragancia y como preservante de alimentos debido a las propiedades antioxidantes que se le atribuyen [10,11].

Existe una gran variedad de estudios sobre del *Rosmarinus officinalis* que analizan sus metabolitos secundarios presentes en el AE (**Tabla 2**). La variabilidad en el contenido de los compuestos presentes se debe, en gran medida, a factores intrínsecos, e.g., desarrollo fenológico, quimiotipo, partes de la planta de donde se extrae la esencia, etc., y extrínsecos, e.g., condiciones climáticas, tratamiento postcosecha, métodos de obtención y análisis del AE o extracto.

Tabla 2. Principales metabolitos secundarios presentes en el AE de *Rosmarinus officinalis* L. de diferentes orígenes.

Origen	Composición química
Grecia	1,8-Cineol (51,2 %), α -pineno (10,3 %), borneol (4,7 %) y canfeno (4,0 %) [12]
Hungría	α -Pineno + canfeno (24,9 %), 3-octenona (10,0 %), β -pineno (3,8 %), 1,8-cineol (20,1 %), alcanfor (14,7 %), borneol (3,0 %), α -terpineol (0,5 %), verbenona (0,8 %), acetato de bornilo (6,0 %), <i>trans</i> - β -cariofileno (9,7 %) [13].
Portugal	α -Pineno (11,2 %-12,1 %), mirceno (31,5%-36,2%), 1,8-cineol (12,8%-14,9%), alcanfor (8,7%-14,4%) [14].
Colombia	1,8-Cineol + limoneno (7-24%), alcanfor (20-21 %), α -pineno (2-11 %), canfeno (1-11 %), β -pineno (2-10%), borneol (2-5%), acetato de bornilo (2-4 %) [15].
Algeria	1,8-Cineol (31,9 %-52,4 %), alcanfor (12,6 %-19,7 %), α -pineno (0,4 %-5,2 %), canfeno (0,3 %-3,0 %), β -pineno (0,3 %-5,7 %), borneol (3,4 %-12,1 %), α -terpinol (2,1 %-12,8 %), β -cariofileno (3,0 %-4,2 %) [9].
Brasil	α -Pineno (41,6%), 1,8-cineol (19,4%), canfeno (4,7%), verbenona (3,9%) y borneol (3,1%) [16].
Turquía	α -Pineno (14,2 %), 1,8-cineol (15,5 %), alcanfor (13,7 %), verbenona (11,8 %), borneol (8,1 %) [17].

También, se ha mostrado que el *Rosmarinus officinalis* posee propiedades antimicrobianas contra *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Mycobacterium intra cellularae*, *Klebsiella* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los investigadores en esta área atribuyen estas propiedades al 1,8-cineol (eucaliptol) presente en el AE en alta proporción [9].

1.3.2 *Lippia origanoides*

Es una especie endémica de la región que va desde México hasta Brasil [18]. En Colombia se puede encontrar en zonas que posean climas secos o semidesérticos. Esta planta se conoce con nombres populares como "Orégano cimarrón" y "Orégano de monte"; es un arbusto que puede alcanzar de 1 a 3,5 m de alto, muy ramificado con hojas aovadas y opuestas, con inflorescencias axiales de color blanco y muy aromáticas (**Figura 5**) [19]. Para los usos medicinales se aprovechan sus propiedades como expectorante, antiespasmódico, siendo utilizadas para estos fines sus hojas [20].



Figura 5. Planta de *Lippia origanoides*. Fotografía tomada en CENIVAM el 17 de noviembre de 2010.

Existen estudios en que se puede encontrar la composición y propiedades de esta planta; aunque, comparado con los estudios realizados sobre otras plantas del mismo género *Lippia*, este número es bajo.

La composición química de los AE de *L. origanoides* varía en la presencia y el contenido de los constituyentes químicos debido, en gran parte, a factores específicos de la planta como su quimiotipo, la parte de la planta, que se utilice para la extracción, así como factores circunstanciales, tales como las condiciones climáticas, métodos de obtención, tratamiento de la planta después

de su cosecha [21], ente otros, como se reporta en diferentes estudios realizados en Colombia, Brasil y Argentina (**Tabla 3**).

Tabla 3. Principales metabolitos secundarios presentes en el AE de *Lippia origanoides* procedente de diferentes orígenes.

Origen	Metabolitos secundarios
Brasil	Carvacrol (37 - 42%), ρ -cimeno (12-18%) y timol (5-10%) [22].
Colombia	Timol (40-45%), ρ -cimeno (7-8%), γ -terpineno (4-5%), carvacrol (2-4%) [19].
Argentina	Acetato de timilo, γ -terpineno ρ -cimeno [23].

El AE de *L. origanoides* mostró actividad contra bacterias *Gram-positivas*, como *Staphylococcus aureus* y *Gram-negativas* como *Escherichia coli*, y contra hongos como *Candida albicans* [22]. Se conoce que el carvacrol y el timol presentan actividades antifúngica, antibacterial y antioxidante [24-27]. La actividad antimicrobiana de aceites esenciales de especies aromáticas aparece asociada generalmente a compuestos fenólicos [28,29], como se demostró en un estudio que carvacrol, eugenol y timol, aislados de un aceite esencial, inhiben el crecimiento de varios microorganismos [18].

1.3.3 *Salvia officinalis*

Es una planta perteneciente a la familia de las Labiadas, originaria del sur de Europa. Se caracteriza por ser un arbusto que puede llegar a medir hasta un metro de alto con ramificaciones cuadrangulares, lignificadas en la base y herbáceas en la zona terminal; sus hojas poseen formas y tamaños diferentes; por lo general, son óvalo-lanceoladas, de color verde grisáceo, rugosas y cubiertas por una capa de pelos glandulares que emanan aroma al tacto y sus flores tienen forma de espiga color azul-violáceo (**Figura 6**).



Figura 6. Planta de *Salvia officinalis* L. Fotografía tomada en la vereda El Retiro. (Municipio de Sucre, Santander). Proyecto “Fortalecimiento de las unidades productivas de aceites esenciales de climas templado y frío y productos de valor agregado en Santander” (CENIVAM).

La *Salvia officinalis* se cultiva en clima templado, aunque es bastante resistente y sobrevive en zonas como los Alpes, requiere sombra moderada, buen riego y un suelo permeable; la época perfecta del año para sembrar esta planta en Europa es finalizando el invierno o a comienzos del otoño, por esquejes.

La salvia posee un sabor fuerte, bastante picante y aromático, con un sutil toque de alcanfor, por lo que se debe emplear con moderación.

En estudios sobre los metabolitos secundarios presentes, en el AE de *Salvia officinalis*, se puede confirmar que el AE contiene principios activos, ricos en flavonoides, ácidos fenólicos, cetonas terpénicas y otros derivados terpénicos, resinas, féculas, etc. Su composición varía según la época de recolección y la subespecie (**Tabla 4**).

Tabla 4. Principales metabolitos secundarios presentes en el AE de *Salvia officinalis* L.

Origen	Metabolitos secundarios
España	α - y β -Tuyona (35-60%), alcanfor (10-40%), ácido rosmarínico (1-2%), flavonoides (1-3%), 5-metoxi-salvigenina (5%) [30].
Brasil	β -Tuyona (19,7%), alcanfor (18,9%), α -tuyona (18,9%), 1,8-cineol (8,1%), β -pineno (3,9%) [31].
Colombia	α -Tuyona (29,5%), β -tuyona (5,2%), alcanfor (7,2%), 1,8-cineol (21,7%), canfeno (2,7%) [32].

El aceite esencial de salvia es antimicrobiano y ligeramente antifúngico *in vitro*, pero su actividad bactericida frente a *Staphylococcus aureus* no es alta. El AE de salvia también es antisudoral, debido a la presencia de tuyona, que bloquea las terminaciones nerviosas de las glándulas sudoríparas [33].

1.4 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

En el laboratorio comúnmente se utilizan tres técnicas para la extracción de metabolitos secundarios volátiles, a saber: (1) hidrodestilación asistida por microondas (MWHD), (2) destilación-extracción simultánea con solvente (SDE) y (3) extracción con fluido supercrítico (SFE). Stashenko y colaboradores [34], han investigado diferentes técnicas, entre las cuales se encuentran las dos utilizadas en el presente trabajo. Para la extracción de metabolitos secundarios de *L. origanoides*, *R. officinalis* y *S. officinalis* se utilizaron las técnicas SFE, para aislar compuestos más pesados y menos volátiles, y MWHD, para los metabolitos secundarios volátiles.

1.4.1 Hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD)

Esta técnica es muy eficaz para la extracción de los aceites esenciales a escala de laboratorio, debido a la sencillez del montaje, la rapidez para la obtención

del aceite y su economía. En su modificación, el material vegetal se sumerge al agua dentro de un matraz de 2 L; luego, la mezcla se somete al efecto de la radiación, el agua se calienta hasta ebullición disolviendo principalmente el AE alojado en los tejidos vegetales, hasta que estas estructuras celulares se rompen por la elevada presión de vapor del sistema y la esencia se libera y es arrastrada por el vapor de agua, para luego condensarse y colectarse [19].

En el Laboratorio de Cromatografía de la UIS se han realizado un gran número de estudios, utilizando esta técnica y optimizando las variables de extracción, para obtener un mejor rendimiento, como lo describen Stashenko y colaboradores [35] y Tsarkova [36]. El balón que contiene el material vegetal y agua se introduce al horno microondas comercial, allí la mezcla se calienta hasta aislar el aceite, evaporarlo y después condensarlo en una trampa tipo Dean-Stark. El tiempo de extracción es aproximadamente de 30 a 45 min [19].

1.4.2 Extracción con fluido supercrítico (CO₂)

La extracción con fluido supercrítico (SFE) se ha vuelto cada vez más usada para la extracción de metabolitos secundarios de plantas [37]. Esta técnica se considera segura para la salud de las personas, y los extractos obtenidos por este tipo de técnica son reconocidos por su calidad, *i.e.*, el olor y sabor, comparados con los de extractos obtenidos por otras técnicas. Una desventaja de usar SFE es que su montaje es costoso, característica que prima a la hora de elegir una técnica para extracción [38,39].

La SFE es un método funcional, pues variando las condiciones tanto de temperatura como de presión, se pueden obtener de manera selectiva diferentes clases de extractos de un mismo material vegetal. El uso de ciertas sustancias a presiones y temperaturas cercanas a las críticas se basa en que éstas podrían ser consideradas como solventes adecuados para la extracción de metabolitos volátiles y semivolátiles de la plantas [40,41].

1.5 SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES

El estudio de la composición y el control de calidad de los aceites esenciales y extractos se realizan a través de diferentes métodos de separación, identificación y cuantificación, entre los cuales se destacan los siguientes [42]:

- Métodos químicos de separación (obtención de derivados);
- Destilación fraccionada;
- Cromatografía de capa fina;
- Cromatografía en columna (obtención de fracciones);
- Cromatografía líquida de alta eficiencia (fraccionamiento);
- Cromatografía de gases (separación de componentes y su cuantificación);
- Espectrometría de masas (identificación de los compuestos).

El presente estudio está sustentado en la cromatografía de gases acoplada a masas, que es la técnica más usada en el análisis de los AE. A continuación, se tratarán brevemente los puntos más importantes.

1.5.1 Cromatografía de gases

La cromatografía de gases (GC) es una técnica de separación en la que la muestra se volatiliza antes de ingresar a la columna cromatográfica, donde experimenta partición entre una fase móvil (gas inerte) y una fase estacionaria, constituida por un sólido o líquido soportado sobre las paredes de la columna [43,44]. La columna se encuentra dentro del horno, donde la temperatura se ajusta según los requerimientos de análisis. La temperatura óptima de la columna depende del punto de ebullición de los analitos en la muestra y del grado de separación requerido. Los analitos que eluyen de la columna pasan a un detector, que registra las diferentes sustancias y genera una señal proporcional a su cantidad [44,45].

En lo referente al cromatógrafo de gases (GC), cabe destacar que éste actúa globalmente como instrumento, ya que realiza tanto la separación como la determinación cuantitativa de los solutos. Por tanto, la GC se encuentra dentro de las técnicas de separación que tienen incorporado un sistema de detección, generalmente continuo (en línea) [46].

1.5.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La combinación de la cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés, *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) es una de las herramientas analíticas más poderosas. En los últimos años, se ha demostrado que es uno de los métodos más eficientes y utilizados para el estudio de la composición de los AE de diversas plantas [47-49].

Los componentes del aceite pueden ser simultáneamente separados e identificados con base en sus tiempos de retención, índices de retención (I_R) y los patrones de fragmentación, los cuales son únicos para cada sustancia.

Los tiempos de retención de la sustancia y de los de hidrocarburos lineales se utilizan para determinar los llamados índices de retención (Ver **Numeral 2.3.2**), que sirven para identificar tentativamente los compuestos, pues todas las sustancias que se analizan por GC tienen I_R diferentes. La identificación por espectrometría de masas (MS) se hace por comparación del espectro de la sustancia con los espectros de distintas bases de datos, e.g., Adams, NIST, Wiley, o de los patrones certificados; siendo el analista químico quien verifica las posibles rutas de fragmentación y los fragmentos característicos de ciertos grupos de moléculas [19].

1.6 RADICALES LIBRES

Un radical o radical libre (R^{\cdot}) es la especie química que posee uno o más electrones desapareados en un orbital atómico o molecular, son especies reactivas neutras; el *spin* del electrón desapareado origina el momento magnético del radical, que se comporta como “*paramagnético*” (es atraído por el campo magnético) y puede ser detectado por la espectrometría de resonancia magnética del spin del electrón (ESR). Son extraordinariamente reactivos, aunque pueden estabilizarse por resonancia del electrón [1].

1.6.1 Procesos de producción de radicales libres

Los procesos de producción de radicales libres, son:

- a. *Termólisis* de enlaces, inusualmente débiles, cuya ruptura requiere aplicar baja energía, en sustancias que reciben el nombre de *iniciadores* de reacciones radicalarias.
- b. *Radiólisis*, por radiaciones ionizantes, que inicialmente dan lugar a radicales catiónicos y electrones, y seguidamente originan un radical neutro y un sustrato cargado, e.g., la radiólisis del agua y sustancias disueltas, con liberación de un átomo de hidrógeno y de un radical hidroxilo, ambos muy reactivos; por ejemplo, la iniciación de la llamada auto-oxidación de los lípidos, *in vivo*.
- c. *Fotocatálisis* o *fotodisociación*: donde la luz visible (solar) o la luz ultravioleta rompen enlaces, con producción de radicales libres y oxidaciones, que en el ser vivo provocan pigmentación, envejecimiento, porfiria, cáncer, etc.
- d. *Oxidantes*:
 - i. *Ozono*. Niveles normales de ozono en el aire (0.01-0.02 ppm) son suficientes para iniciar la autooxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) *in vivo*, y producir tanto daño biológico (medido por roturas de cromosomas) como las radiaciones UVA.

ii. *El singlete o singulete de oxígeno y el anión-superóxido* actúan de forma similar al ozono, y dan lugar a radicales o sus precursores, a través de reacciones no enzimáticas.

iii. *Óxidos de nitrógeno* (NO, NO₂; son radicales libres bastante estables, que reaccionan con las olefinas por adición, catalizan la isomerización de los ácidos grasos insaturados y la autooxidación. Con el agua oxigenada forman radical hidroxilo y peroxinitrito o peroxinitrato (Figura 7).

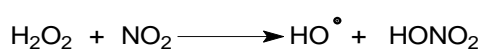


Figura 7. Reacción de Fenton con óxidos de nitrógeno.

Iones de metales de transición; cambian su estado de valencia por pérdida o ganancia de un electrón, mediante reacciones de oxidación-reducción, y provocan transferencia del electrón, dentro del ciclo de Haber-Weiss, que explica la reacción de Fenton, en el que el Fe²⁺ cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno al radical hidroxilo (HO[•]) y anión oxidrilo (HO⁻) (Figura 8).

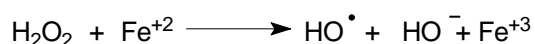
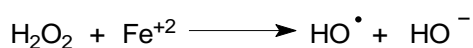


Figura 8. Reacción de Fenton con iones de metales de transición.

1.7 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

La molécula de oxígeno (O₂) en estado natural o básico es birradical bastante estable; cada uno de sus orbitales moleculares externos (2pπ*) posee un electrón desapareado, y ambos tienen espines paralelos lo que configura su forma de triplete, ³O₂.

El O₂ no es muy reactivo porque sólo uno de los dos electrones puede establecer un enlace covalente con otro electrón. Si uno de estos electrones absorbe energía, cambia su spin; este oxígeno excitado constituye el *singlete* o singulete de oxígeno (¹O₂) es mucho más reactivo y oxidante porque sus dos electrones, con spins opuestos, pueden reaccionar con otros electrones.

Por otra parte, el oxígeno molecular puede ser reducido parcialmente por reacciones enzimáticas o no enzimáticas, lo que permite la producción de otras especies reactivas (**Tabla 5**), que reciben el nombre de *especies reactivas de oxígeno* (ERO), también conocidas como radicales libres de oxígeno, aunque no todo son radicales (e.g., H₂O₂) [1].

Tabla 5. Especies reactivas derivadas del oxígeno.

Anión superóxido (O₂⁻)	Estado reducido por la ganancia de un electrón formado en muchas reacciones de autooxidación.
Radical hidroperoxilo (HO₂[·])	Forma protonada del O ₂ ⁻ .
Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)	Estado reducido por la ganancia de dos electrones formado a partir del O ₂ ⁻ (HO ₂ [·]) por dismutación directamente del O ₂ .
Radical hidroxilo (OH[·])	Estado reducido por la ganancia de tres electrones formados en las reacciones de Fenton o en la reacción de Haber-Weiss catalizada por metales (hierro); altamente reactivo.
Radical alcóxido (RO[·])	Radical orgánico con centro de oxígeno (lípidos).
Radical peróxido (ROO[·])	Formado a partir de hidropéroxidos orgánicos (lípidos o ROOH, por pérdida de hidrógeno).
Hidropéroxido orgánico	Formado por la abstracción de un átomo de hidrógeno de otras biomoléculas por ROO [·]
Oxígeno singulete (¹O₂)	Especie excitada formada en la interacción de radicales ROO [·]

1.8 ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes son moléculas de origen natural o sintético que, en bajas concentraciones, previenen o inhiben la oxidación de grasas, vitaminas, proteínas y otras biomoléculas que son fácilmente oxidables. Estas oxidaciones son causantes de colores, olores y sabores desagradables en alimentos, productos cosméticos y farmacológicos, entre otros, además de producir efectos nocivos en la salud [50].

Según los mecanismos de acción, los antioxidantes se clasifican así:

(1) Antioxidantes preventivos, son compuestos que no permiten dar inicio a la reacción de peroxidación. Secuestran las especies radicalarias y desactivan el oxígeno singulete [51]. El β -caroteno y otros quelantes son los encargados de atrapar las especies radicalarias de oxígeno (ERO).

(2) *Scavengers*, actúan sobre ERO, ya formados, por peroxidación lipídica. Son compuestos donadores de hidrógeno o electrón e interrumpen una reacción en cadena. La vitamina E, los galatos y los flavonoides son compuestos estables que tienen la capacidad de formar dímeros o reordenar su estructura para permitir la reacción con un radical alcóxido o peróxido, deteniendo así la reacción de oxidación del sustrato [4].

Los antioxidantes también se pueden clasificar de acuerdo con su origen, *i.e.*, los antioxidantes naturales como la vitamina E, capaz de capturar radicales hidroxilo y aniones superóxido y neutralizar el peróxido de hidrógeno. La vitamina C, es capaz de neutralizar el oxígeno singulete; los beta carotenos, eliminar radicales libres; mientras que los flavonoides tienen capacidad para atrapar radicales y formar quelatos con metales [49].

Los antioxidantes sintéticos son, en su mayoría, compuestos fenólicos, a los cuales se les han introducido grupos alquilo que aumentan su solubilidad en grasas y aceites; algunos de éstos, son el BHA, BHT y el TBHQ,

Los antioxidantes pueden inhibir o retardar los procesos de oxidación de tres maneras: (1) previniendo la formación de nuevos radicales libres, (2) capturando los ya existentes y así evitando que se produzcan reacciones en cadena, y (3) reparando biomoléculas dañadas por los ataques de radicales libres [52].

1.9 MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Las mediciones de la actividad antioxidante (AA) utilizan ensayos de atrapamiento de radicales, dentro de los cuales los más empleados son el del catión-radical ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-sulfónico) (ABTS⁺) y el radical α,α -difeníl- β -picrilhidracilo (DPPH \cdot). Las técnicas espectroscopía Infrarrojo (IR), Cromatografía de gases (GC), Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y los métodos calorimétricos, conductimétricos y titrimétricos, generalmente se usan para determinar los compuestos generados o degradados. En particular, las técnicas GC y HPLC son ampliamente utilizadas para el análisis de aldehídos, cetonas, alcoholes, hidroperóxidos y ácidos grasos [53]. Los ácidos grasos se determinan en forma de ésteres metílicos, por cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización en llama (GC-FID).

1.10 PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Es un proceso de reacción en cadena, que en su mayor parte ocurre por medio de radicales libres (RL) así:

- I. **Iniciación:** en esta etapa, se produce el ataque de una especie radicalaria, formándose así radicales $-\text{CH}(\text{R}\cdot)$ de los correspondientes ácidos grasos, como se observa en la **Figura 9**.

Los radicales de los ácidos grasos así formados ($R\cdot$), tienden a ser estabilizados mediante rearrreglos intramoleculares conducentes a formar dienos conjugados (**Figura 10**). Estos radicales dieno-conjugados pueden reaccionar con O_2 originando radicales peróxido $ROO\cdot$.

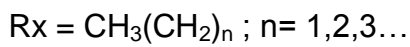
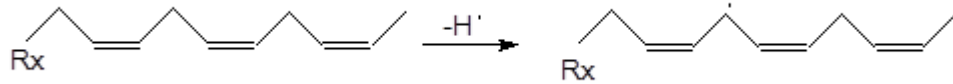


Figura 9. Formación de radicales de ácidos grasos ($R\cdot$) por abstracción de un hidrógeno $H\cdot$, iniciadas por ERO o cualquier RL.

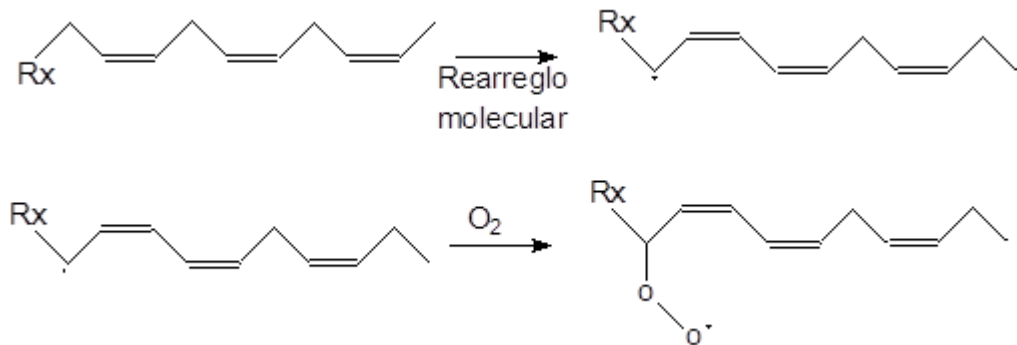


Figura 10. Estabilización de los radicales de ácidos grasos ($R\cdot$) por medio de rearrreglos intramoleculares y formación de peróxidos por reacción de éstos radicales con oxígeno.

II. Propagación: Los radicales peróxidos ($ROO\cdot$), anteriormente formados (**Figura 10**), pueden abstraer $H\cdot$ de otras moléculas de lípidos vecinos para formar hidroperóxidos ($LOOH$) y un nuevo radical de ácido ($R\cdot$), que también reaccionará con O_2 , dará origen a un nuevo radical peróxido ($ROO\cdot$), para continuar así la reacción en cadena (**Figura 11**).

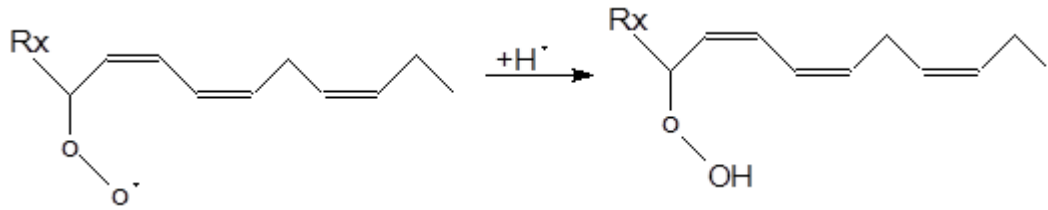


Figura 11. Ataque de un radical peróxido (ROO^\cdot) a una molécula vecina, abstrayendo H^\cdot y propagando la reacción en cadena.

III. Finalización: Los hidroperóxidos (LOOH), en presencia de iones o complejos de metales de transición como Fe^{2+} y Cu^{2+} , originan los radicales alcoxilo (RO^\cdot) (**Figura 12**).

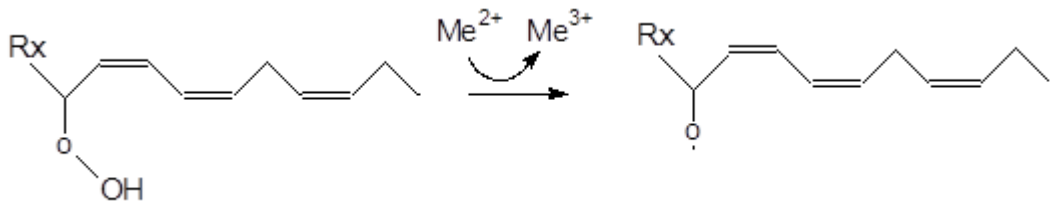


Figura 12. Formación de radicales alcoxilo (RO^\cdot) en presencia de metales divalentes, en el proceso de finalización de la peroxidación lipídica.

Los radicales alcoxilo (RO^\cdot) pueden abstraer H^\cdot de otras moléculas, para formar derivados hidroxilados (a), también pueden perder H^\cdot y formar las respectivas cetonas (b), o pueden sufrir una escisión β (β -esc) y así formar un aldehído (c) y un radical alquílico (d), que puede dar origen a un hidrocarburo por abstracción de un H^\cdot de otra molécula (**Figura 13**) [54,55].

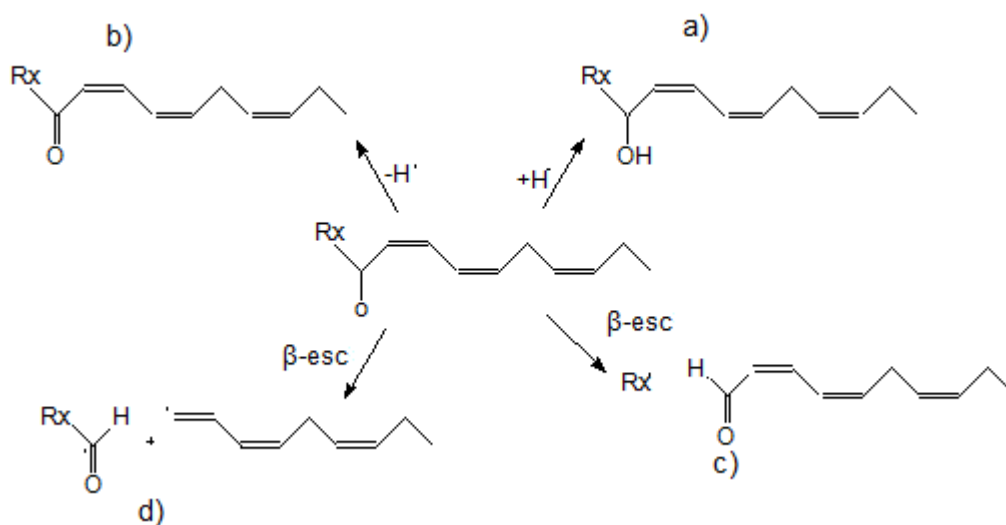


Figura 13. Productos finales generados durante el proceso de peroxidación lipídica.

De acuerdo con este proceso, por ejemplo, uno de los productos finales mayoritarios de degradación del ácido linoléico es el hexanal, cuya formación se observa en la **Figura 14**. Se forman, además, otros productos de degradación, a saber: 3-nonena, 2,4-decadienal, acetaldehído, acroleína, propanal, butanal, pentanal, heptanal, nonanal, 2-hexenal, 2-heptenal, 2-octenal, 2,4-nonadienal, 8-oxo-octanoato de metilo, 9-oxo-nonanoato de metilo, 10-oxo-decanoato de metilo, 10-oxo-8-decenoato de metilo, 4,5-epoxi-2-decenal, pentano, hexano, 1-pentanol, 1-octen-3-ol, 2-pentil-furano, heptanoato y octanoato de metilo [56].

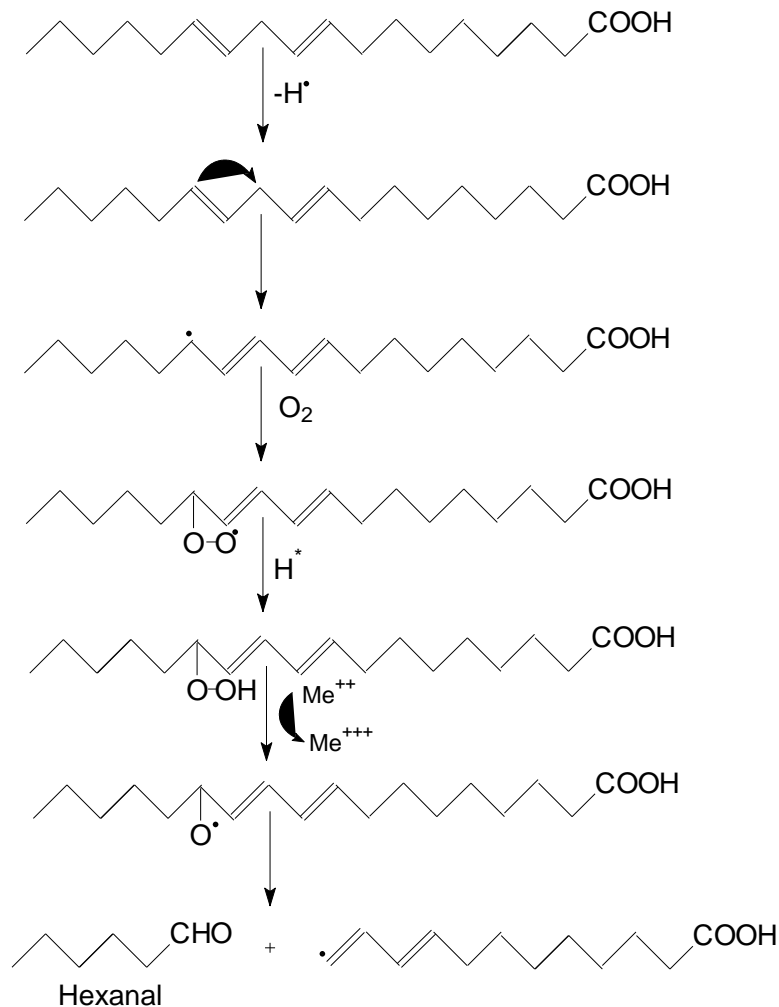


Figura 14. Generación del hexanal durante la oxidación del ácido linoléico.

1.11 MONITOREO DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

A continuación, se enumeran algunos métodos químicos e instrumentales más comunes para el monitoreo de progreso de la peroxidación lipídica, a saber:

Métodos químicos:

- Valor peróxido
- Prueba del ácido tiobarbitúrico (TBA)
- Valor de inicidina
- Valor de carabonilo
- Valor de ácido

Métodos espectrofotométricos:

- Absorción UV
- Espectroscopia IR
- Quimioluminiscencia

Métodos cromatográficos:

- HPLC, GC, GC-SD/ECD/FPD/FID
- Headspace* y SPME

Determinación de hidrocarburos,
derivados de aldehídos y cetonas
volátiles

Métodos sensoriales:

Evaluación del *flavour*

Oxígeno absorbido:

Manómetro de Warbur

A continuación, se explicarán algunos de los métodos usados para monitorear la peroxidación lipídica (PL):

La PL implica la "pérdida" (modificación ó degradación) de los ácidos grasos. Por lo tanto, determinar su disminución está relacionado con el grado de PL en el sistema. El análisis de los ácidos grasos se puede hacer por HPLC, pero éstos también se pueden derivatizar a compuestos más volátiles y estables (ésteres), para analizarlos por GC [57,58]. Existen varias formas de derivatizar los ácidos grasos, pero la más utilizada es con trifluoruro de boro (BF_3) en metanol, seguida de la extracción con heptano o hexano y análisis por GC/FID [57].

1.12 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

La Microextracción en fase sólida (SPME) se basa en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice fundida recubierta con un sorbente, en la mayoría de los casos polimérico, seguida de la desorción de los analitos absorbidos mediante temperatura o un disolvente orgánico [59]. El pequeño tamaño de la fibra y su geometría cilíndrica permiten incorporarla en una jeringa. De esta forma, se facilita su manipulación y al mismo tiempo, se protege la fibra cuando no se utiliza, ya que ésta permanece dentro de la aguja de la jeringa. Un esquema del dispositivo comercial de SPME se muestra en la **Figura 15** [60].

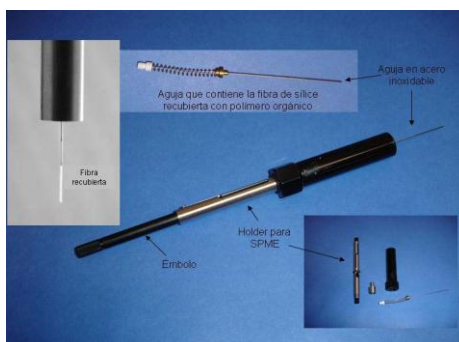


Figura 15. Esquema del dispositivo comercial de SPME [66].

Algunas de las ventajas de la SPME sobre otros métodos analíticos son la combinación del muestreo, la concentración y la transferencia directa de los analitos al sistema cromatográfico, GC o HPLC [59]. La SPME permite analizar un amplio rango de sustancias, desde volátiles hasta no volátiles [61-63], presentes en matrices gaseosas [64], líquidas [65] y/o sólidas [62].

La microextracción en fase sólida tiene dos etapas: (1) en la primera, la fibra recubierta es expuesta a la muestra o a su *headspace* donde ocurre la repartición de los analitos de interés entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de la fibra; (2) en la segunda fase, los analitos concentrados sobre el recubrimiento polimérico son transferidos al equipo instrumental donde son desorbidos, separados y cuantificados [66].

Existen tres modos de operación de SPME, a saber: (1) extracción directa o por inmersión, (2) extracción en el modo *headspace* y (3) extracción con la fibra protegida por una membrana. En la extracción directa, la fibra es sumergida en la muestra y los analitos son transportados de la matriz de la muestra al recubrimiento polimérico de la fibra (**Figura 16**). En el modo *headspace*, los analitos son transferidos a la fibra a través del espacio de cabeza de la muestra, este caso es recomendado cuando se quiere proteger la fibra de daños originados por interferencias con compuestos de altos pesos moleculares (proteínas o ácidos húmicos) [66].

La microextracción protegida con membrana, es empleada para la extracción de analitos presentes en muestras muy contaminadas con el propósito de proteger el recubrimiento de la fibra [61].

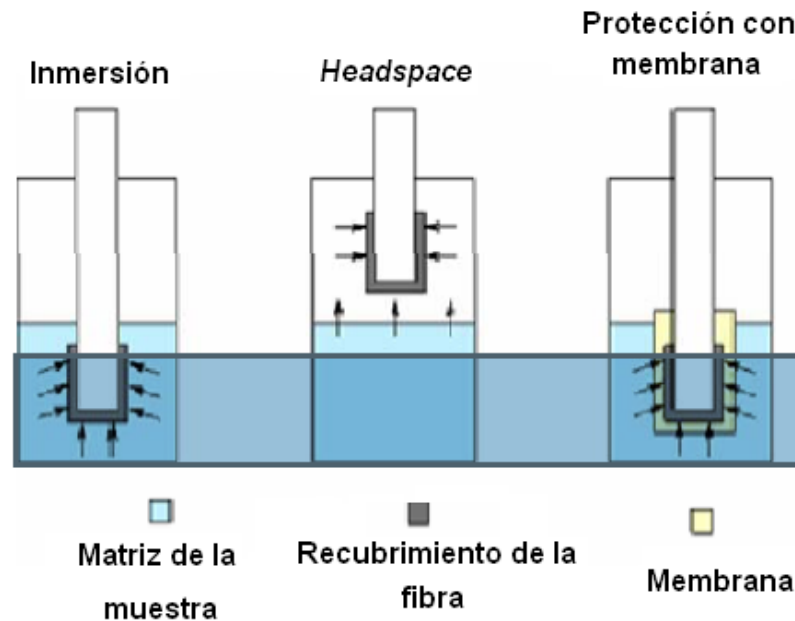


Figura 16. Diferentes modos de extracción por la técnica SPME [59]

Los recubrimientos para las fibras usadas en la SPME, disponibles comercialmente, pueden ser clasificados en dos grupos: a. Recubrimientos poliméricos puros (polímeros homogéneos) y b. Partículas porosas embebidas en una fase polimérica (polímeros heterogéneos) [67]. El primer grupo está integrado por poli(dimetilsiloxanos), PDMS, de diferentes espesores (7, 30 y 100 μm), y poli(acrilato), PA, de 85 μm , y el segundo grupo, por los siguientes adsorbentes [66]:

- Poli(dimetilsiloxano)/Divinilbenceno (PDMS/DVB) de 60 y 65 μm ;
- Poli(dimetilsiloxano)/CarboxenTM (PDMS/Carboxen) de 75 μm ;
- Carbowax/Divinilbenceno (CW/DVB) de 65 μm ;
- Carbowax/Resina templada (CW/TPR) de 50 μm

Estos recubrimientos, a su vez, pueden clasificarse como no polares (PDMS), semipolares (PDMS/DVB y PDMS/Carboxen) y polares (PA, CW/DVB y CW/TPR) [67]

En la microextracción en fase sólida, la cantidad de analitos retenidos por la fibra en el estado del equilibrio, depende linealmente de su concentración, según la siguiente expresión [59,61]:

$$n_s = K_D V_s C$$

Donde:

n_s: Moles adsorbidas por la fase estacionaria (recubrimiento);

K_D: Constante de distribución;

V_s: Volumen del recubrimiento de la fibra;

C: Concentración de analitos en la muestra.

El procedimiento de extracción, consiste en la exposición de la fibra a un pequeño volumen de una muestra acuosa o, a su espacio de cabeza (*headspace*), por un cierto período de tiempo. Las condiciones de extracción se ven afectadas por variables como: agitación de la muestra, que permite la difusión de los analitos hacia la fibra, logrando el equilibrio más rápidamente. Los compuestos con coeficientes de difusión muy bajos tienen tiempos de equilibrio más largos. En este caso, para disminuir el tiempo de análisis es necesario construir una curva que relacione la dependencia del tiempo de la extracción con la concentración del analito. El tiempo más corto, es escogido de acuerdo con el límite de detección del compuesto de interés; de igual manera, se hace necesario controlar el tiempo de exposición, con el fin de obtener una buena reproducibilidad [66].

La temperatura de extracción, también, debe ser considerada, ya que puede tener dos efectos opuestos sobre la SPME. Un aumento de la temperatura favorece la difusión de los analitos hacia la fibra, además, en el modo *headspace*, la temperatura ayuda a promover la transferencia de analitos a la fase vapor de la

muestra. Por otro lado, ya que la adsorción es un proceso exotérmico, un incremento de la temperatura reduce la constante de distribución del analito.

El pH de la muestra es importante en el análisis de compuestos de naturaleza ácida o básica (fenoles y aminas), puesto que se requiere que éstos se mantengan en su forma no disociada. El efecto salino o *salting out* se logra mediante la adición de sal, por ejemplo, cloruro de sodio (NaCl) o sulfato de sodio (Na₂SO₄), con la finalidad de aumentar la fuerza iónica de la solución. Esto hace que los compuestos orgánicos sean menos solubles y sus coeficientes de partición se incrementen [61].

Las siguientes son otras variables que pueden afectar la SPME:

- Tiempo de muestreo (si no se logra alcanzar el equilibrio);
- Volumen de la muestra;
- Volumen de *headspace*;
- Tipo de fibra (naturaleza química del recubrimiento);
- Componentes de la matriz de la muestra (sales, materia orgánica, humedad, pH, *etc.*);
- Tiempo que transcurre entre la extracción y el análisis;
- Pérdida de analitos (adsorción sobre las paredes del vial, permeación a través del teflón, adsorción por el *septum*);
- Condiciones de inyección en el equipo cromatográfico (temperatura y tiempo de desorción, entre otros).

1.13 DERIVATIZACIÓN EN SPME

La combinación más interesante de la SPME con la derivatización es la extracción y derivatización simultánea de los analitos de interés directamente sobre la fibra, ya que, en este caso, la eficacia de la extracción y su selectividad es muy elevada. Así, la fibra es introducida en el vial que contiene el reactivo derivatizante a una concentración muy elevada, de manera que la fibra queda “dopada” con el reactivo

derivatizante. Luego, la fibra se introduce en el espacio de cabeza del vial que contiene los analitos y la extracción de los mismos se produce al mismo tiempo que su derivatización. En este caso, no se alcanza el equilibrio, ya que los analitos son derivatizados a medida que son extraídos por la fibra y, por lo tanto, la extracción es exhaustiva. En consecuencia, la eficacia de la extracción es muy elevada, pero este modo presenta el inconveniente de su uso, ya que está limitado a reactivos derivatizantes de baja volatilidad [59].

La sensibilidad del método puede ser mejorada cuando la derivatización se utiliza para introducir una especie química que puede causar una respuesta específicamente más alta del detector. Esto sucede cuando se usan reactivos de derivatización que contienen el grupo pentafluorobenceno, que genera una respuesta sensible y selectiva en GC, operado con ECD [35,65].

Stashenko E. E. y colaboradores [65], emplearon como agente derivatizante pentafluorofenilhidracina (PFPH), para la derivatización de compuestos carbonílicos sobre la fibra de SPME, expuesta al *headspace* (HS) de la muestra, obteniendo de este modo, las respectivas hidrazonas, las cuales fueron analizadas por GC/ECD. Esta metodología fue aplicada a la determinación de los compuestos carbonílicos que se forman durante la peroxidación lipídica térmicamente inducida y, luego, fue extendida a la evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de aceites esenciales, midiendo hexanal como marcador del proceso de lipoxidación, en un sistema lipídico modelo sometido a la oxidación. El método ofrece alta sensibilidad (10-90 fmol) y buena reproducibilidad (RSD<10%). Esta aplicación se empleó también para la evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de algunas especies vegetales. El hexanal, determinado por Microextracción en fase sólida en modo *headspace* (HS-SPME) con la derivatización (PFPH) sobre la fibra, fue utilizado como marcador del proceso de peroxidación lipídica, inducida por radiación UV, calentamiento, o iones Fe^{+2} en la presencia de O_2 , en un sistema lipídico modelo [65].

1.14 ALDEHÍDOS VOLÁTILES

Los compuestos de bajo peso molecular, productos finales de la PL, se usan preferiblemente para medir el grado de PL en los sistemas lipídicos. Se han utilizado la cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), y cromatografía de gases (GC), para la identificación de compuestos carbonílicos e hidrocarburos [64]. Actualmente, se usa la cromatografía gaseosa (GC) para la determinación y cuantificación de los compuestos carbonílicos volátiles (CCV) en los sistemas lipídicos. La medición de estos compuestos es un reto analítico, porque ellos son muy volátiles, generan respuesta débil en detectores convencionales [Detector de conductividad térmica (TCD) y Detector de ionización en llama (FID)] y su solubilidad en agua es alta, a los porcentajes de recuperación con solventes orgánicos muy bajos. La solución a este inconveniente es la derivatización previa de los compuestos carbonílicos y la detección de sus derivados con detectores altamente específicos. Generalmente, los CCV se hacen reaccionar con agentes derivatizantes, tales como 2,4-dinitrofenilhidracina [68] o PFPH [65], para formar las respectivas hidrazonas más estables y fáciles de cuantificar con detectores selectivos, *e.g.*, de captura de electrones (ECD) [65].

Stashenko *et al.* [65], emplearon como agente derivatizante PFPH, para la derivación de compuestos carbonílicos sobre la fibra de SPME en el modo *headspace*, obteniendo de este modo, las respectivas hidrazonas (**Figura 17**), las cuales fueron analizadas por GC-ECD. Inicialmente, esta metodología fue aplicada a la determinación de los compuestos carbonílicos que se forman durante la peroxidación lipídica térmicamente inducida, luego, fue extendida a la evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de aceites esenciales usando hexanal como marcador en un sistema lipídico modelo para medir el efecto protector contra la oxidación [66].

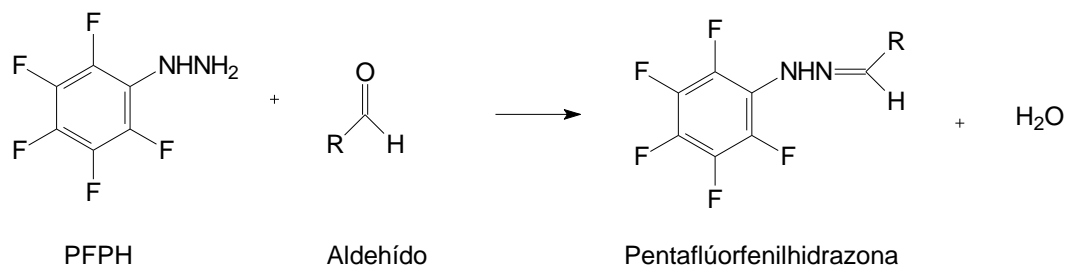


Figura 17. Reacción de derivación de los aldehídos con pentaflúorfenilhidracina (PFPH).

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS DE LABORATORIO

Los reactivos y solventes empleados en este estudio fueron de grado HPLC o grado analítico y se adquirieron a través de los representantes de ALDRICH, MERCK y SIGMA. En la **Tabla 6** se reporta la lista de reactivos y solventes usados durante la realización de este proyecto.

Tabla 6. Lista de reactivos y solventes usados en el presente estudio.

Reactivos	Pureza y casa productora
Butilhidroxitolueno (BHT)	99%, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO 63178, EE.UU.
Pentafluorofenilhidracina, PFPH	97%, Aldrich Chemical Co., Milwaukee WI 53233, EE.UU.
Sulfato de sodio anhidro	Analítico, Merck-Schuchardt, 85662 Hohenbrum, Alemania
Vitamina E	97%, Aldrich Chemical Co., Milwaukee WI 53233, EE.UU.
Hexanal	98%, Aldrich Chemical Co., Milwaukee WI 53233, EE.UU.
Solventes:	
Metanol	HPLC, <i>J.T Baker</i> , México, D.F., México
Hexano	HPLC, <i>J.T Baker</i> , México, D.F., México
Diclorometano	Analítico, Emscience, Merck KgaA, 41149122, Alemania.
Agua	HPLC, <i>J.T Baker</i> , México, D.F., México

A continuación, aparecen los materiales y equipos de laboratorio, que se utilizaron en esta investigación.

Materiales:

- Balones aforados de 2, 5 y 10 mL (Kimax)
- Micropipeteadores de 2-20, 25-250 y 100-1000 L (BRAND, Postfach 1155. D-97864 Wertheim, Alemania)
- Pipetas Pasteur
- Tubos cónicos de poli(propileno) de 1.5 mL (BRAND, Postfach 1155. D-97864 Wertheim, Alemania)
- Viales de automuestreo de 2 mL (Agilent Technology, EE.UU.)
- Accesorios cromatográficos (*férrulas, septa, liner, jeringas* Hamilton de 10 mL)
- Gases especiales (He, H₂, aire, mezcla Ar/CH₄, Aga FANO, S.A., Bucaramanga, Colombia)
- Tubos de rayos UV, 6 Wattios

Equipos

- *Minishaker* (SCHOTT SG22, Schott-Geräte GmbH, D-65719 Hofheim/Ts, Alemania);
- Balanza METTLER TOLEDO PB 1502-S (Suiza)
- Plancha de calentamiento con agitación magnética (SCHOTT MR 10655, Schoott-Geräte GmbH, D-65719 Hofheim /Ts, Alemania);
- Baño refrigerante (Cole-Parmer, Model 12108-20, EE.UU.)
- Extractor SFE-2000 (Thar technologies, Pittsburgh EE.UU.)
- Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus Series GC System* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5973 Network*, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* y un inyector automático *Agilent 7863*.

- Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard-5890 *Series II*, equipado con un puerto de inyección *split/splitless*, columna HP-5 (30 m, 0.25 mm di, 0.25 μ m, fase estacionaria: 5%-fenil poli(metilsiloxano)) y detector de captura de electrones (ECD, ^{63}Ni), un inyector automático HP 7683, y un sistema de datos HP *ChemStation* HP Rev. A.06.03.

2.2 PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

2.2.1 Obtención de aceites esenciales por el método MWHD

Las hojas, previamente limpiadas (ca. 200 g), se sometieron al proceso de extracción en un equipo tipo *Clevenger* con reservorio de destilación *Dean-Stark* adaptado a un sistema de calentamiento por radiación de microondas, en un horno convencional *LG Intelowave*, modelo MS-1242ZK (Seúl, Corea), con potencia de salida 1200 W y frecuencia de radiación 2.5 GHz [19]. Se adicionaron 300 mL de agua destilada. El tiempo total de extracción fue de 40 min, dividido en 4 turnos (4x10 min) a intervalos de 1 min. La potencia del horno (720 W) se fijó al 60 % de la potencia total del equipo. En la **Figura 18** se puede observar el montaje utilizado para MWHD.

Los AE obtenidos se secaron con Na_2SO_4 anhidro, para eliminar la humedad y evitar su daño. Los AE aislados se pesaron en una balanza METTLER TOLEDO PB 1502-S (Küsnacht, Suiza). Los pesos se promediaron y el rendimiento de esencia se calculó con base en el peso de material vegetal inicial. Después de esto, los AE se almacenaron en frascos ámbar y fueron refrigerados a 4°C, para su posterior análisis y pruebas de actividad antioxidante.



Figura 18. Montaje para hidrodestilación asistida por microondas. Fotografía tomada en CENIVAM, el 17 de noviembre de 2010.

2.2.2 Obtención de extractos por el método SFE (CO₂)

Para este tipo de extracción se utilizó un equipo extractor SFE-2000 (Thar technologies, Pittsburgh EE.UU.) Se introdujeron ca. 300 g del material vegetal en el cilindro extractor y se ajustaron las condiciones de temperatura y presión para cada planta bajo estudio, como se indica en la **Tabla 7**. Las mejores condiciones fueron establecidas, en su trabajo de maestría, por Carlos Alberto Ruiz Nova (CENIVAM, 2010).



Figura 19. Extractor SFE-2000 (Thar technologies, Pittsburgh EE.UU.). Fotografía tomada en CENIVAM, el 17 de noviembre de 2010.

Tabla 7. Condiciones usadas para llevar a cabo la extracción de metabolitos secundarios por SFE.

Planta	Flujo, g/min	Temperatura, °C	Presión, bar
<i>L. origanoides</i>	40	50	500
Romero	40	50	400
Salvia	40	50	300

2.3 PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS POR GC-MS

De los extractos y los AE obtenidos por SFE (CO₂) y MWHD, respectivamente, se retiró el agua que pudo haberse adicionado durante el proceso, antes de su análisis por GC-MS. Para esto, se utilizó sulfato de sodio anhidro, el cual se añadió al recipiente que contenía el aceite o el extracto. Para los AE obtenidos por MWHD, se mezclaron aceite (50 µL) y *n*-tetradecano (patrón interno, 1 µL) y la mezcla se aforó a 1,0 mL, con diclorometano. Al extracto obtenido por SFE se agregó diclorometano (1,5 mL), se filtró y se adicionó 1 µL de patrón interno luego, y se concentró con una

corriente de nitrógeno (AGA Fano S.A, Bucaramanga, Colombia.) hasta un volumen de 1 mL.

Con el objetivo de realizar una caracterización química completa de los metabolitos secundarios presentes en la *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis* y *Lippia origanoides*, se empleó la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), usando una columna de fase estacionaria apolar, así como se describe a continuación.

2.3.1 Análisis GC en columna apolar

El análisis cromatográfico y los espectros de masas de las muestras se obtuvieron en un equipo *Agilent Technologies 6890 Plus Series GC System* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5973 Network (Mass Selective Detector)* y equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250°C, relación de *split* 30:1), un inyector automático *Agilent Technologies 7863* y un *Autosampler Agilent Technologies 7863 Series* (Véase **Figura 20**). La separación de los analitos se realizó en una columna capilar apolar DB5-MS (*J&W Scientific Folsom, CA, EE.UU.*) de 60m x 0,25 mm., D.I. x 0,25 μm , d_f , con una fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano). El gas de arrastre empleado en el análisis fue helio (99,995%, Aga Fano, Bucaramanga, Colombia), con una presión de entrada en la cabeza de columna de 16,47 psi. La temperatura del horno se programó desde 45°C (5 min) @ 4°C/min hasta 150°C (2 min) y se incrementó a razón de 5 °C/min hasta llegar a 250°C, donde permaneció isotérmicamente 5 min y, finalmente, aumentó @ 10°C/min hasta 275°C, temperatura, a la cual permaneció constante durante 15 min. Los espectros de masas se obtuvieron por impacto con electrones (EI) de energía de 70 eV. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia se mantuvieron a 230 y 285°C, respectivamente. Los espectros de masas y las corrientes iónicas totales (TIC, por sus siglas en inglés, *Total Ion Current*) se obtuvieron en un analizador cuadrupolar, por medio de barrido automático de frecuencia (*full scan*), en el rango de masas de m/z 40-350. Los datos cromatográficos fueron adquiridos y procesados con el sistema de datos

Hewlett- Packard MSChemStation G17001DA (Versión D 00.01.27, 2002), que incluye las bases de datos Wiley, NIST y Adams 2004.



Figura 20. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus Series GC System* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5973 Network*, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* y un inyector automático *Agilent 7863*. Fotografía tomada en el Laboratorio de Cromatografía de la UIS, el 17 de noviembre de 2010.

2.3.2 Identificación

La identificación de los analitos presentes en el aceite esencial se realizó por comparación de sus índices de retención y patrones de fragmentación en los espectros de masas obtenidos, con los existentes en las bases de datos de espectros, o en la literatura científica [69]. Los índices de retención [70] se calcularon teniendo en cuenta los tiempos de retención de una serie homóloga de patrones de hidrocarburos desde C10 hasta C25, que se corrieron en el GC bajo las mismas condiciones operacionales que las empleadas para el análisis de los aceites esenciales. Para su determinación se empleó la siguiente ecuación:

$$I_R = 100n + 100 \left[\frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right]$$

Donde:

I_R : Índice de retención del compuesto de interés;

n : Número de átomos de carbono del n -alcano que eluye antes del compuesto de interés;

N : Número de átomos de carbono del n -alcano que eluye después del compuesto de interés;

t_{Rx} : Tiempo de retención del compuesto de interés;

t_{RN} y t_{Rn} : Tiempos de retención de n -alcanos que eluyen antes y después del compuesto x .

2.3.3 Cuantificación

La cuantificación de los metabolitos identificados se realizó mediante el método de estandarización interna, empleando como patrón interno, n -tetradecano, $Istd$, según la ecuación:

$$C_x = \frac{C_{Istd} \times A_x}{C_{Istd}}$$

Dónde:

C_x : Concentración (g/L) del analito en la muestra;

C_{Istd} : Concentración (g/L) del $Istd$ (n -tetradecano)

A_x : Área del pico cromatográfico del analito, *cuentas*;

A_{Istd} : Área del pico cromatográfico del $Istd$, *cuentas*.

2.4 VALIDACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO

2.4.1 Análisis por GC/ECD del derivado PFPH del hexanal

El análisis cromatográfico del derivado PFPH del hexanal se realizó en un cromatógrafo de gases HP-5890 *Series II*, equipado con un puerto de inyección *split/splitless*, columna HP-5 [30 m, 0.25 mm di, 0.25 μ m, fase estacionaria: 5%-fenil poli(metilsiloxano)] y detector de captura de electrones (ECD, ^{63}Ni), un inyector automático HP 7683, y un sistema de datos HP *ChemStation* HP Rev. A.06.03. Las temperaturas del inyector y detector permanecieron a 260 y 280°C, respectivamente. La programación de temperatura de la columna fue de 100°C (5 min) hasta 250°C (2 min) @ 10°C/min. Se utilizó helio como gas de arrastre (99.995%, Aga-Fano S.A.) con un flujo en la columna de 1.0 mL/min (70°C), relación *Split* 10:1 y como gas auxiliar en el ECD argón/metano (9:1), con flujo de 20 mL/min.



Figura 21. Cromatógrafo de gases HP-5890 *Series II*, equipado con un puerto de inyección *split/splitless*, columna HP-5 (30 m, 0.25 mm di, 0.25 μ m, fase estacionaria: 5 % fenil poli(metilsiloxano)) y detector de captura de electrones (ECD, ^{63}Ni), un inyector automático HP 7683, y un sistema de datos HP *ChemStation* HP Rev. A.06.03. Fotografía tomada en el Laboratorio de Cromatografía de la UIS, el 17 de noviembre de 2010.

2.4.2 Determinación de la reproducibilidad de las áreas cromatográficas del derivado PFPH del hexanal

Para el estudio de la reproducibilidad de las áreas cromatográficas del derivado PFPH del hexanal, se emplearon los datos obtenidos por GC/ECD y los derivados hidrazónicos, en ausencia y presencia de los diferentes aceites esenciales, extractos y compuestos de referencia utilizados en el presente estudio. Todos los análisis se hicieron por duplicado para efectos de determinar la reproducibilidad del método.

Para calcular los valores promedio de las áreas cromatográficas (\bar{X}), las desviaciones estándar (σ) y los coeficientes de variación (CV, %) se emplearon las ecuaciones que se muestran a continuación:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad \sigma = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{(n-1)}} \quad CV = \frac{\sigma}{\bar{X}} \times 100\%$$

Donde:

\bar{X} = Valor promedio de la variable X (área);

X_i = Valor "iésimo" obtenido para la variable X en una medición;

n = Número de mediciones;

σ = Desviación estándar;

CV = Coeficiente de variación (%).

2.5 DISEÑO DE LOS SISTEMAS LIPÍDICOS PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Se determinó la actividad antioxidante (anti-radicalaria) de los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* L., *Lippia origanoides* L., y *Salvia officinalis* L., a través del análisis de los compuestos carbonílicos, producidos por radiación UVA, utilizando la técnica HS-SPME con la derivación del hexanal *in-situ* sobre la fibra. Los sistemas

evaluados fueron: el aceite de girasol (Sistema I) y crema cosmética (o/w) (Sistema II). A cada uno de los sistemas se le adicionaron vitamina E y BHT, como compuestos de referencia, aceites esenciales, extractos o mezclas (1:1).

2.5.1 Generación del hexanal en los Sistema Lipídico I y II sometido a la radiación UVA

La degradación oxidativa del aceite de girasol o de la crema cosmética (o/w), acelerados por acción de la radiación UVA, se evaluó tomando 400 mg del aceite vegetal o de la crema cosmética, que se colocaron en tubos de poli(propileno) y se irradiaron en el reactor ultravioleta (**Figura 22**) por 12 h, tiempo en el cual se obtiene una señal suficientemente intensa y reproducible, para la determinación de hexanal por GC/ECD en forma de su derivado hidrazónico, según describe Contreras [3]. Todos los ensayos en el presente estudio se hicieron por duplicado.

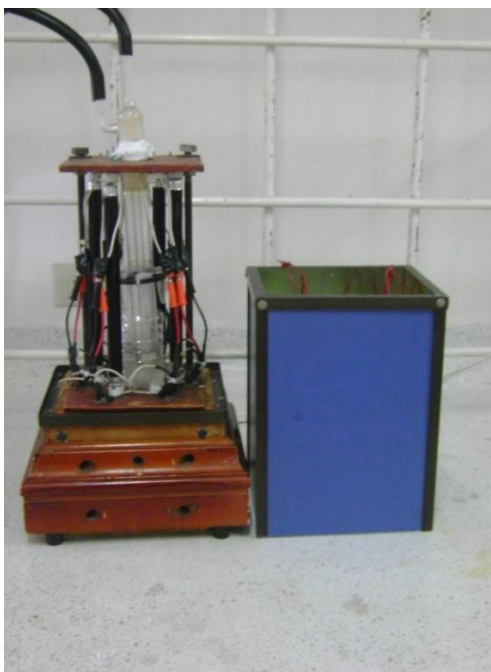


Figura 22. Reactor UVA utilizado para el estudio de la peroxidación lipídica en los sistemas estudiados. Fotografía tomada en CENIVAM, el 17 de septiembre de 2010.

2.5.2 Derivación y extracción simultánea por HS-SPME del hexanal sobre la fibra

Este procedimiento se realizó acorde con la metodología descrita por Stashenko y colaboradores [65]. Primero, la fibra [65 μm , poli-(dimetilsiloxano)/divinilbenceno, PDMS/DVB] se saturó con agente derivatizante, PFPH, exponiéndola a los vapores de una solución acuosa (2 mL) de PFPH (500 ppm) durante 10 min a temperatura ambiente y con agitación (500 rpm). La fibra saturada, de inmediato, se colocó por 40 min a una temperatura de 42 °C, en el espacio de cabeza de un tubo cónico que contenía 400 mg del Sistema Lipídico sometido a peroxidación según se describe en el **Numeral 2.5.1**. Una vez derivados los compuestos carbonílicos sobre la fibra, se desorbieron térmicamente en el puerto de inyección del GC/ECD durante 4 min a 260°C.

2.6 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN-VITRO* DE LOS AE DE *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis* y *Lippia origanoides*

2.6.1 Estudio de la actividad antioxidante *in-vitro* de los AE y extractos

Se realizaron ensayos para determinar la actividad antioxidante (AA) de los aceites esenciales y extractos en los Sistemas Lipídicos siguiendo la metodología descrita en el **Numeral 2.5.2**. El rango utilizado de agente antioxidante en una crema cosmética (o/w) en los Laboratorios MYN & CIA LTDA (Bogotá, Colombia) es 0,5–1,0% p/p y para esta investigación se empleó 0,5% p/p. La evaluación de la AA se llevó a cabo adicionando 2 mg de vitamina E, BHT, AE o extracto en los Sistemas Lipídicos (398 mg).

En todos los ensayos, se utilizaron blancos de aceite de girasol y crema cosmética (o/w), por un tiempo determinado, como se enuncia en el **Numeral 2.5.1**.

La AA de los diferentes sistemas se calculó con base en el hexanal generado, empleando la siguiente fórmula:

$$AA_{\text{Hexanal}} = \frac{[A_B - A_M]}{A_B} \times 100\%$$

Donde

AA_B = Área del pico cromatográfico del hexanal en el cromatograma del “blanco”;

AA_M = Área del pico cromatográfica del hexanal en la muestra.

Cada una de las pruebas fue realizada por duplicado, para efectos de la determinación de la reproducibilidad de los ensayos y la precisión de los métodos empleados.

2.6.2 Estudio de la posible interacción entre dos posibles antioxidantes

Para evaluar la interacción entre los AE y extractos se prepararon sus mezclas binarias al 0,5% (p/p), de la siguiente manera: se tomaron 1 mg de cada AE o extracto y se adicionaron a 398 mg de cada Sistema Lipídico. La AA se evaluó a través de la cuantificación del hexanal generado, para lo que se utilizó la ecuación del **Numeral 2.6.1**.

3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

3.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS AE Y EXTRACTOS

Para la obtención de los aceites esenciales y extractos se siguió la metodología descrita en el **Numeral 2.2**. Los rendimientos (% p/p) de *L. organoides*, *R. officinalis* y *S. officinalis*, las se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Rendimientos (%) de los AE y extractos obtenidos por las técnicas MWHD y SFE, respectivamente.

PLANTA	Rendimiento, %	
	MWHD	SFE
<i>Rosmarinus officinalis</i>	0,9	3,0
<i>Salvia officinalis</i>	0,8	2,2
<i>Lippia organoides</i>	0,6	3,2

La **Figura 23** muestra los perfiles cromatográficos obtenidos por GC-MS con columna capilar DB-5MS, con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano) (60m), de los metabolitos secundarios volátiles presentes en la *Lippia organoides*.

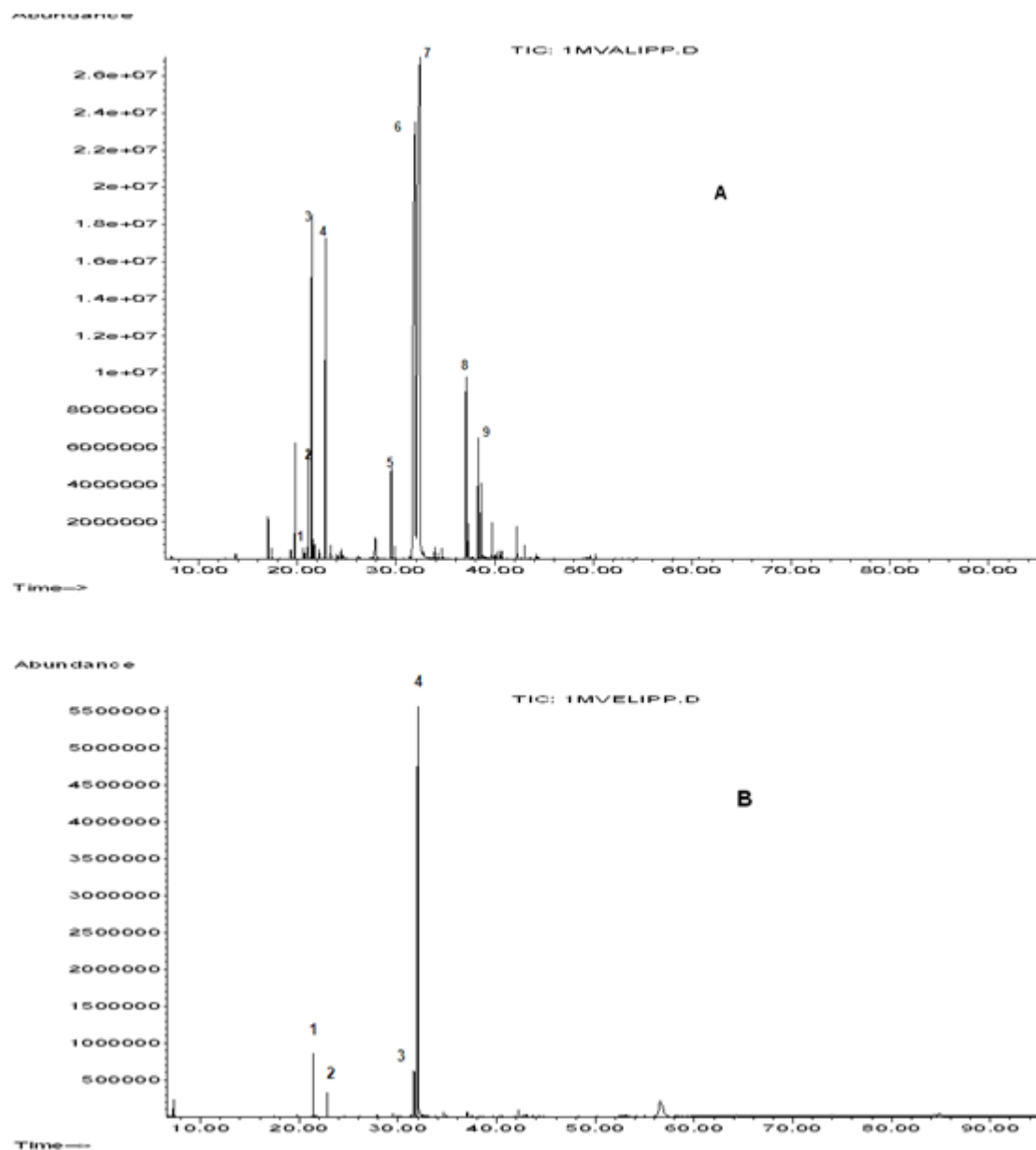

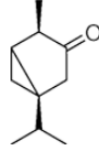
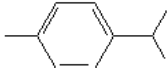
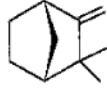
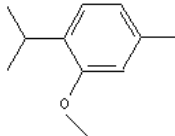
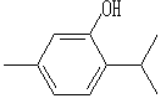
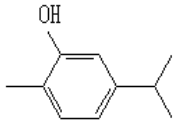
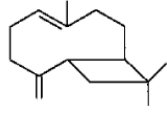
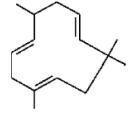


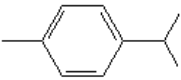
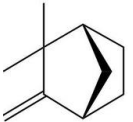
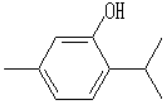
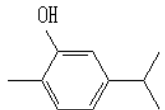
Figura 23. Perfiles cromatográficos típicos del AE y extracto obtenidos de hojas de *Lippia organoides*. **A.** MWHD. **B.** SFE. Columna DB-5 (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV). La identificación de los compuestos se reporta en las **Tablas 9 y 10**.

Tabla 9. Compuestos principales (>1.0%) en el AE obtenido de hojas *L. origanoides* por MWHD.

N° de Pico*	Compuesto	I _R DB-5	Cantidad relativa, %	Estructura
1	Triciclono	1012	1,2	
2	α -Tuyona	1010	1,5	
3	<i>p</i> -Cimeno	1026	7,2	
4	Canfeno	1064	6,8	
5	Timol metil éter	1235	1,2	
6	Timol	1289	31,9	
7	Carvacrol	1299	32,4	
8	<i>cis</i> - Cariofileno	1417	3,0	
9	α -Humuleno	1468	1,7	

*Número de pico en la **Figura 23A.**

Tabla 10. Compuestos principales (>1.0%) en el extracto obtenido de hojas *L. organoides* por SFE (CO₂).

N° de Pico*	Compuesto	I _R DB-5	Cantidad relativa, %	Estructura
1	<i>p</i> -Cimeno	1029	7,3	
2	Canfeno	1062	2,6	
3	Timol	1290	5,2	
4	Carvacrol	1300	60,1	

*Número de pico en la **Figura 23B**.

Para el aceite esencial de *Lippia organoides*, empleado en este trabajo, se encontraron como compuestos mayoritarios los siguientes: carvacrol (32,4%), timol (31,9%), timol metil éter (29,5%), *p*-cimeno (7,2%) y *cis*- cariofileno (3,0%). Algunos de estos compuestos como el carvacrol y timol, que también se encuentran presentes en el extracto exhiben propiedades antioxidantes e inhibidoras de la peroxidación lipídica [3].

La **Figura 24** muestra los perfiles cromatográficos obtenidos por GC-MS en la columna capilar DB-5MS, con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano) (60m), de los metabolitos secundarios volátiles presentes en la *Salvia officinalis*.

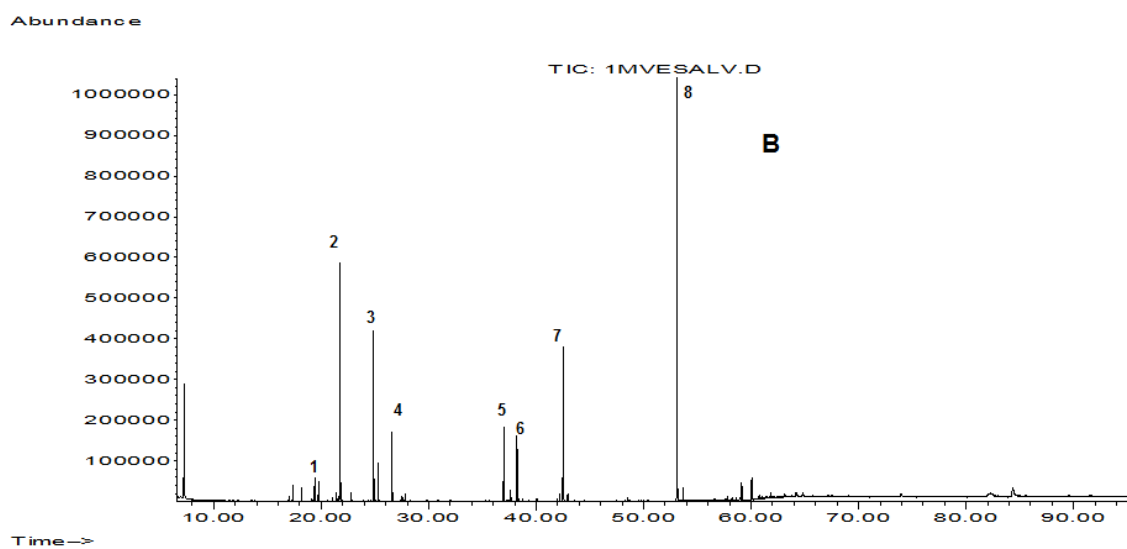
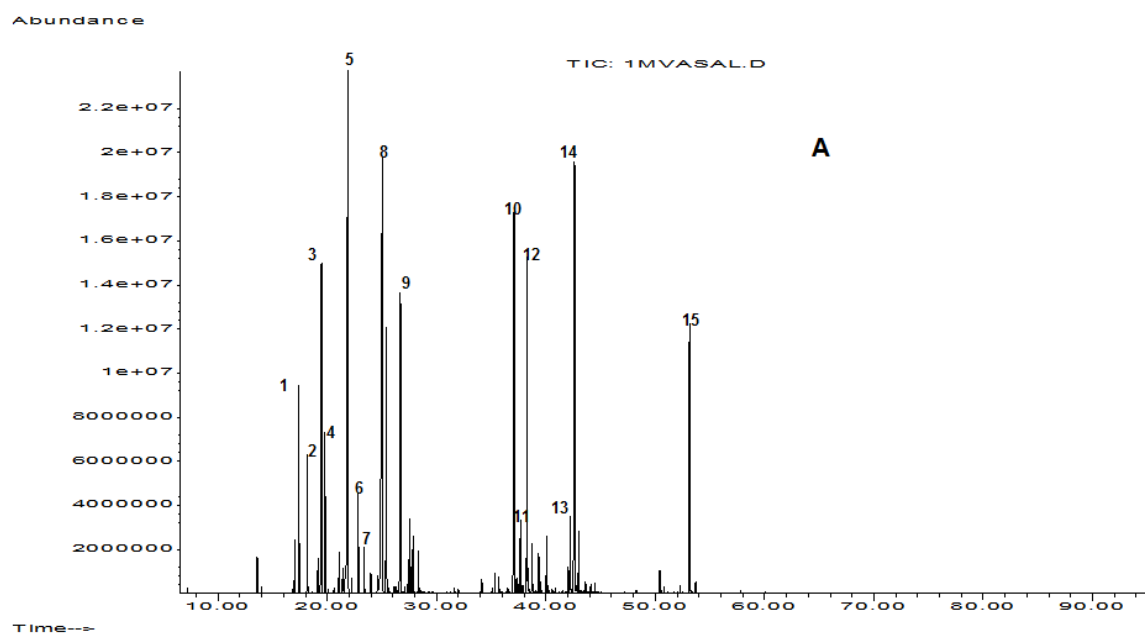


Figura 24. Perfiles cromatográficos típicos del AE y extracto obtenidos de hojas de *Salvia officinalis*. **A.** MWHD. **B.** SFE. Columna DB-5 (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV). La identificación de los compuestos se reporta en las **Tablas 11 y 12.**

Tabla 11. Compuestos principales (>1.0%) en el AE de *Salvia officinalis* obtenido por MWHD de sus hojas.

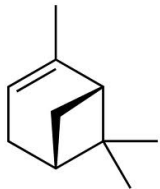
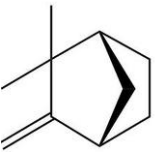

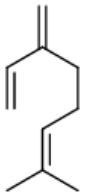
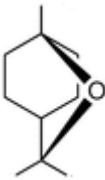
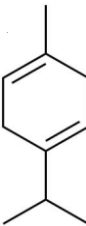
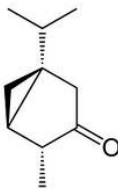
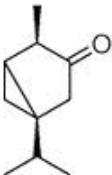
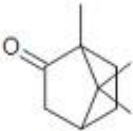
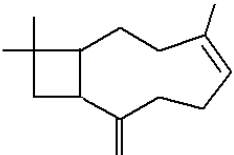
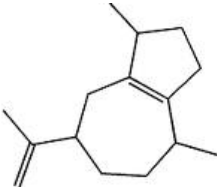
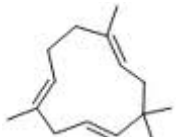
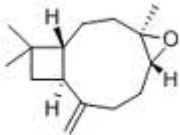
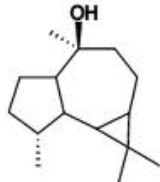
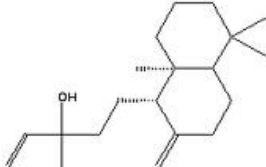
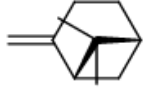
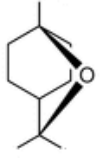
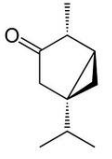
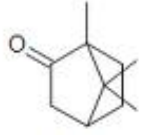
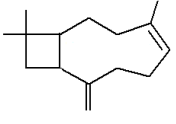
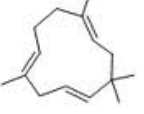
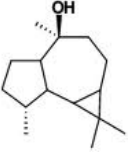
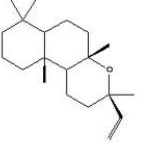
N° Pico*	Compuesto	I _R DB-5	Cantidad relativa, %	Estructura
1	α-Pineno	937	2,7	
2	Canfeno	955	1,8	
3	β-Pineno	983	5,9	
4	Mirceno	991	2,2	
5	1,8-Cineol (Eucaliptol)	1041	17,9	
6	γ-Terpineno	1063	1,1	
7	α-Tuyona	1117	15,7	

Tabla 11. Continuación.

8	β -Tuyona	1126	4,4	
9	Alcanfor	1158	5,6	
10	<i>trans</i> - β -Cariofileno	1436	7,4	
11	α -Guaieno	1453	1,0	
12	α -Humuleno	1472	5,6	
13	Oxido de cariofileno	1598	1,0	
14	Viridiflorol	1614	9,1	
15	Manool	2078	3,2	

*Número de pico en la **Figura 24A.**

Tabla 12. Compuestos principales (>1.0%) en el extracto de *Salvia officinalis* obtenido SFE (CO₂) de sus hojas.

N° Pico*	Compuesto	I _R DB-5	Cantidad relativa, %	Estructura
1	β-Pineno	982	1,8	
2	1,8-Cineol (Eucaliptol)	1037	17,0	
3	α-Tuyona	1111	12,1	
4	Alcanfor	1155	5,2	
5	<i>trans</i> -β-Cariofileno	1433	5,4	
6	α-Humuleno	1469	4,7	
7	Viridiflorol	1610	10,8	
8	Manool	2076	26,7	

*Número de pico en la **Figura 24B**.

En el aceite esencial de salvia, se encontraron los siguientes compuestos mayoritarios: 1,8-cineol (17,9%), α -tuyona (15,7%), viridiflorol (9,1%), *trans*- β -cariofileno (7,4%), β -pineno (5,9%) y alcanfor (5,6%). Compuestos, como el manool y viridiflorol presentes en el AE y extracto, son más propensos de ser extraídos en mayor cantidad por SFE debido a su peso molecular más alto. En esta planta, se identificaron hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos como el canfeno, *p*-cimeno, *trans*- β -cariofileno y α -humuleno; entre los alcoholes diterpénicos, el manool. Se observa también que los componentes oxigenados representan más del 70% del AE y extracto de *Salvia officinalis*.

La **Figura 25** muestra los perfiles cromatográficos obtenidos por GC-MS en la columna capilar DB-5MS, con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano) (60m), de los metabolitos secundarios volátiles presentes en la planta (hojas) de *Rosmarinus officinalis*.

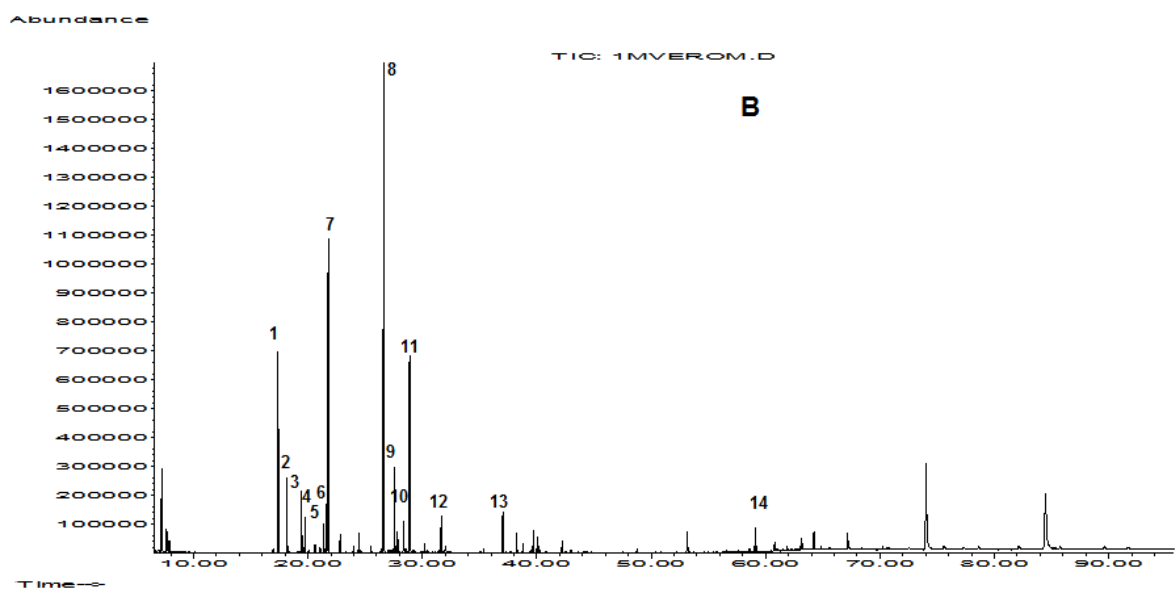
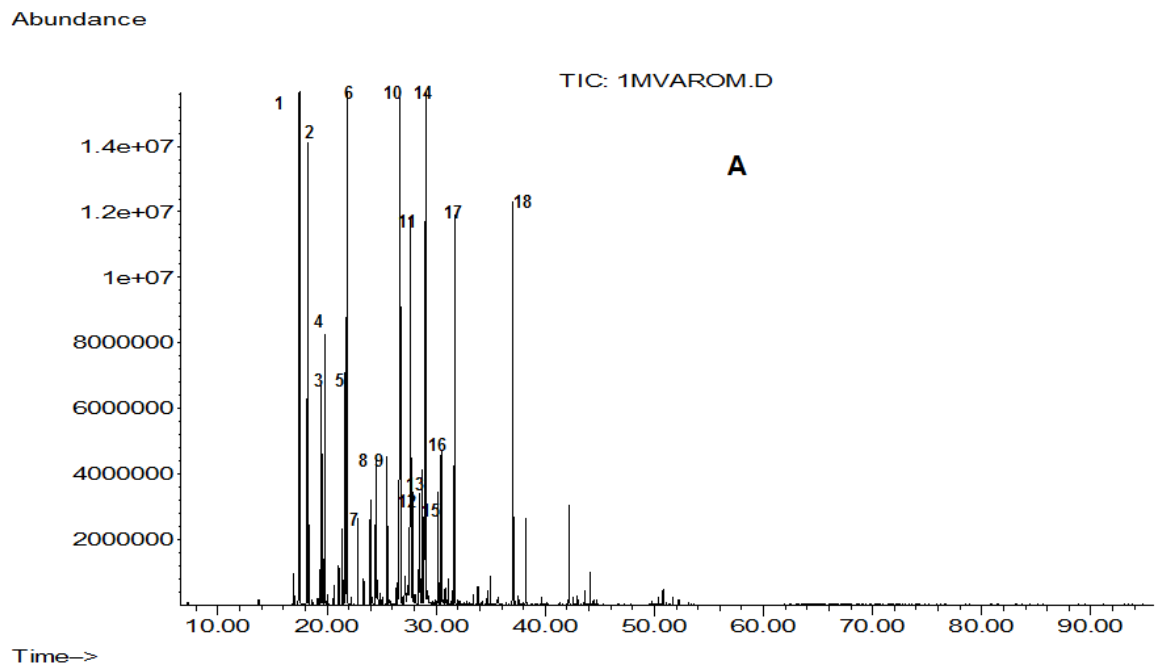


Figura 25. Perfiles cromatográficos típicos del AE y extracto obtenidos de hojas de *Rosmarinus officinalis*. **A.** MWHD. **B.** SFE. Columna DB-5 (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV). La identificación de los compuestos se reporta en las **Tabla 13** y **14**.

Tabla 13. Compuestos principales (>1.0%) en el AE de *Rosmarinus officinalis* por MWHD de sus hojas


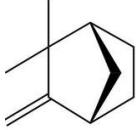

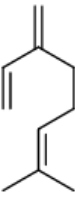
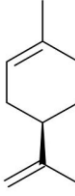
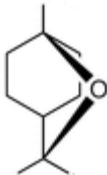
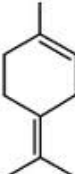
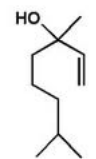
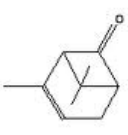
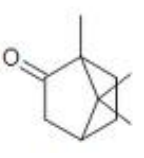
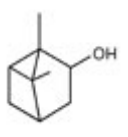
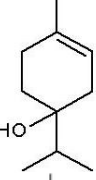

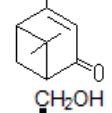


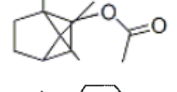
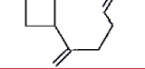
N° Pico*	Compuesto	I _R DB-5	Cantidad relativa, %	Estructura
1	α -Pinoeno	939	15,0	
2	Canfeno	956	5,5	
3	β -Pinoeno	983	2,2	
4	Mirceno	991	2,6	
5	Limoneno	1034	3,3	
6	1,8-Cineol (Eucaliptol)	1039	7,1	
7	Terpinoleno	1090	1,0	

Tabla 13. Continuación

8	Linalool	1102	1,8	
9	Crisantenona	1128	1,5	
10	Alcanfor	1159	9,3	
11	Borneol	1183	6,5	
12	Terpinen-4-ol	1188	1,0	
13	α -Terpineol	1204	1,7	
14	Verbenona	1220	12,1	
15	<i>cis</i> -Mirtanol	1259	1,3	
16	<i>trans</i> -Mirtanol	1258	1,6	
17	Acetato de bornilo	1292	4,5	
18	<i>trans</i> - β -Cariofileno	1435	4,8	

*Número de pico en la **Figura 25A.**

Tabla 14. Compuestos principales (>1.0%) en el extracto de *Rosmarinus officinalis* obtenido por SFE (CO₂) de sus hojas.

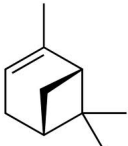
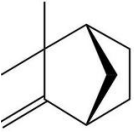

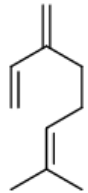
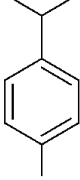
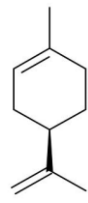
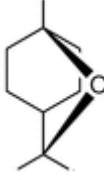
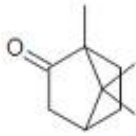
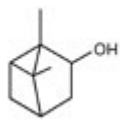
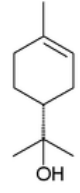
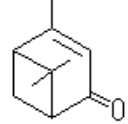
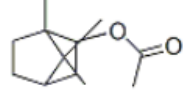
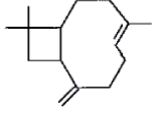
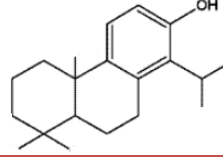
N° Pico*	Compuesto	I _R DB-5	Cantidad relativa, %	Estructura
1	α-Pineno	937	8,8	
2	Canfeno	954	3,2	
3	β-Pineno	882	2,6	
4	Mirceno	990	1,4	
5	p-Cimeno	1028	1,2	
6	Limoneno	1033	2,1	
7	1,8-Cineol (Eucaliptol)	1037	14,1	

Tabla 14. Continuación

8	Alcanfor	1156	22,5	
9	Borneol	1180	4,0	
10	α -Terpineol	1014	1,6	
11	Verbenona	1215	8,8	
12	Acetato de bornilo	1202	1,8	
13	<i>trans</i> - β -Cariofileno	1435	2,0	
14	<i>trans</i> -Ferruginol	2347	1,2	

*Número de pico en la **Figura 25B**.

En el aceite esencial y extracto de romero se encontraron los siguientes compuestos mayoritarios: α -pineno (8,8%), verbenona (8,8%), alcanfor (22.5%), 1,8-cineol (14,1%), borneol (4,0%); y, de reconocida actividad antioxidante, α -pineno, terpinen-4-ol, canfeno y *trans*- β -cariofileno [65]. El aceite esencial de romero es rico en compuestos aromáticos como los monoterpenos oxigenados (linalol, verbenona, acetato de bornilo, etc.).

Previamente, en investigaciones realizadas en el Laboratorio de Cromatografía, CENIVAM, también se encontró que el aceite esencial de plantas como *L. organoides* y *R. officinalis* poseían actividad protectora contra la oxidación de los ácidos grasos insaturados [3].

3.2 ANÁLISIS POR GC/ECD DEL DERIVADO PFPH DEL HEXANAL

En el presente estudio, la cuantificación del hexanal se basó en la determinación de las áreas cromatográficas generadas por el derivado PFPH del hexanal, al ser éste el compuesto carbonílico volátil generado en una mayor proporción durante la degradación oxidativa del aceite de girasol, lo que también fue comprobado en los estudios realizados por Fuentes [71] y otros autores [72,73]. La identificación del derivado hidrazónico PFPH-hexanal se realizó por comparación entre los tiempos de retención (t_R) de las muestras irradiadas con el reportado en el patrón de hexanal, así como se llevó a cabo en los trabajos de Tafurt, G. (2003) [74], Contreras, N. (2002) [3], Puertas, M. A. (2002) [75] y Salgar, W. (2001) [76] (**Tabla 15**).

Tabla 15. Reproducibilidad de los t_R del derivado PFPH en la solución-patrón de hexanal y en los diferentes Sistemas Lipídicos estudiados.

Compuesto	t_R , min.	Promedio	σ	CV, %
Hexanal (patrón)	16,537	16,536	0,001	0,01
	16,535			
Hexanal (a. girasol)	16,532	16,531	0,001	0,01
	16,530			
Hexanal (crema cosmética)	16,489	16,491	0,001	0,01
	16,492			

El **Anexo A** muestra los perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD en los Sistemas Lipídicos, irradiados en el reactor UVA, donde se observa la formación del hexanal, analizado en forma de su derivado hidrazónico.

A partir de los resultados, y recordando que el hexanal es el principal producto de la degradación oxidativa del ácido linoléico presente en el aceite de girasol, este aldehído fue seleccionado como compuesto de referencia para determinar el grado de oxidación de los Sistemas Lipídicos.

3.3 ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE LOS AE Y EXTRACTOS EN ESTUDIO

3.3.1 Evaluación del Sistema Lipídico I, utilizando antioxidantes de origen natural y sintético

En esta etapa se evaluó la AA de la vitamina E y el BHT en el Sistema Lipídico I (aceite de girasol), tal como se describe en el **Numeral 2.6**, de la Parte Experimental. La vitamina E es el antioxidante natural por excelencia; por tal razón, se empleó como antioxidante de referencia en la degradación del aceite de girasol inducida por la radiación UVA, de esta manera se validaron los Sistemas Lipídicos.

La **Tabla 16** y la **Figura 26** muestran los efectos protectores de los dos antioxidantes utilizados en el Sistema Lipídico I. Se observa el efecto antioxidante durante la degradación oxidativa del aceite de girasol inducida por la luz UVA. Resultados obtenidos en los estudios realizados por Salgar [76], Contreras [3] y Fuentes [71] concuerdan con los observados en esta investigación: el efecto protector de la vitamina E, a una concentración de 0,5 %, fue superior al 50%. El efecto protector de los antioxidantes se determinó utilizando la relación donde se calcula el grado de protección de éstos, descrito en el **Numeral 2.7.1**, de la Parte Experimental. Todos los ensayos se realizaron por duplicado y se utilizó como blanco el aceite de girasol sin agregar el BHT o vitamina E.

El **Anexo B** muestra los perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD (Columna HP-5, 30 m), donde se muestra el efecto protector en el Sistema Lipídico I, irradiado con la luz UVA, de los antioxidantes de referencia.

Tabla 16. Efecto protector de la vitamina E y del BHT, en el Sistema Lipídico I (aceite de girasol).

Efecto protector, %					
	1	2	Promedio	σ	CV,%
Vitamina E	53,5	50,2	52	2,0	3,2
BHT	43,5	48,0	46	2,2	5,0

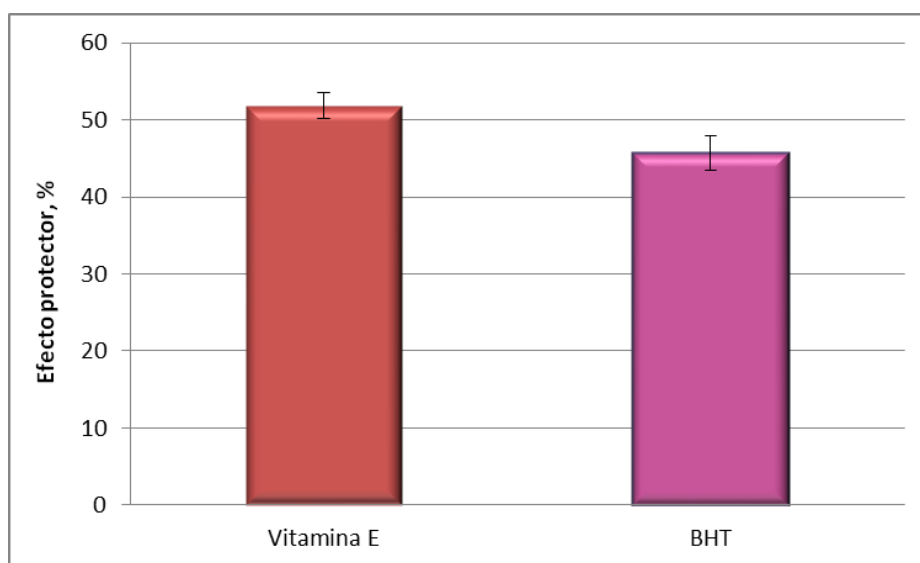


Figura 26. Evaluación del efecto protector de la vitamina E y del BHT, contra la peroxidación lipídica del aceite de girasol, acelerada por la radiación UVA.

3.3.2 Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de los aceites esenciales y extractos en el Sistema Lipídico I

En los **Numerales 2.6.1** y **2.6.2** de la Parte Experimental, se describe la metodología seguida para determinar la AA de los AE y extractos estudiados en el Sistema Lipídico I (aceite de girasol).

La **Tabla 17** y la **Figura 27** muestran los resultados obtenidos para los AE estudiados, y su comparación con los antioxidantes sintéticos, en la evaluación de sus efectos protectores contra la oxidación del aceite de girasol, sometido a la

degradación por la luz UVA. Se observa, que el AE de *L. origanoides* presenta el efecto protector más alto (33%), debido a los fenoles (timol y carvacrol) presentes. De acuerdo con los resultados obtenidos, los AE muestran un buen efecto protector en el Sistema Lipídico I, pero ninguno de ellos superó la AA ejercida por la vitamina E o BHT.

En el **Anexo C**, se observan los perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD (Columna HP-5, 30 m), donde se muestra el efecto protector de los AE en estudio en el Sistema Lipídico I irradiado con luz UVA.

Tabla 17. Efecto protector de los aceites esenciales en estudio, en el Sistema Lipídico I (aceite de girasol).

Aceite Esencial	Efecto protector, %				
	1	2	Promedio	σ	CV,%
<i>L.origanoides</i>	32,0	34,0	33	1,0	3.0
Romero	16,1	18,3	17	1,1	6,5
Salvia	31,1	31,8	31,4	0,3	1,1

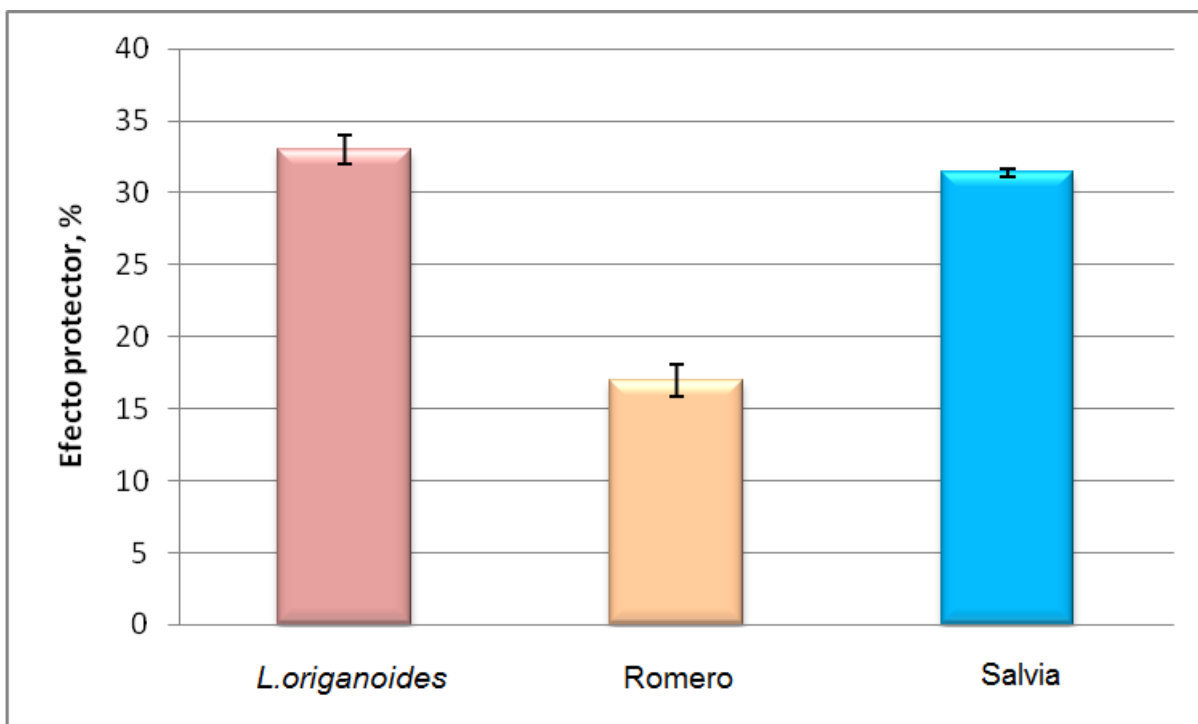


Figura 27. Evaluación del efecto protector de los AE en estudio, contra la peroxidación lipídica del aceite de girasol, acelerada por la radiación UVA.

En la **Tabla 18** y la **Figura 28** se muestran los resultados obtenidos para los extractos estudiados. Se puede observar cómo el extracto de *L. origanoides* exhibe el mayor efecto protector (50%) en una concentración de 0,5%, similar al de la vitamina E. En la **Figura 28** se puede observar, que el efecto protector de los extractos empleados es cercano al medido en los antioxidantes de referencia.

En el **Anexo D** se observan los perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD (Columna HP-5, 30 m), donde se muestra el efecto protector de los extractos en estudio en el Sistema Lipídico I irradiado con luz UVA.

Tabla 18. Efecto protector de los extractos en estudio en el Sistema Lipídico I (aceite de girasol).

Extractos	Efecto protector, %				
	1	2	Promedio	σ	CV,%
<i>L.origanoides</i>	52,3	47,9	50	2,2	4,4
Romero	39,3	42,9	41	1,9	4,6
Salvia	43,3	39,4	41	2,0	4,7

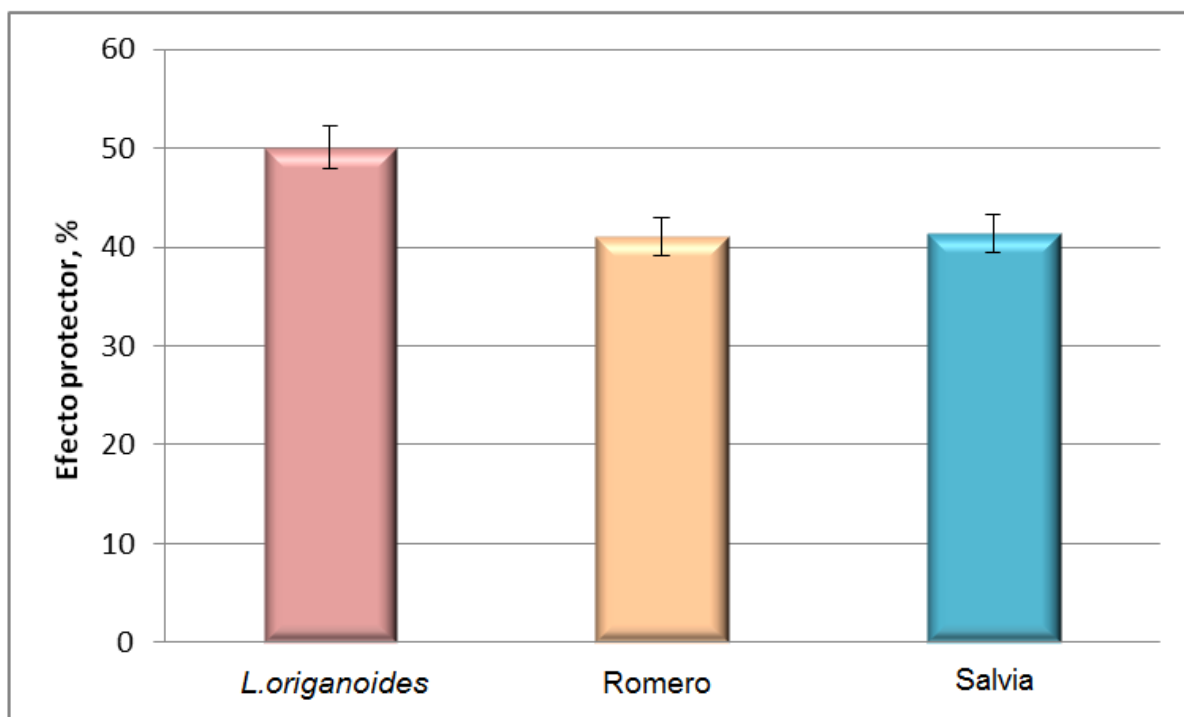


Figura 28. Evaluación del efecto protector de los extractos en estudio, contra la peroxidación lipídica del aceite de girasol, acelerada por la radiación UVA.

3.3.3 Estudio de la interacción de dos antioxidantes en el Sistema Lipídico I

Para este estudio se comparó la actividad antioxidante de AE puros en concentraciones de 0,5 % con la de las mezclas binarias (1:1) de estos mismos aceites.

Las mezclas de aceites esenciales de romero, *L. origanoides* y salvia, presentaron las actividades antioxidantes, que aparecen en la **Tabla 19** y en la **Figura 29**.

Tabla 19. Actividad antioxidante de las mezclas de aceites esenciales en el Sistema Lipídico I, evaluada a través de medición del hexanal.

Nombre	Efecto protector, %				
	1	2	Promedio	σ	CV,%
Romero- <i>L. origanoides</i>	54,1	54,1	54	0,0	0,0
<i>L. origanoides</i> -salvia	76,6	69,2	73	11,9	5,1
Romero-salvia	39,6	39,0	39,3	0,3	0,7

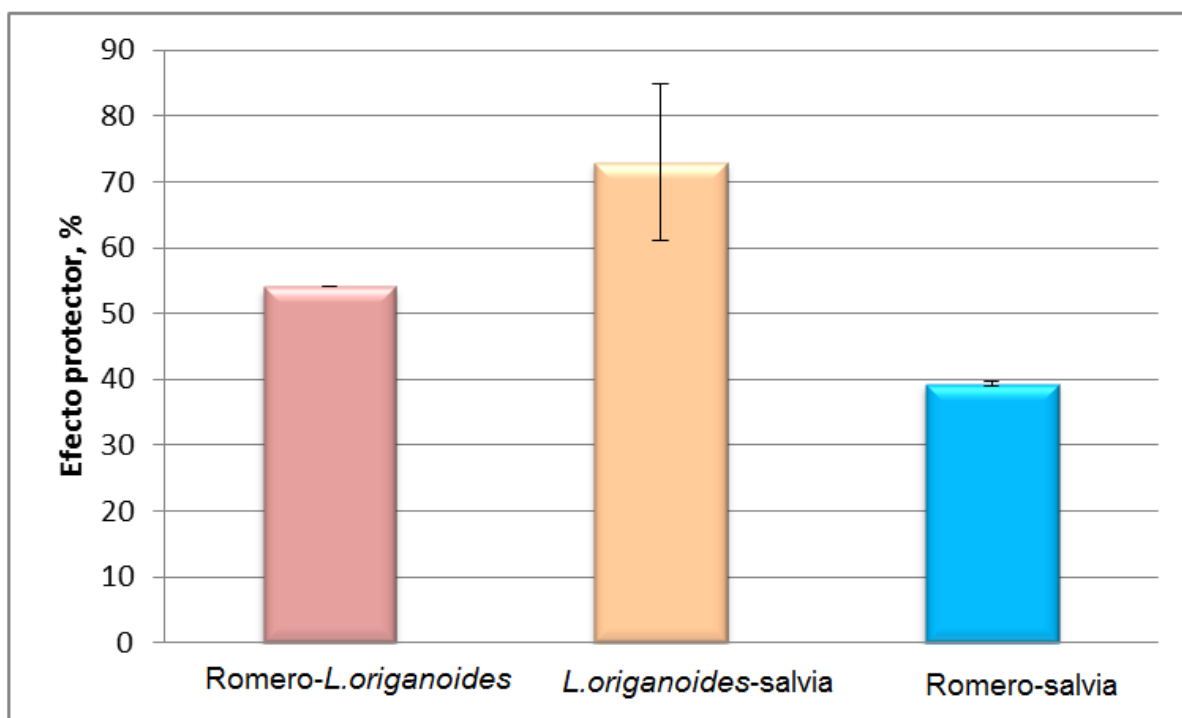


Figura 29. Evaluación del efecto protector de las mezclas de AE contra la peroxidación lipídica del aceite de girasol, acelerada por la radiación UVA.

En el **Anexo E** se observan los perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD (Columna HP-5, 30 m) donde se muestra el efecto protector sobre el Sistema Lipídico I sometido a la radiación con la luz UVA, de las mezclas de AE en estudio.

Las mezclas de los AE de romero-*L.origanoides* y romero-salvia mostraron una actividad antioxidante más baja en comparación con la observada para los antioxidantes de referencia vitamina E y BHT, sin embargo, la actividad antioxidante de la mezcla de AE de *L.origanoides*-salvia mostró una actividad mayor a los compuestos de referencia.

Con base en los resultados obtenidos de la mezcla de los AE de *L.origanoides*-salvia (1:1), se deduce una actividad antioxidante superior a la observada para vitamina E y BHT; esto se puede explicar debido a la presencia de fenoles, (ca 65 %) en el AE de *L.origanoides*.

Si se compara la actividad antioxidante de la mezcla de los AE *L. organoides*-salvia, se observa que es considerablemente más alta que la presentada por los AE individuales. También, se hace posible observar que la AA de las mezclas de los AE aumentó en comparación con la presentada por cada uno de los aceites esenciales.

En la **Tabla 20** y la **Figura 30** se muestran los resultados obtenidos con las mezclas (1:1) de los extractos bajo estudio. Según la gráfica, la actividad de la mezcla de extractos *L.origanoides*-salvia es más baja que la observada para cada extracto individual. Se observa un comportamiento similar para mezclas de extractos de *L.origanoides*-romero y romero-salvia en cuanto a su efecto protector sobre el Sistema Lipídico I. En todos los casos, la actividad antioxidante disminuyó en comparación con la observada para extractos individuales.

Tabla 20. Actividad antioxidante medida a través de la cuantificación del hexanal de las mezclas de extractos, empleadas en el Sistema Lipídico I.

Nombre	Efecto protector, %				
	1	2	Promedio	σ	CV,%
Romero- <i>L. origanoides</i>	51,6	43,7	48	4,0	8,3
<i>L. origanoides</i> -salvia	32,4	27,0	30	2,7	9,0
Romero-salvia	41,9	48,6	45	3,4	7,5

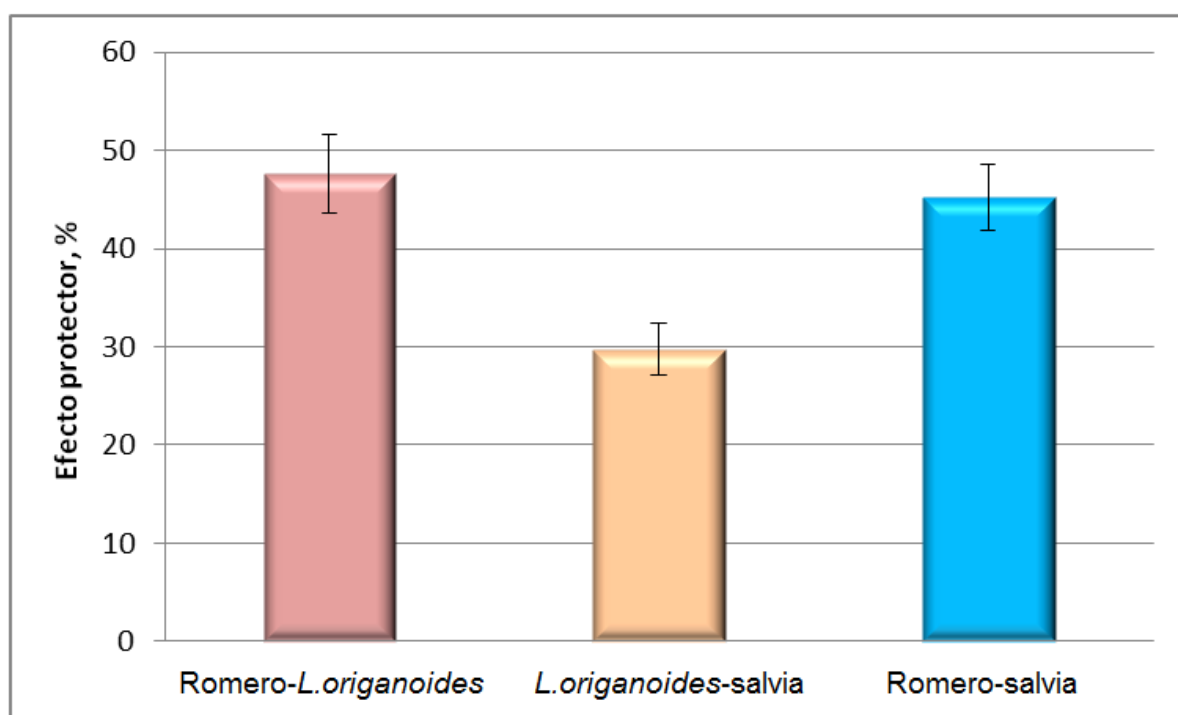


Figura 30. Evaluación del efecto protector de las mezclas de extractos contra la peroxidación lipídica del aceite de girasol, acelerada por la radiación UVA.

En el **Anexo F** se observan los perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD (Columna HP-5, 30 m), donde se muestra el efecto protector sobre el Sistema Lipídico I sometido a la radiación con luz UVA, de las mezclas de extractos en estudio.

El extracto de *L.origanoides* y la mezcla de extractos romero-*L.origanoides* presentaron un efecto protector similar al determinado para el BHT, a causa del alto contenido de compuestos antioxidantes presentes en estas plantas; de igual manera, cabe destacar, que la mezcla de los AE de *L.origanoides*-salvia presentó un efecto protector global mayor contra la oxidación del aceite de girasol, sometido a la degradación por la luz UVA. Caso contrario se presentó para el aceite esencial de romero y la mezcla de extractos romero-salvia, los cuales mostraron en el Sistema Lipídico I. el efecto protector menor.

3.3.4 Evaluación del Sistema Lipídico II, utilizando antioxidantes de origen natural y sintético

Durante esta parte del estudio se valoró la AA de la vitamina E y el BHT en el Sistema Lipídico II [crema cosmética (o/w)], tal como es descrito en el **Numeral 2.6.1**, de la Parte Experimental.

Los resultados obtenidos (Véase **Tabla 21** y **Figura 31**), indican que la vitamina E ejerce un efecto protector levemente mayor que el obtenido para el BHT, sometido a degradación oxidativa inducida por UVA, a una concentración de 0,5%.

Los perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD (Columna HP-5, 30 m) se muestran en el **Anexo G**, en el que se observa el efecto protector de los antioxidantes de referencia sobre el Sistema Lipídico II, sometido a la irradiación con luz UVA.

Tabla 21. Efecto protector de la vitamina E y BHT, en el Sistema Lipídico II [crema cosmética, (o/w)] sometido a radiación de la luz UVA.

Efecto protector, %					
	1	2	Promedio	σ	CV,%
Vitamina E	88,7	88,0	88,2	0,5	0,6
BHT	87,2	77,1	82	5,1	6,2

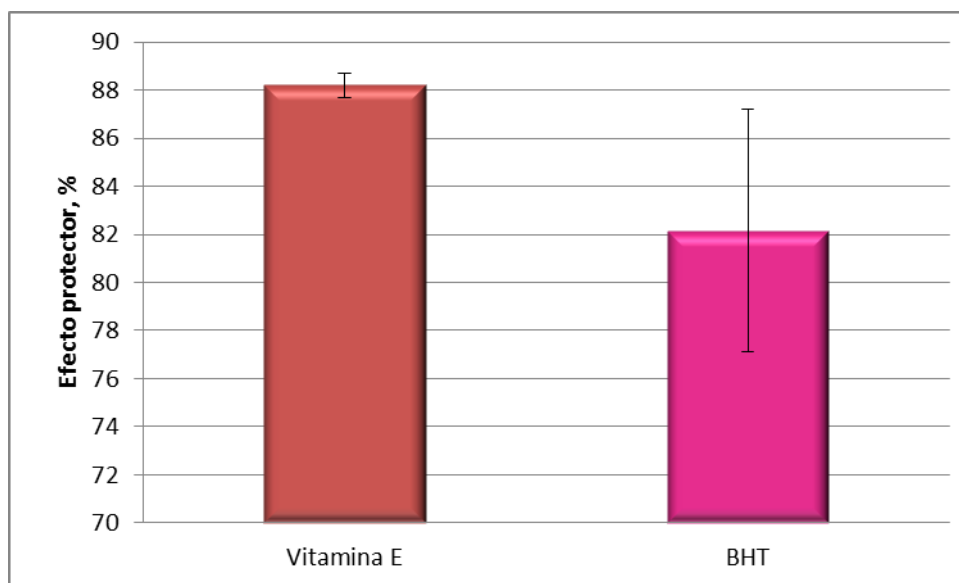


Figura 31. Evaluación del efecto protector de la vitamina E y BHT, contra la peroxidación lipídica de la crema cosmética, acelerada por la radiación UVA.

3.3.5 Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de los aceites esenciales y extractos en el Sistema Lipídico II

Para esta etapa del estudio de la AA se analizó el efecto protector que ejercen cada uno de los aceites y extractos en estudio, después de ser incorporados en el Sistema Lipídico II, utilizando la metodología descrita en el **Numeral 2.6.1**.

En la **Tabla 22** y la **Figura 32** se observa el comportamiento de los AE en una muestra de crema cosmética (o/w) irradiados por 12 h con luz UVA. Comparando el

efecto protector que cada uno de los aceites esenciales ejerce sobre el Sistema Lipídico, se evidencia que el AE de *L. origanoides* posee el mayor efecto protector (60%), propiedad atribuida al contenido alto de fenoles.

Así mismo, comparando la actividad del AE de *L. origanoides* con la de los respectivos compuestos de referencia (BHT y vitamina E), se observa, que estos últimos siguen mostrando el mayor efecto protector sobre el sistema tratado.

Tabla 22. Efecto protector de los aceites esenciales bajo estudio, en el Sistema Lipídico II [crema cosmética, (o/w)].

Aceites esenciales	Efecto protector, %				
	1	2	Promedio	σ	CV, %
<i>L.origanoides</i>	61,2	59,2	60	1,0	1,7
Romero	50,1	42,3	46	3,9	8,4
Salvia	52,4	52,7	52,6	0,2	0,3

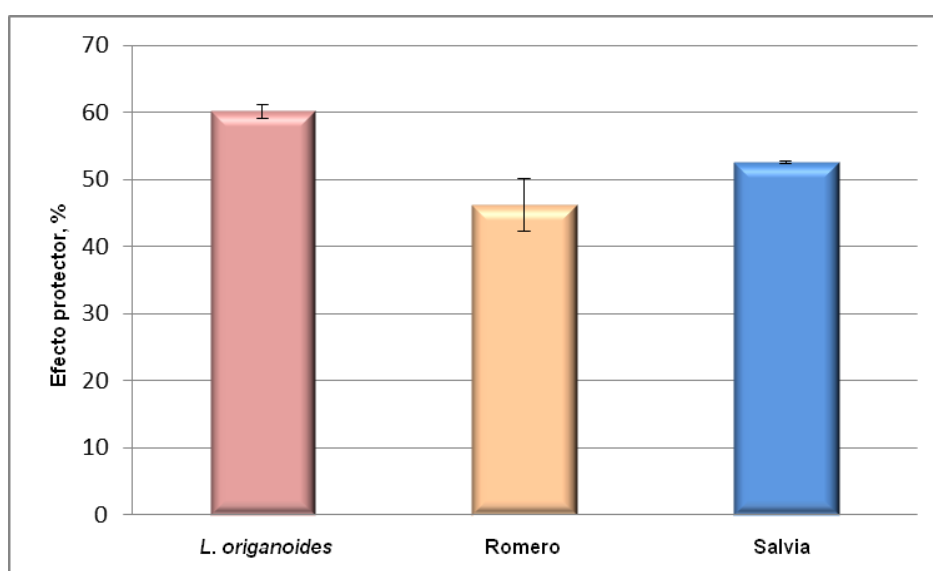


Figura 32. Evaluación del efecto protector de los AE, contra la peroxidación lipídica de la crema cosmética (o/w), sometida a la radiación UVA.

En el **Anexo H** se observan los perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD (Columna HP-5, 30 m) donde se muestra el efecto protector sobre el Sistema Lipídico II, irradiado con luz UVA, de los AE bajo estudio.

El efecto protector evaluado de los extractos adicionados a la crema cosmética (o/w), después de ser sometida a degradación oxidativa, se observa en la **Tabla 23** y la **Figura 33**, donde el extracto de romero presenta un efecto protector similar a la actividad mostrada por los compuestos de referencia, vitamina E (88,2%) y BHT (82%).

Tabla 23. Efecto protector de los extractos bajo estudio, en el Sistema Lipídico II [crema cosmética, (o/w)].

Extractos	Efecto protector, %				
	1	2	Promedio	σ	CV, %
<i>L. origanoides</i>	70,5	65,3	68	2,6	3,8
Romero	85,7	84,4	85,0	0,7	0,8
Salvia	70,6	79,3	75	4,4	5,8

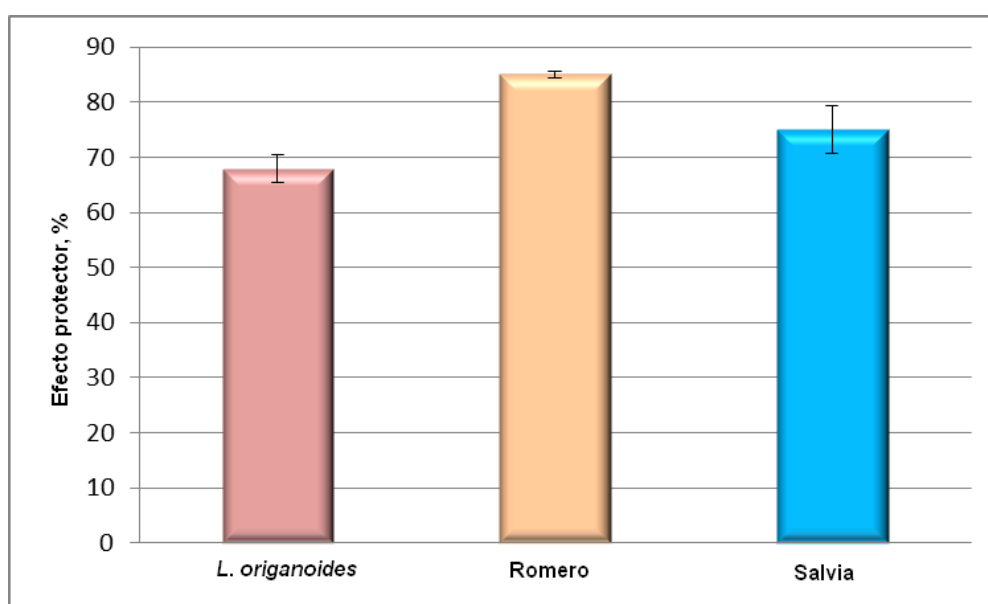


Figura 33. Evaluación del efecto protector de extractos, contra la peroxidación lipídica de la crema cosmética (o/w), sometida a la radiación UVA.

Al comparar el efecto protector obtenido para los extractos, compuestos de referencia y los AE, se deduce, que los primeros presentan el efecto protector contra la peroxidación lipídica sometida a radiación UVA, más pronunciado, en el Sistema Lipídico II,

En el **Anexo I**, se observan los perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD (Columna HP-5, 30 m) donde se muestra el efecto protector sobre el Sistema Lipídico modelo II irradiado con la luz UVA, de los extractos bajo estudio.

3.3.6 Estudio de la posible interacción entre dos antioxidantes

El efecto protector evaluado en las mezclas de aceites esenciales presentes en el Sistema Lipídico II, sometido a radiación UVA, se muestra en la **Tabla 24** y la **Figura 34**. De las mezclas bajo estudio, la del AE de *L. origanoides* y romero (74%) presentó el efecto protector más alto, a su vez, la actividad antioxidante fue mayor que para la ejercida de manera individual [*L. origanoides* (60%) y AE romero (46%)].

Tabla 24. Efecto protector de las mezclas de AE, en el Sistema Lipídico II [crema cosmética (o/w)].

Mezclas de AE	Efecto protector, %				
	1	2	Promedio	σ	CV, %
Romero- <i>L. origanoides</i>	70,7	77,1	74	3,2	4,3
Salvia-romero	54,7	49,2	52	2,7	5,3
<i>L. origanoides</i> -salvia	68,8	70,1	69,5	0,7	1,0

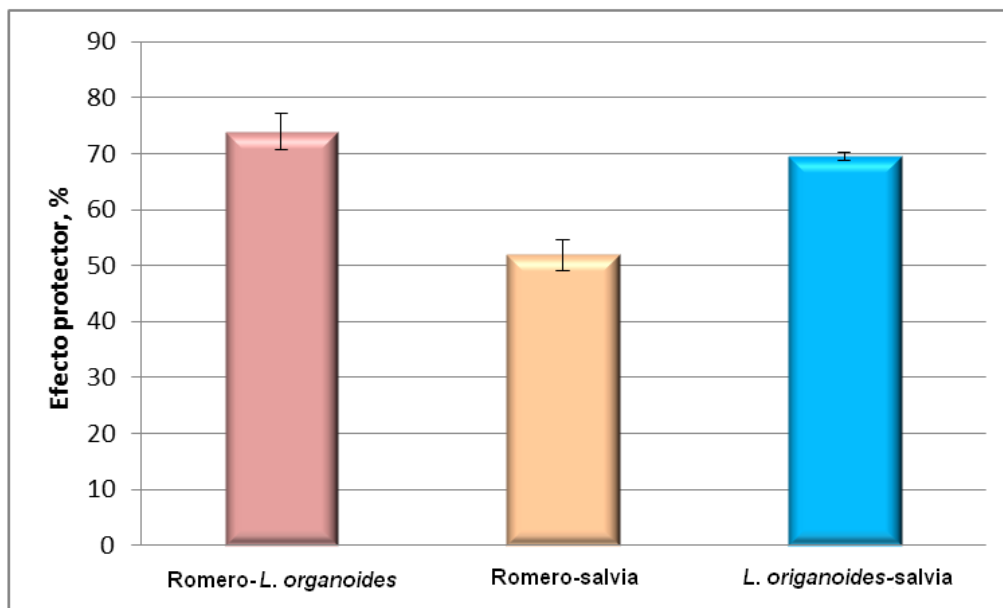


Figura 34. Evaluación del efecto protector de las mezclas de los AE, contra la peroxidación lipídica del Sistema Lipídico II, sometido a la radiación UVA.

En el **Anexo J**, se observan los perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD (Columna HP-5, 30 m), donde se muestra el efecto protector en el Sistema Lipídico II, irradiado con luz UVA, de las mezclas de los AE bajo estudio.

La **Tabla 25** y la **Figura 35** muestran el efecto protector evaluado en las mezclas de extractos presentes en el Sistema Lipídico II, después de ser expuestas a degradación oxidativa. Entre las mezclas evaluadas, la de extractos de romero-salvia presentó un efecto protector del 88% valor similar al obtenido para la vitamina E y el BHT, evaluados en el Sistema Lipídico II. Ello permite deducir, que esta mezcla es buen antioxidante frente al Sistema Lipídico evaluado.

Tabla 25. Efecto protector de las mezclas de extractos, en el Sistema Lipídico II [crema cosmética(o/w)].

Mezclas de Extractos	Efecto protector, %				
	1	2	Promedio	σ	CV, %
Romero- <i>L. origanoides</i>	77,9	75,4	77	1,3	1,6
Romero-salvia	88,6	87,3	88,0	0,6	0,7
<i>L. origanoides</i> -salvia	35,9	42,4	39	3,3	8,3

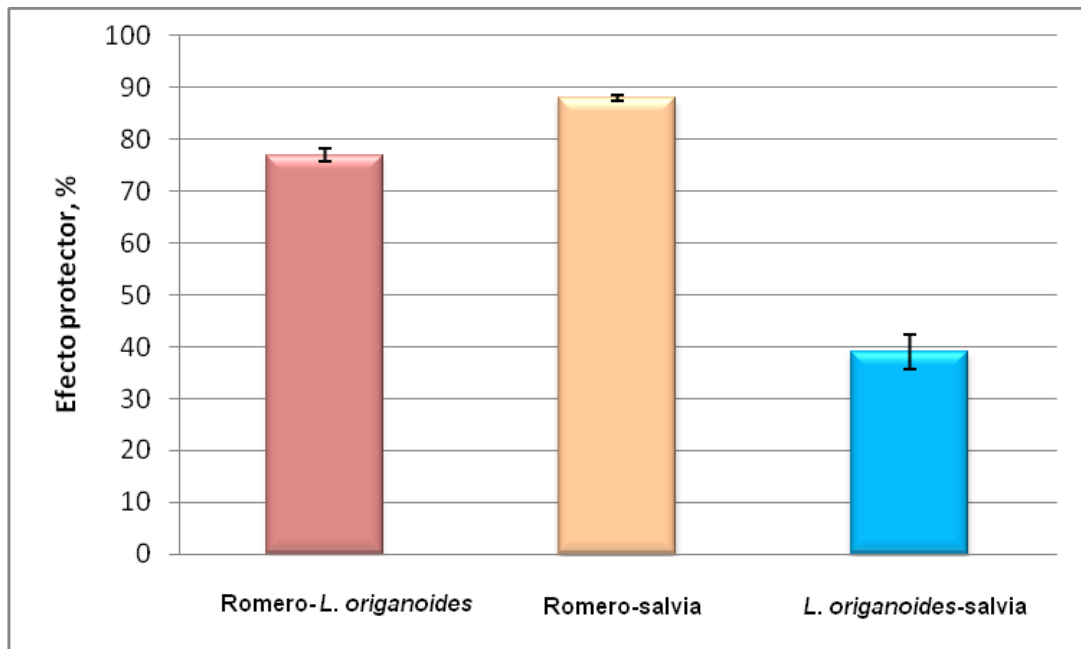


Figura 35. Evaluación del efecto protector de extractos, contra la peroxidación lipídica de la crema cosmética (o/w), acelerada por la radiación UVA.

El efecto protector mostrado por la mezcla de extractos de romero y salvia (88%) fue levemente mayor al presentado por el extracto de romero (85%) y por el extracto de salvia (75%), en este caso, el efecto protector no se incrementó cuando los extractos se mezclaron.

En el **Anexo K**, se observan los perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD (Columna HP-5, 30 m), donde se muestra el efecto protector en el Sistema Lipídico II, irradiado con luz UVA, de las mezclas de los extractos bajo estudio.

El efecto protector, más alto que se evaluó en el Sistema Lipídico II [crema cosmética (o/w)], donde se midió la AA de compuestos de referencia, AE y extractos, fue el que contenía la mezcla de los extractos salvia-romero (88%).

A diferencia del Sistema Lipídico I, todos los AE, extractos y mezclas en el Sistema Lipídico II, muestran que su efecto protector aumenta; esta diferencia puede ser explicada por la llamada “paradoja polar” [77], donde los antioxidantes lipofílicos resultan ser mejores para las emulsiones (o/w), porque se sitúan entre el agua y el aceite, protegiendo el aceite, mientras que los hidrofílicos se disuelven en la fase acuosa.

Al comparar el efecto protector de la vitamina E y el BHT en los dos sistemas, el BHT tiene el mayor efecto protector en el Sistema Lipídico II, mientras que en el Sistema Lipídico I, este compuesto presentó un efecto protector más bajo que la vitamina E.

En términos generales, todas las mezclas usadas, tanto de los AE, como de extractos permitieron una disminución de hexanal, aldehído monitoreado durante la oxidación inducida por la luz UVA, en los Sistemas Lipídicos estudiados.

Se demostró que los AE, extractos y sus mezclas binarias de *R.officinalis*, *L. origanoies* y *S. officinalis* presentaron efecto protector contra la oxidación de los dos Sistemas Lipídicos estudiados, disminuyendo la generación del hexanal, compuesto monitoreado durante la oxidación inducida por la luz UVA.

La mezcla de extractos de romero y salvia, como posible antioxidante empleado durante la degradación oxidativa de los Sistemas Lipídicos I y II, permitió disminuir

considerablemente (88%) la cantidad total del hexanal generado; y se convierte en el candidato más indicado, para ser incorporado como antioxidante natural en una crema cosmética (o/w).

4. CONCLUSIONES

1. Se evaluó la actividad antioxidante de la vitamina E, BHT, aceites esenciales y extractos de *Rosmarinus officinalis*, *Lippia origanoides* y *Salvia officinalis* en una crema cosmética (o/w) a través de la cuantificación del hexanal, en un sistema de reacción donde el deterioro oxidativo de los Sistemas Lipídicos se aceleró por medio de la radiación UVA.
2. Se evaluó el efecto protector sobre el Sistema Lipídico I (aceite de girasol) y Sistema Lipídico II [crema cosmética (o/w)], de las tres plantas empleadas en el presente estudio: *Rosmarinus officinalis*, *Lippia origanoides* y *Salvia officinalis*. Los resultados obtenidos muestran que la mezcla de extractos romero-salvia en concentración 0.5% presenta el efecto protector (88%), más alto de todas las mezclas evaluadas en este estudio, y superior al ejercido por los antioxidante de referencia vitamina E y BHT.
3. Se encontró que la mezcla de extractos romero-salvia en proporción (1:1) podría ser la indicada para reducir o reemplazar los antioxidantes sintéticos convencionales tales, como el BHT, en cremas cosméticas.

5. RECOMENDACIONES

1. En la mayoría de matrices lipídicas con un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, como es el caso del aceite de girasol, suceden reacciones de descomposición oxidativas, que conducen a la formación de diferentes productos finales, e.g., aldehídos, por lo tanto, es importante tener en cuenta en qué concentración se adiciona el agente antioxidante natural ya que se puede lograr el aumento o disminución del potencial antioxidante, como se ha observado para los aceites, extractos y sus mezclas, evaluados en el presente estudio.
2. Dada la actividad antioxidante promisorio de los AE y extractos y sus mezclas binarias de *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* y *Lippia origanoides*, se recomienda evaluarlos mediante otras metodologías para medir la peroxidación lipídica o el atrapamiento radicalario (por ejemplo, ORAC, ensayos ABTS, DPPH).
3. Debido al efecto protector alto exhibido por la mezcla de extractos romero-salvia (superior al de la vitamina E), se puede recomendar el fraccionamiento de los extractos, para evaluar la actividad antioxidante de cada fracción, con el objetivo de buscar el/los componente(s) responsable(s) de esta actividad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] REPETTO, M., Toxicología Avanzada, **1995**, Ed. Díaz de Santos S.A, Madrid, 259 - 262.
- [2] Lo “natural” es *top* y vende más [Sitio de internet] Disponible en http://www.profitocoop.com.ar/articulos/Los_lanzamientos%5B1%5D.pdf, fecha de consulta: junio de 2009.
- [3] CONTRERAS, N. Evaluación de la actividad antioxidante in vitro de algunos aceites esenciales en el proceso de peroxidación lipídica inducida por la radiación ultravioleta, Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, **2002**.
- [4] MARTINI, M. C., Cosmetología, **1997**, 1ª Ed., Elsevier-Masson, España, 1-5.
- [5] Componentes de los cosméticos [Sitio de Internet] Disponible en <http://www.elmodernoprometeo.es/cosmeticos/cos2.html>., Fecha de consulta: abril de 2009.
- [6] GARCÍA, H., Flora medicinal de Colombia, Botánica Médica, **1992**, 2^{da} Ed., Tercer Mundo Editores, Bogotá, 29-31.
- [7] FERNÁNDEZ-POLA, J., Cultivo de plantas medicinales, aromáticas y condimenticias, **1996**, Ediciones Omega, Barcelona, 32-221.
- [8] SOLIMAN, F.M., EL-KASHOURY, E.A., FATHY, M.M., and GONAIID, M.H., Analysis and biological activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. from Egypt. *Flav. Frangance J.*, **1994**, 9: 29-33.
- [9] KABOUICHE, Z., BOUTAGHANE, N., LAGGOUNE, S., KABOUICHE, A., AIT-KAKI, Z., and BANLABED, K., Comparative antibacterial activity of de lamiaceae essential oils from Algeria, *Int. J. Aromather.*, **2005**, 15, 129-33.
- [10] CALA, V., CASES, M.A., and WALTER, I., Biomass production and heavy metal content *Rosmarinus officinalis* grown on organic waste-amended soil, *J. Arid. Environ.*, **2005**, 62, 401-412.
- [11] FLAMINI, G., CIONI, P.L., MORELLI, I., MACCCHIA, M., and CECCARINI, L., Main agronomic-productive characteristics of two ecotypes of *Rosmarinus*

- officinalis* L. and chemical composition of their essential oils, *J. Agric. Food. Chem.*, **2002**, 50, 3512-3517.
- [12] SKRUBIS, G., Seven wild aromatic plants growing in Greece and their essential oils. *Flavour Ind.*, **1972**, 3, 566-568.
- [13] HETHELYI, E., KAPOSI, P., DOMONKOS, J., and KERNOCZI, Z.S., GC/MS investigation of the essential oils *Rosmarinus officinalis* L., *Acta Pharm. Hung.*, **1987**, 159-169.
- [14] MATEUS, E.M., LOPEZ, C., NOGEIRA, T., LOURENCO, J.A.A., and Marcelo, M.J., Pilot Steam Distillation of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) from Portugal. *Silva Lusitana*. **2006**, 203-217.
- [15] HERNÁNDEZ, G., LOZANO, Z., Estudio de la composición química de los aceites esenciales extraídos de las plantas medicinales (Lepechina, mejorana, romero y salvia), Tesis de Pregrado, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, **1992**, 27-92.
- [16] ATTI-SANTOS, A.C., ROSSATO, M., FERNANDEZ, G., DUARTE, L., RECH, J.C., PANSERA, M.R., AGOSTINI F., ATTI-SERAFINI, and MOYNA, P., Physicochemical evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil, *J. Braz. Arch. Biol. Techno*, **2005**. 48, 1035-1039.
- [17] CELIRTAS, O., HAMES, E.E., BEDIR, E., VARDAR, F., OZEK, T., and BASER, K.H.C., Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations, *Food Chem.*, **2007**, 100, 553-559.
- [18] OLIVEIRA, D.N., LETAIGO, G.G., BIZZO, H.R., LOPEZ, D., ALVIANO, C.S., ALVIANO: D.S., and LEITAO, S.G., Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K., *Food Chem.*, **2007**, 101(1), 236-240.
- [19] RUÍZ, C., Estudio de los Metabolitos Secundarios Volátiles de *Lippia origanoides* H.B.K. en tres estados fenológicos, Tesis de Pregrado, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, **2008**, 37-38.
- [20] PASCUAL, M., SLOWING, K., CARRETERO, E., SANCHEZ, D., and VILLAR, R., *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology, a review. *J. Ethnopharmacol.*, **2001**, 76, 201-214.

- [21] STASHENKO E, RUÍZ C, MUÑOZ A, CASTAÑEDA M, MARTÍNEZ J, Composition and antioxidant activity of essential oils of *Lippia origanoides* HBK grown in Colombia, *Nat. Prod. Commun*, **2008**, 3, 563-566.
- [22] DOS SANTOS, J., LOPEZ, D., CITO, G.L., DE OLIVEIRA, E.H., LIMA, S.G., and REIS, S.G., and REIS, F.A., Composition and biological activity of essential oils from *Lippia origanoides* H.B.K., *J. Essent. Oil Res*, **2004**, 16, 504-506.
- [23] VELASCO, A., PEREZ, M.J., Volatile constituents of four *Lippia* species from Córdoba (Argentina). *J. Essent. Oil Res.*,**1993**, 5, 513-524.
- [24] LAMBERT, R.J., SKANDAMIS, P.N., COOTE, P.J., and NYHAS, G., A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol, *J. Applied Microbiol.*, **2001**, 91,453-462.
- [25] BAGAMBOULA, C.F., UYTTENDAELE, M., and DEBEVERE, J., Inhibitory Effect of Thyme and Basil Essential Oils, Carvacrol, Thymol, Estragol, Linalool and ρ -Cymene towards *Shigella sonnei* and *S. Flexner*, *Food Microbiol.*, **2004**, 21, 33-34.
- [26] Aceites Esenciales, [Sitio de Internet] disponible en: <http://www.slideshare.net/dicoello/aceites-esenciales>, Fecha de consulta: 15 de junio de 2010.
- [27] KRUK, I., MICHALSKA, T., and LICHSZTELD, K., The effect of thymol and its derivates on reactions generating reactive oxygen species, *Chemosphere*, **2000**, 41, 1059-1064.
- [28] HERNÁNDEZ, T., CANALES, M., AVILA, J.G., DURÁN, A., CABALLERO, J., and ROMO DE VIVAR, A., Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapolitan de Las Salinas, Puebla (Mexico). *J. Ethnopharmacol.*, **2003**, 88,181-188.
- [29] PICHERSKY, E., and GANG, D.R., Genetics and Biochemistry of secondary metabolites in plants; an evolutionary perspective, *Trends Plant. Sci.*, **2000**, 5, 439-445.
- [30] BEN FARHAT, M., JORDAN, M.J., CHAOUECH-HAMADA, R., LANDOULSI , A., SOTOMAYOR, J.A., Variations in Essential Oil, Phenolic Compounds, and

- Antioxidant Activity of Tunisian Cultivated *Salvia officinalis* L., *J. Agric. Food. Chem.*, **2009**, *57*, 10349-10356.
- [31] PIEROZAN, M., FERNANDES, G., Rota, L., Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *Salvia* L. species, *Cienc. Tecnol. Aliment.*, **2009**, *29*, 764-770.
- [32] ROLDÁN, L., DIAZ, G., DURINGER, J., Composición y actividad antibacteriana de aceites esenciales obtenidos de plantas de la familia Lamiaceae contra bacterias patógenas y benéficas, *Rev. Colom. Ciencias Pecuarias*, **2010**, *23*, 451-461.
- [33] Fitoterapia [Sitio de Internet] disponible en: <http://www.mailxmail.com/curso-fitoterapia/salvia-salvia-officinalis> Fecha de consulta: 25 de septiembre de 2010.
- [34] STASHENKO, E., CERVANTES, M., COMBARIZA, M. Y., and MARTÍNEZ J. HRGC/FID and GC/MSD Analysis of the secondary metabolites obtained by different extraction methods from *Lepechinia schiedeana* and *in vitro* evaluation of its antioxidant activity, *J. High Resol. Chromatogr.*, **1999**, *22*, 343-349.
- [35] STASHENKO, E., JARAMILLO, B., and MARTÍNEZ, J., Comparison of Different Extraction Methods for the analysis of Volatile Secondary Metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, Grown in Colombia and Evaluation of its *in vitro* Antioxidant Activity, *J. Chromatogr. A.*, **2004**, *1025*, 93-103.
- [36] TSARKOVA, T. Desarrollo de la técnica de extracción de metabolitos secundarios de plantas aromáticas utilizando la radiación de microondas, Tesis de maestría, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, **2007**, 27-31.
- [37] GÓMEZ, P., MATA, N.G. and RODRÍGUEZ, A.E. Production of rose geranium oil using supercritical fluid extraction, *J. Supercritical Fluids.*, **2007**, *41*, 50-60.
- [38] BRAITHWAITE, A., and SMITH, F., J. Chromatographic methods, 5th Ed, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands., **1999**, 1-14.

- [39] CRUZ J.F., JÄRVENPÄÄ, E.P., HUOPALAHTI, R., and SIVIR, B. Comparison of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. Oils from Mozambique as obtained by hidrodistillation and supercritical carbon dioxide extraction, *J. Agric. Food. Chem.*, **2001**, 49, 2339-2342.
- [40] BRAGA, M., EHLERT, P., MING, L. C., and MEIRELES, M.A. Supercritical fluid extraction from *Lippia alba*: global yields, kinetic data, and extract chemical composition, *J. Supercrit. Fluids.*, **2005**, 34, 149-156.
- [41] KELLNER, R., MERMET, J. M., OTTO, M., VALCARCEL, M., and WIDMER, H.M., Analytical Chemistry, Ed. Wiley-VCH, **2004**, 407-409; 554, 823-825; 867.
- [42] GODEFROOT, M., SANDRA P., and VERZELE, M., New method for quantitative essential oil analysis, *J. Chromatogr*, **1981**, 203, 203-325.
- [43] SCHREIER, P., Chromatographic studies of biogenesis of plant volatiles, Chromatographic Methods, Hüthig Verlag ed., Heidelberg, New York, **1984**.
- [44] JENNINGS, W., MITTFEHLDT, E., and STREMPLE, P., Analytical gas chromatography, 2nd Ed., Academic Press, London, UK, **1987**, 1-287.
- [45] POOLE, C. F., and POOLE S. K., Chromatography Today, Elsevier, Amsterdam **1991**. 1026 p.
- [46] VARCARCEL, M., Técnicas analíticas de separación, **1988**, Editorial Reverte., Barcelona, 166p.
- [47] PINO, J. A., ORTEGA, A. G., PÉREZ, A., RODRÍGUEZ, M., BALUJA, R., Composición y propiedades del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown, *Rev. Cub. Farm.*, **1997**, 30, 30p.
- [48] SOUTO, F. A., DE JESUS, M., CARDENAS, O. E., ACUÑA, M. F., MELENDEZ, P. A., and ROMERO, L., Terpenoid composition of *Lippia dulcis*, *Phytochem.*, **1997**, 44, 1077-1086.
- [49] FAJARDO O., Estudio comparativo de la composición química y evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Aloysia tripillia* (L'Her) Britton, cultivada en tres regiones de Colombia, Tesis de Grado, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, **2007**.

- [50] UGARTONDO V., Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. Tesis de Doctorado, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, **2009**.
- [51] CHAPARRO, F., Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de extractos de *Erythroxylum coca Lam.* y *Coffea arabica L.* en un sistema lipídico modelo, Tesis de Grado, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, **2004**.
- [52] Antioxidantes en alimentación: diferentes formas de expresar su actividad antioxidante, tipos de unidades y método de análisis [Sitio de Internet] disponible en: <http://www.gencat.cat/salut/acsa/html/ca/dir1311/dd16054/antioxidants.pdf>
Fecha de Consulta: 25 de septiembre de 2010.
- [53] MOYA, M., MENDOZA, D., and AMEZQUITA, F., Analytical evaluation of polyunsaturated fatty acids degradation during thermal oxidation of edible oils by fourier transform infrared spectroscopy, *Talanta*, **1999**, 50, 269-275.
- [54] FANKEL, E.N., Review. Recent Advances in Lipid Oxidation. *J. Sci Food Agric.*, **1991**, 54, 495-511.
- [55] SHERWIN, E.R., Oxidation and Antioxidants in Fat and Oil Processing, *JAACS*, **1978**, 55, 809-814.
- [56] FRANKEL, E., Volatile Lipid Oxidation Products, *Prog. Lipid Res.*, **1982**, 22, 1-33.
- [57] ELMORE J. S., MOTTRAN D. S., ENSER M., and WOOD J. D., Effect of the polyunsaturated fatty acid composition of beef muscle on the profile of aroma volatiles, *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 1619-25.
- [58] PARK, P.W., and GOINS R.E., *In situ* preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods, *J. Food Sci.*, **1994**, 59, 1262-66.
- [59] PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction, theory and practice, Wiley-VCH, New York, **1997**, 247 p.
- [60] POCURULL, E., BROSSA, L., BORRULL F., Solid-phase extraction/high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry to

- determine endocrine disruptors in water samples. *Chromatographia, J. Chromatogr.*, **2004**, 59, 419-423p.
- [61] ALPENDURADA, M.F., Solid-Phase Microextraction. A promising Technique for Sample Preparation an Environmental Analisys., *J. Cromatogr. A.*, **2000**, 889, 3-14.
- [62] RUÍZ, J.; VENTANAS, J. and CAVA, R., New Device for Direct Extraction of Volatiles in Solid Samples Using SPME., *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, 5115-5121.
- [63] LAMBROPOULOU, D. A. and TRIANTAFYLLOS, A., Headspace Solid Phase Microextraction Applied to the Analysis of Organophosphorus Insecticides in Strawberry and Cherry Juices, *J. Agric. Food. Chem.*, **2002**, 50, 3359-3365.
- [64] KOZIEL, J. A., NOAH, J., and PAWLISZYN, J., Field Sampling and Determination of Formaldehyde in Indoor Air with Solid-Phase Microextraction and On-Fiber Derivatization, *Environ. Sci. Technol.*, **2001**, 35, 1481-1486.
- [65] STASHENKO, E. E., PUERTAS, M. A., SALGAR, W., DELGADO, W., and MARTÍNEZ, J.R., Solid-Phase Microextraction with On-Fibre Derivatisation Applied to the Analysis of Volatile Carbonyl Compounds. *J. Chromatogr. A.*, **2000**, 886, 175-181.
- [66] CERVANTES M., Determinación por HS-SPME/CG-ECD, de los componentes carbonílicos y carboxílicos volátiles presentes en el sudor humano, Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, **2006**.
- [67] MANI, V. Properties of Commercial SPME Coatings. En: PAWLISZYN, J. (Editor). Applications of Solid Phase Microextraction. Cambridge: Royal Society of Chemistry, **1999**. 654 p.
- [68] YASUHARA A., and SHIBAMOTO T., Quantitative analysis of volatile aldehydes formed from various kinds of fish flesh during heat treatment, *J. Agric. Food Chem.*, **1995**, 43, 94-7.
- [69] ADAMS, R.P., Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy, **2004**, Ed. Allured Publishing Corporation, Illinois, 469p.

- [70] KOVÁTS, E., Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system, *Advan. Chromatogr.*, **1965**, 1, 229-247.
- [71] FUENTES, H.V., Monitoreo de la termodegradación de los ácidos grasos en los aceites vegetales de consumo humano, por medio de cromatografía de gases de alta resolución y evaluación *in vitro* de la actividad antioxidante de productos naturales, Tesis de Grado, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, **1999**.
- [72] STASHENKO, E.E., MARTÍNEZ, J.R., MACKU, C., *et al*, HRGC and GC/MS., Analysis of essential oils from Colombian Ylang-Ylang., *J. High Resol. Chromatogr.*, **1993**, 16, 44-445.
- [73] LEMBERKOVICS, E., KERY, A., MARCZAL, G., SIMANDY, B., and SZOKE, E., Phytochemical evaluation of essential oils, medicinal plants and their preparations, *Acta Pharm. Hung.*, **1998**, 68, 141-147.
- [74] TAFURT, G., Evaluación de la actividad antioxidante de tres aceites esenciales en emulsiones tipo margarina degradadas por radiación ultravioleta, Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, **2003**
- [75] PUERTAS, M.A., Desarrollo de un método analítico para la determinación de compuestos carbonílicos volátiles y la evaluación de la posible actividad antioxidante *in vitro* de algunos productos naturales y sintéticos. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, **2002**.
- [76] SALGAR, W., Evaluación en dos sistemas lipídicos modelo de la actividad antioxidante *in-vitro* de aceites esenciales extraídos de plantas pertenecientes a la familia Labiatae, Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, **2001**.

BIBLIOGRAFÍA

Aceites Esenciales, [Sitio de Internet] disponible en: <http://www.slideshare.net/dicoello/aceites-esenciales>, Fecha de consulta: 15 de junio de 2010.

ADAMS, R.P., Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy, **2004**, Ed. Allured Publishing Corporation, Illinois, 469p.

ALPENDURADA, M.F., Solid-Phase Microextraction. A promising Technique for Sample Preparation an Environmental Analisys., *J. Cromatogr. A.*, **2000**, 889, 3-14.

Antioxidantes en alimentación: diferentes formas de expresar su actividad antioxidante, tipos de unidades y método de análisis [Sitio de Internet] disponible en: <http://www.gencat.cat/salut/acsa/html/ca/dir1311/dd16054/antioxidants.pdf>
Fecha de Consulta: 25 de septiembre de 2010.

ATTI-SANTOS, A.C., ROSSATO, M., FERNANDEZ, G., DUARTE, L., RECH, J.C., PANSERA, M.R., AGOSTINI F., ATTI-SERAFINI, and MOYNA, P., Physicochemical evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil, *J. Braz. Arch. Biol. Techno*, **2005**. 48, 1035-1039.

BAGAMBOULA, C.F., UYTTENDAELE, M., and DEBEVERE, J., Inhibitory Effect of Thyme and Basil Essential Oils, Carvacrol, Thymol, Estragol, Linalool and ρ -Cymene towards *Shigella sonnei* and *S. Flexner*, *Food Microbiol.*, **2004**, 21, 33-34.

BEN FARHAT, M., JORDAN, M.J., CHAOUECH-HAMADA, R., LANDOULSI , A., SOTOMAYOR, J.A., Variations in Essential Oil, Phenolic Compounds, and Antioxidant Activity of Tunisian Cultivated *Salvia officinalis* L., *J. Agric. Food. Chem.*, **2009**, 57, 10349-10356.

BRAGA, M., EHLERT, P., MING, L. C., and MEIRELES, M.A. Supercritical fluid extraction from *Lippia alba*: global yields, kinetic data, and extract chemical composition, *J. Supercrit. Fluids.*, **2005**, 34, 149-156.

BRAITHWAITE, A., and SMITH, F., J. Chromatographic methods, 5th Ed, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands., **1999**, 1-14.

CALA, V., CASES, M.A., and WALTER, I., Biomass production and heavy metal content *Rosmarinus officinalis* grown on organic waste-amended soil, *J. Arid. Environ.*, **2005**, 62, 401-412.

CELIRTAS, O., HAMES, E.E., BEDIR, E., VARDAR, F., OZEK, T., and BASER, K.H.C., Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations, *Food Chem.*, **2007**, 100, 553-559.

CERVANTES M., Determinación por HS-SPME/CG-ECD, de los componentes carbonílicos y carboxílicos volátiles presentes en el sudor humano, Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, **2006**.

CHAPARRO, F., Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de extractos de *Erythroxylum coca Lam.* y *Coffea arabica L.* en un sistema lipídico modelo, Tesis de Grado, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, **2004**.

Componentes de los cosméticos [Sitio de Internet] Disponible en <http://www.elmodernoprometeo.es/cosmeticos/cos2.html>., Fecha de consulta: abril de 2009.

CONTRERAS, N. Evaluación de la actividad antioxidante in vitro de algunos aceites esenciales en el proceso de peroxidación lipídica inducida por la radiación ultravioleta, Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, **2002**.

CRUZ J.F., JÄRVENPÄÄ, E.P., HUOPALAHTI, R., and SIVIR, B. Comparison of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. Oils from Mozambique as obtained by hidrodistillation and supercritical carbon dioxide extraction, *J. Agric. Food. Chem.*, **2001**, 49, 2339-2342.

DOS SANTOS, J., LOPEZ, D., CITO, G.L., DE OLIVEIRA, E.H., LIMA, S.G., and REIS, S.G., and REIS, F.A., Composition and biological activity of essential oils from *Lippia origanoides* H.B.K., *J. Essent. Oil Res*, **2004**, 16, 504-506.

ELMORE J. S., MOTTRAN D. S., ENSER M., and WOOD J. D., Effect of the polyunsaturated fatty acid composition of beef muscle on the profile of aroma volatiles, *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 1619-25.

FAJARDO O., Estudio comparativo de la composición química y evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Aloysia tripilla* (L'Her) Britton, cultivada en tres regiones de Colombia, Tesis de Grado, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, **2007**.

FANKEL, E.N., Review. Recent Advances in Lipid Oxidation. *J. Sci Food Agric.*, **1991**, 54, 495-511.

FERNÁNDEZ-POLA, J., Cultivo de plantas medicinales, aromáticas y condimenticias, **1996**, Ediciones Omega, Barcelona, 32-221.

Fitoterapia [Sitio de Internet] disponible en: <http://www.mailxmail.com/curso-fitoterapia/salvia-salvia-officinalis> Fecha de consulta: 25 de septiembre de 2010.

FLAMINI, G., CIONI, P.L., MORELLI, I., MACCCHIA, M., and CECCARINI, L., Main agronomic-productive characteristics of two ecotypes of *Rosmarinus officinalis* L. and chemical composition of their essential oils, *J. Agric. Food. Chem.*, **2002**, 50, 3512-3517.

FRANKEL, E., Volatile Lipid Oxidation Products, *Prog. Lipid Res.*, **1982**, 22, 1-33.

FUENTES, H.V., Monitoreo de la termodegradación de los ácidos grasos en los aceites vegetales de consumo humano, por medio de cromatografía de gases de alta resolución y evaluación *in vitro* de la actividad antioxidante de productos naturales, Tesis de Grado, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, **1999**.

GARCÍA, H., Flora medicinal de Colombia, Botánica Médica, **1992**, 2^{da} Ed., Tercer Mundo Editores, Bogotá, 29-31.

GODEFROOT, M., SANDRA P., and VERZELE, M., New method for quantitative essential oil analysis, *J. Chromatogr*, **1981**, 203, 203-325.

GÓMEZ, P., MATA, N.G. and RODRÍGUEZ, A.E. Production of rose geranium oil using supercritical fluid extraction, *J. Supercritical Fluids.*, **2007**, 41, 50-60.

HERNÁNDEZ, G., LOZANO, Z., Estudio de la composición química de los aceites esenciales extraídos de las plantas medicinales (Lepechina, mejorana, romero y salvia), Tesis de Pregrado, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, **1992**, 27-92.

HERNÁNDEZ, T., CANALES, M., AVILA, J.G., DURÁN, A., CABALLERO, J., and ROMO DE VIVAR, A., Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapolitan de Las Salinas, Puebla (Mexico). *J. Ethnopharmacol.*, **2003**, 88,181-188.

HETHELYI, E., KAPOSÍ, P., DOMONKOS, J., and KERNOCZI, Z.S., GC/MS investigation of the essential oils *Rosmarinus officinalis* L., *Acta Pharm. Hung.*, **1987**, 159-169.

JENNINGS, W., MITTLEFEHLDT, E., and STREMPLE, P., Analytical gas chromatography, 2nd Ed., Academic Press, London, UK, **1987**,1-287.

KABOUCHE, Z., BOUTAGHANE, N., LAGGOUNE, S., KABOUCHE, A., AIT-KAKI, Z., and BANLABED, K., Comparative antibacterial activity of de lamiaceae essential oils from Algeria, *Int. J. Aromather.*, **2005**, 15, 129-33.

KELLNER, R., MERMET, J. M., OTTO, M., VALCARCEL, M., and WIDMER, H.M., Analytical Chemistry, Ed. Wiley-VCH, **2004**, 407-409; 554, 823-825; 867.

KOVÁTS, E., Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system, *Advan. Chromatogr.*, **1965**, 1, 229-247.

KOZIEL, J. A., NOAH, J., and PAWLISZYN, J., Field Sampling and Determination of Formaldehyde in Indoor Air with Solid-Phase Microextraction and On-Fiber Derivatization, *Environ. Sci. Technol.*, **2001**, 35, 1481-1486.

KRUK, I., MICHALSKA, T., and LICHSZTELD, K., The effect of thymol and its derivates on reactions generating reactive oxygen species, *Chemosphere*, **2000**, 41, 1059-1064.

LAMBERT, R.J., SKANDAMIS, P.N., COOTE, P.J., and NYHAS, G., A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol, *J. Applied Microbiol.*, **2001**, 91, 453-462.

LAMBROPOULOU, D. A. and TRIANTAFYLLOS, A., Headspace Solid Phase Microextraction Applied to the Analysis of Organophosphorus Insecticides in Strawberry and Cherry Juices, *J. Agric. Food. Chem.*, **2002**, 50, 3359-3365.

LEMBERKOVICS, E., KERY, A., MARCZAL, G., SIMANDY, B., and SZOKE, E., Phytochemical evaluation of essential oils, medicinal plants and their preparations, *Acta Pharm. Hung.*, **1998**, 68, 141-147.

Lo "natural" es *top* y vende más [Sitio de internet] Disponible en http://www.profitocoop.com.ar/articulos/Los_lanzamientos%5B1%5D.pdf, fecha de consulta: junio de 2009.

MANI, V. Properties of Commercial SPME Coatings. En: PAWLISZYN, J. (Editor). Applications of Solid Phase Microextraction. Cambridge: Royal Society of Chemistry, **1999**. 654 p.

MARTINI, M. C., Cosmetología, **1997**, 1ª Ed., Elsevier-Masson, España, 1-5.

MATEUS, E.M., LOPEZ, C., NOGEIRA, T., LOURENCO, J.A.A., and Marcelo, M.J., Pilot Steam Distillation of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) from Portugal. *Silva Lusitana*. **2006**, 203-217.

MOYA, M., MENDOZA, D., and AMEZQUITA, F., Analytical evaluation of polyunsaturated fatty acids degradation during thermal oxidation of edible oils by fourier transform infrared spectroscopy, *Talanta*, **1999**, 50, 269-275.

OLIVEIRA, D.N., LETAIGO, G.G., BIZZO, H.R., LOPEZ, D., ALVIANO, C.S., ALVIANO: D.S., and LEITAO, S.G., Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K., *Food Chem.*, **2007**, 101(1), 236-240.

PARK, P.W., and GOINS R.E., *In situ* preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods, *J. Food Sci.*, **1994**, 59, 1262-66.

PASCUAL, M., SLOWING, K., CARRETERO, E., SANCHEZ, D., and VILLAR, R., *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology, a review. *J. Ethnopharmacol.*, **2001**, 76, 201-214.

PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction, theory and practice, Wiley-VCH, New York, **1997**, 247 p.

PICHERSKY, E., and GANG, D.R., Genetics and Biochemistry of secondary metabolites in plants; an evolutionary perspective, *Trends Plant. Sci.*, **2000**, 5, 439-445.

PIEROZAN, M., FERNANDES, G., Rota, L., Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *Salvia* L. species, *Cienc. Tecnol. Aliment.*, **2009**, 29, 764-770.

PINO, J. A., ORTEGA, A. G., PÉREZ, A., RODRÍGUEZ, M., BALUJA, R., Composición y propiedades del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown, *Rev. Cub. Farm.*, **1997**, 30, 30p.

POCURULL, E., BROSSA, L., BORRULL F., Solid-phase extraction/high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry to determine endocrine disruptors in water samples. *Chromatographia, J. Chromatogr.*, **2004**, 59, 419-423p.

POOLE, C. F., and POOLE S. K., *Chromatography Today*, Elsevier, Amsterdam **1991**. 1026 p.

PUERTAS, M.A., Desarrollo de un método analítico para la determinación de compuestos carbonílicos volátiles y la evaluación de la posible actividad antioxidante in vitro de algunos productos naturales y sintéticos. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, **2002**.

REPETTO, M., *Toxicología Avanzada*, **1995**, Ed. Díaz de Santos S.A, Madrid, 259 - 262.

ROLDÁN, L., DIAZ, G., DURINGER, J., Composición y actividad antibacteriana de aceites esenciales obtenidos de plantas de la familia Lamiaceae contra bacterias patógenas y benéficas, *Rev. Colom. Ciencias Pecuarias*, **2010**, 23, 451-461.

RUÍZ, C., Estudio de los Metabolitos Secundarios Volátiles de *Lippia origanoides* H.B.K. en tres estados fenológicos, Tesis de Pregrado, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, **2008**, 37-38.

RUÍZ, J.; VENTANAS, J. and CAVA, R., New Device for Direct Extraction of Volatiles in Solid Samples Using SPME., *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, 5115-5121.

SALGAR, W., Evaluación en dos sistemas lipídicos modelo de la actividad antioxidante in-vitro de aceites esenciales extraídos de plantas pertenecientes a la familia Labiatae, Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, **2001**.

SCHREIER, P., *Chromatographic studies of biogenesis of plant volatiles*, *Chromatographic Methods*, Hüthig Verlag ed., Heidelberg, New York, **1984**.

SHERWIN, E.R., Oxidation and Antioxidants in Fat and Oil Processing, *JAOCS*, **1978**, 55, 809-814.

SKRUBIS, G., Seven wild aromatic plants growing in Greece and their essential oils. *Flavour Ind.*, **1972**, 3, 566-568.

SOLIMAN, F.M., EL-KASHOURY, E.A., FATHY, M.M., and GONAIID, M.H., Analysis and biological activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. from Egypt. *Flav. Frangance J.*, **1994**, 9: 29-33.

SOUTO, F. A., DE JESUS, M., CARDENAS, O. E., ACUÑA, M. F., MELENDEZ, P. A., and ROMERO, L., Terpenoid composition of *Lippia dulcis*, *Phytochem.*, **1997**, 44, 1077-1086.

STASHENKO E, RUÍZ C, MUÑOZ A, CASTAÑEDA M, MARTÍNEZ J, Composition and antioxidant activity of essential oils of *Lippia origanoides* HBK grown in Colombia, *Nat. Prod. Commun*, **2008**, 3, 563-566.

STASHENKO, E. E., PUERTAS, M. A., SALGAR, W., DELGADO, W., and MARTÍNEZ, J.R., Solid-Phase Microextraction with On-Fibre Derivatization Applied to the Analysis of Volatile Carbonyl Compounds. *J. Chromatogr. A.*, **2000**, 886, 175-181.

STASHENKO, E., CERVANTES, M., COMBARIZA, M. Y., and MARTÍNEZ J. HRGC/FID and GC/MSD Analysis of the secondary metabolites obtained by different extraction methods from *Lepechinia schiedeana* and *in vitro* evaluation of its antioxidant activity, *J. High Resol. Chromatogr.*, **1999**, 22, 343-349.

STASHENKO, E., JARAMILLO, B., and MARTÍNEZ, J., Comparison of Different Extraction Methods for the analysis of Volatile Secondary Metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, Grown in Colombia and Evaluation of its *in vitro* Antioxidant Activity, *J. Chromatogr. A.*, **2004**, 1025, 93-103.

STASHENKO, E.E., MARTÍNEZ, J.R., MACKU, C., *et al*, HRGC and GC/MS., Analysis of essential oils from Colombian Ylang-Ylang., *J. High Resol. Chromatogr.*, **1993**, 16, 44-445.

TAFURT, G., Evaluación de la actividad antioxidante de tres aceites esenciales en emulsiones tipo margarina degradadas por radiación ultravioleta, Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, **2003**

TSARKOVA, T. Desarrollo de la técnica de extracción de metabolitos secundarios de plantas aromáticas utilizando la radiación de microondas, Tesis de maestría, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, **2007**, 27-31.

UGARTONDO V., Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. Tesis de Doctorado, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, **2009**.

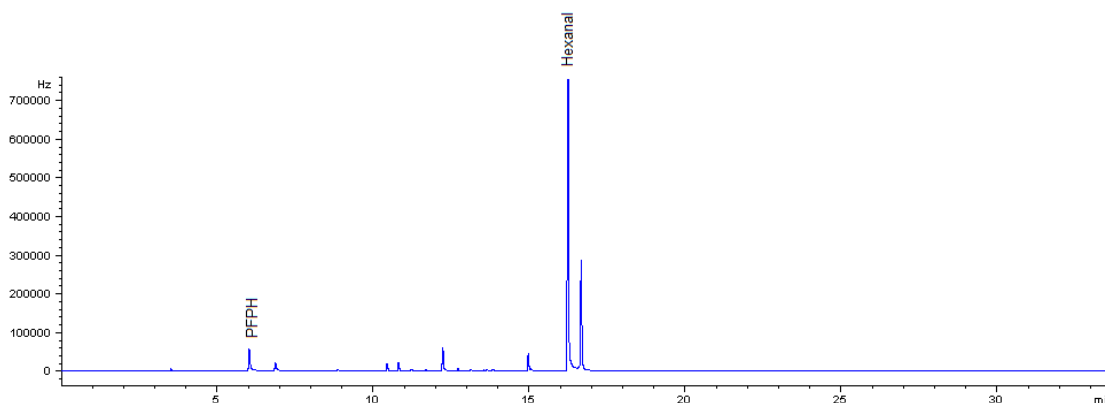
VARCARCEL, M., Técnicas analíticas de separación, **1988**, Editorial Reverte., Barcelona, 166p.

VELASCO, A., PEREZ, M.J., Volatile constituents of four *Lippia* species from Córdoba (Argentina). *J. Essent. Oil Res.*, **1993**, 5, 513-524.

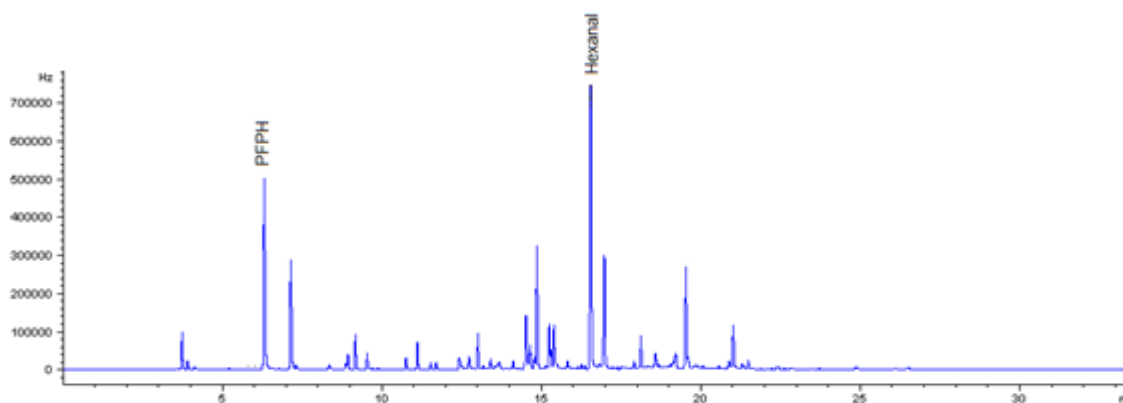
YASUHARA A., and SHIBAMOTO T., Quantitative analysis of volatile aldehydes formed from various kinds of fish flesh during heat treatment, *J. Agric. Food Chem.*, **1995**, 43, 94-7.

ANEXO A

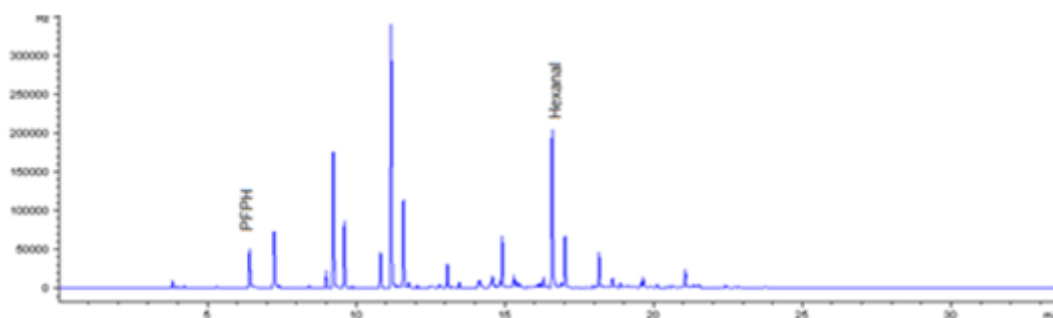
Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD (Columna HP-5, 30 m), del hexanal, analizado en forma de su derivado hidrazónico, y generado en los Sistemas Lipídicos irradiados en el reactor UVA.



Perfil cromatográfico obtenido por GC/ECD, del patrón de Hexanal.



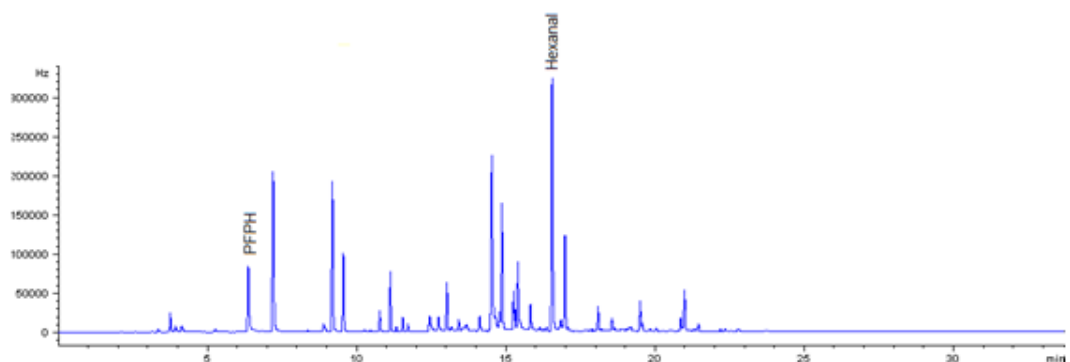
Perfil cromatográfico obtenido por GC/ECD, de los productos secundarios generados en el Sistema Lipídico I (aceite de girasol), sometido a la radiación UVA, sin agregar antioxidante.



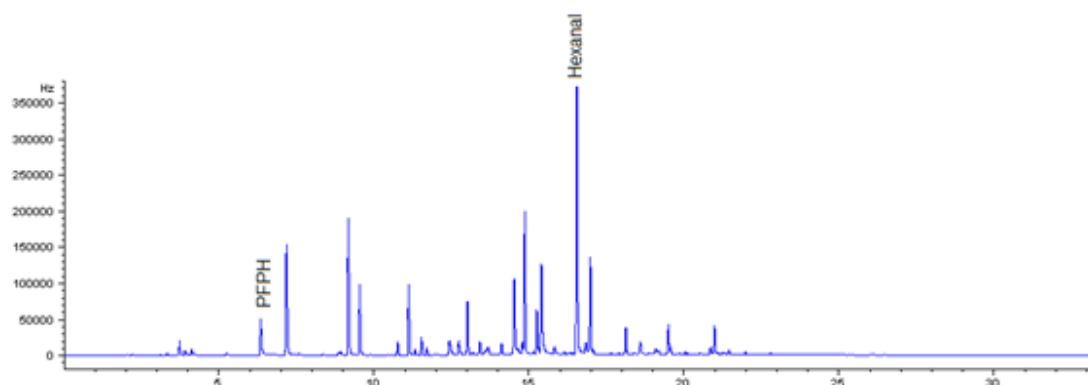
Perfil cromatográfico obtenido por GC/ECD, de los productos secundarios generados en el Sistema Lipídico II (crema cosmética, o/w), sometido a la radiación UVA, sin agregar antioxidante.

ANEXO B

Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD (Columna HP-5, 30 m), donde se muestra el efecto protector en el Sistema Lipídico I (aceite de girasol), de los antioxidantes de referencia, sometido a la irradiación con la luz UVA.



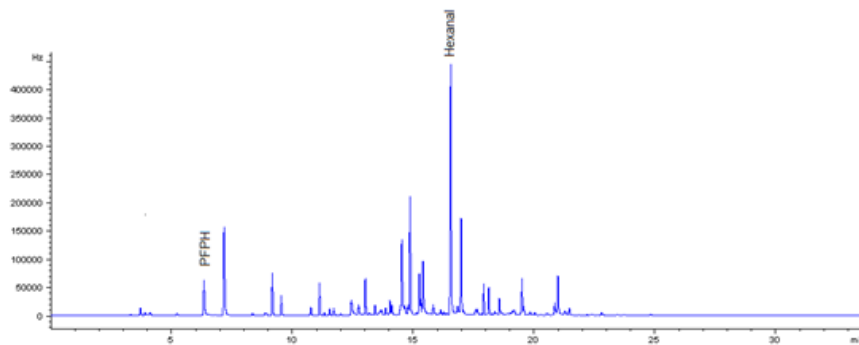
Perfil cromatográfico obtenido por GC/ECD, de los productos secundarios generados en el Sistema Lipídico I (aceite de girasol), sometido a la radiación UVA, en presencia de la vitamina E.



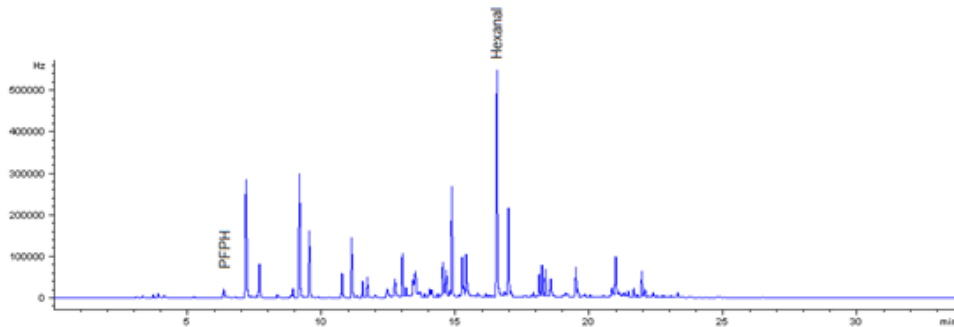
Perfil cromatográfico obtenido por GC/ECD, de los productos secundarios generados en el Sistema Lipídico I (aceite de girasol), sometido a la radiación UVA, en presencia de BHT.

ANEXO C

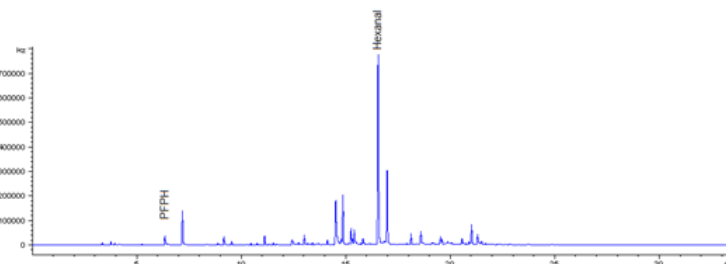
Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD (columna HP-5, 30 m), donde se muestra el efecto protector de los AE en estudio en el Sistema Lipídico I (aceite de girasol), sometido a la irradiación con la luz UVA.



Perfil cromatográfico obtenido por GC/ECD, de los productos secundarios, generados en el Sistema Lipídico I (aceite de girasol), sometido a la radiación UVA, con AE de *Lippia organoides*.



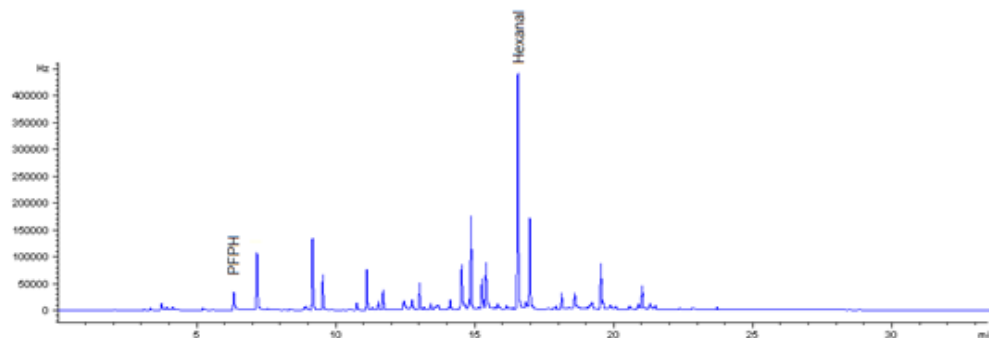
Perfil cromatográfico obtenido por GC/ECD, de los productos secundarios, generados en el Sistema Lipídico I (aceite de girasol), sometido a la radiación UVA, con AE de *Rosmarinus officinalis*.



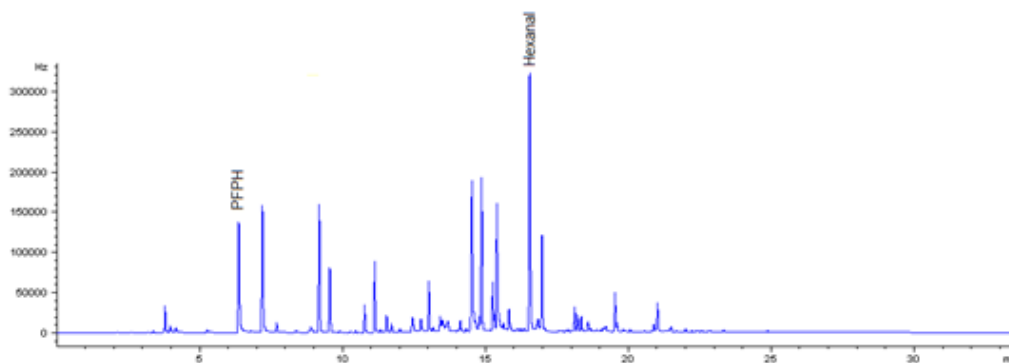
Perfil cromatográfico obtenido por GC/ECD, de los productos secundarios, generados en el Sistema Lipídico I (aceite de girasol), sometido a la radiación UVA, con AE de *Salvia officinalis*.

ANEXO D

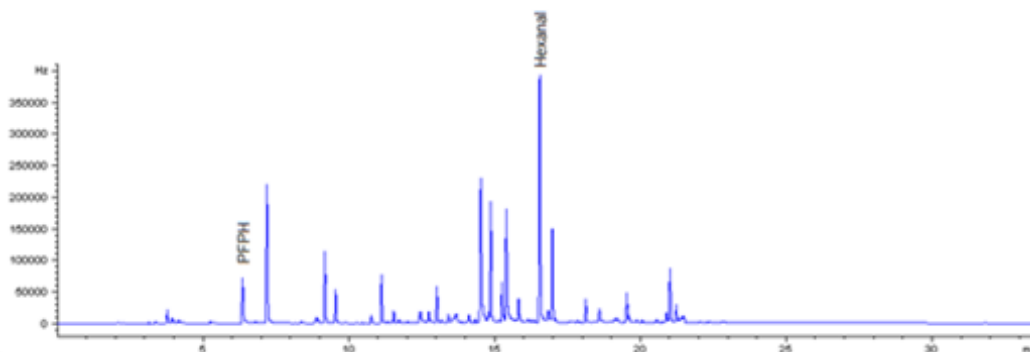
Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD (Columna HP-5, 30 m), donde se muestra el efecto protector en el Sistema Lipídico I (aceite de girasol), sometido a la irradiación con la luz UVA, de los extractos de las plantas bajo estudio.



Perfil cromatográfico obtenido por GC/ECD, de los productos secundarios generados en el Sistema Lipídico I (aceite de girasol), sometido a la radiación UVA, con extracto de *Lippia organoides*.



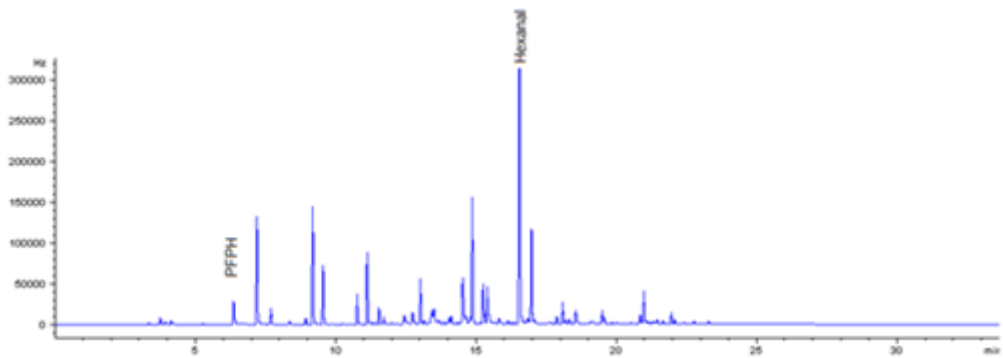
Perfil cromatográfico obtenido por GC/ECD, de los productos secundarios generados en el Sistema Lipídico I (aceite de girasol), sometido a la radiación UVA, con extracto de *Rosmarinus officinalis*.



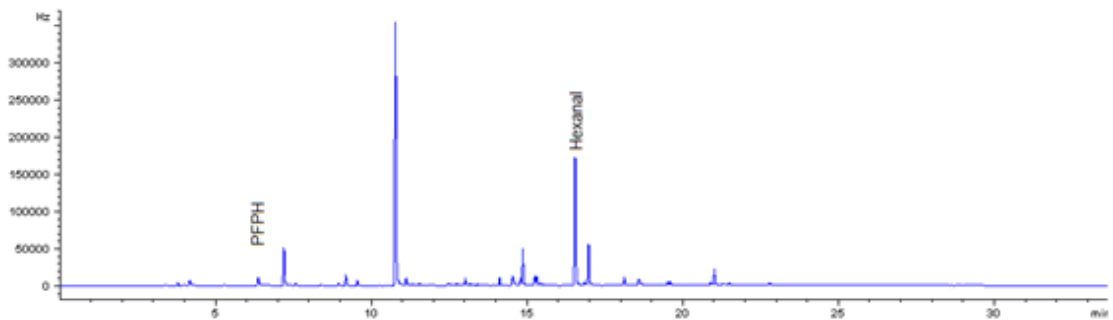
Perfil cromatográfico obtenido por GC/ECD, de los productos secundarios generados en el Sistema Lipídico I (aceite de girasol), sometido a la radiación UVA, con extracto de *Salvia officinalis*.

ANEXO E

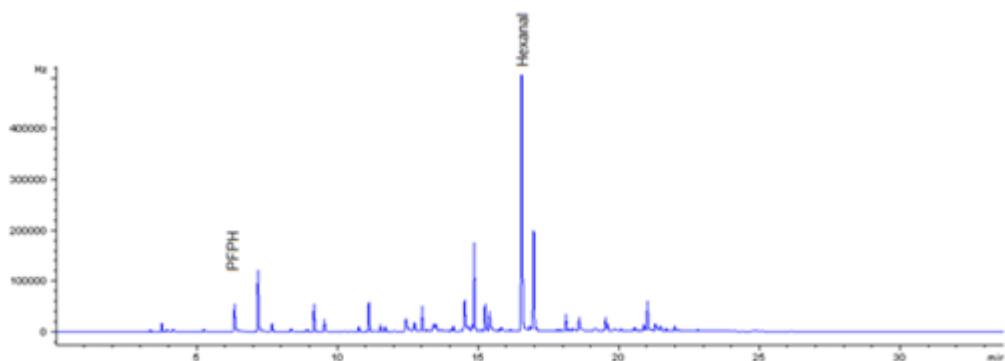
Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD (Columna HP-5, 30 m), donde se muestra el efecto protector en el Sistema Lipídico I (aceite de girasol), sometido a la irradiación con la luz UVA, de las mezclas binarias (1:1), de los AE de plantas las bajo estudio.



Perfil cromatográfico obtenido por GC/ECD, de los productos secundarios generados en el Sistema Lipídico I (aceite de girasol), sometido a la radiación UVA, con la mezcla de AE *Rosmarinus officinalis* y *Lippia origanoides*.



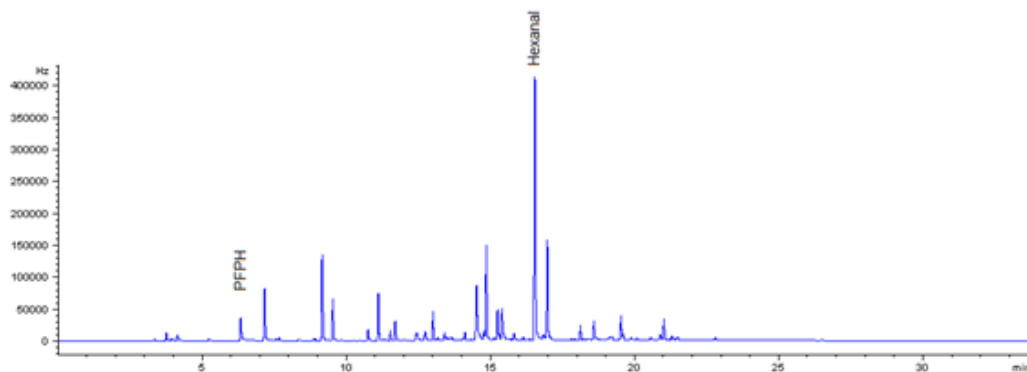
Perfil cromatográfico obtenido por GC/ECD, de los productos secundarios generados en el Sistema Lipídico I (aceite de girasol), sometido a la radiación UVA, con la mezcla de AE *Lippia origanoides* y *Salvia officinalis*.



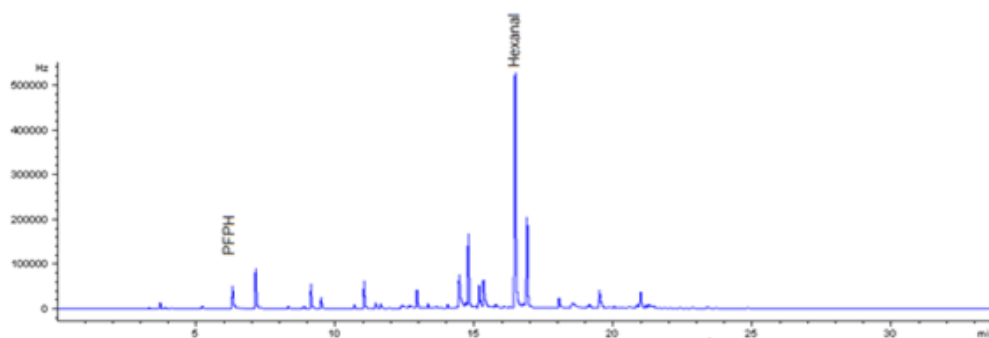
Perfil cromatográfico obtenido por GC/ECD, de los productos secundarios generados en el Sistema Lipídico I (aceite de girasol), sometido a la radiación UVA, con la mezcla de AE *Rosmarinus officinalis* y *Salvia officinalis*

ANEXO F

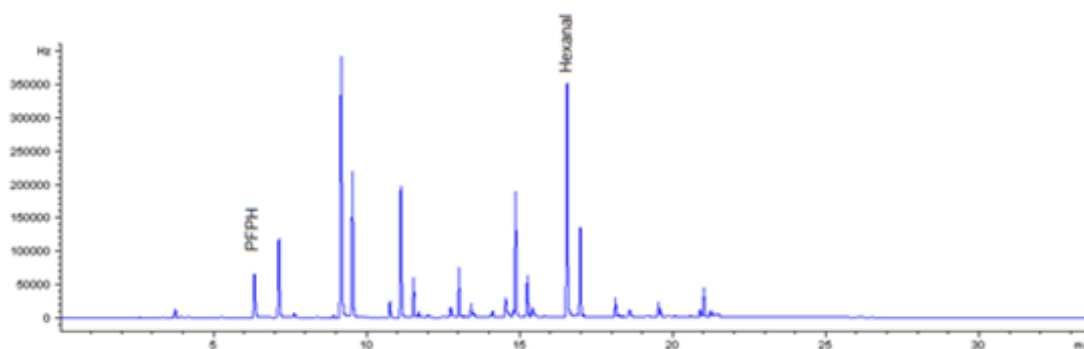
Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD (Columna HP-5, 30 m), donde se muestra el efecto protector en el Sistema Lipídico I (aceite de girasol), sometido a la irradiación a la luz UVA, de las mezclas binarias (1:1), de los extractos de plantas las bajo estudio.



Perfil cromatográfico obtenido por GC/ECD, de los productos secundarios generados en el Sistema Lipídico I (aceite de girasol), sometido a la radiación UVA, con la mezcla de extractos de *Rosmarinus officinalis* y *Lippia organoides*.



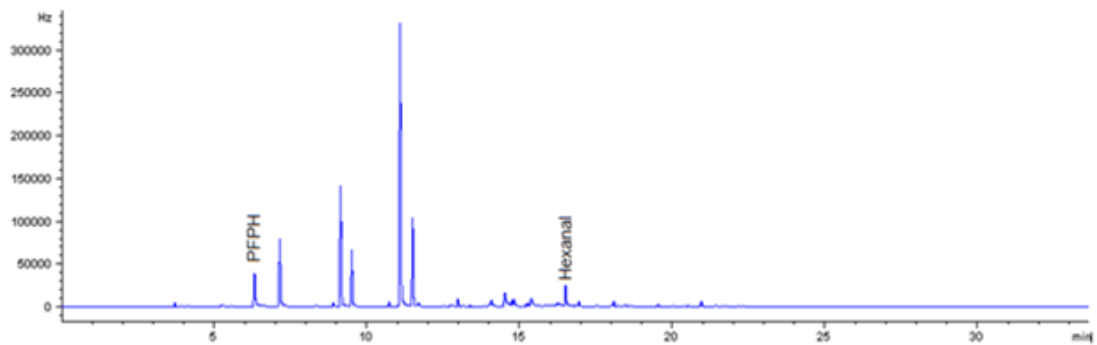
Perfil cromatográfico obtenido por GC/ECD, de los productos secundarios generados en el Sistema Lipídico I (aceite de girasol), sometido a la radiación UVA, con la mezcla de extractos de *Lippia organoides* y *Salvia officinalis*.



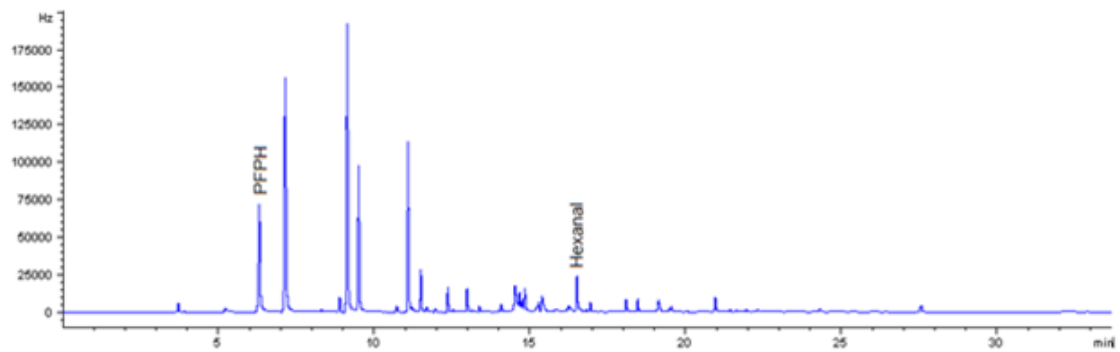
Perfil cromatográfico obtenido por GC/ECD, de los productos secundarios generados en el Sistema Lipídico I (aceite de girasol), sometido a la radiación UVA, con la mezcla de extractos de *Rosmarinus officinalis* y *Salvia officinalis*.

ANEXO G

Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD (Columna HP-5, 30 m), donde se muestra el efecto protector en el Sistema Lipídico II (crema cosmética, o/w), de los antioxidantes de referencia, sometido a la irradiación con la luz UVA.



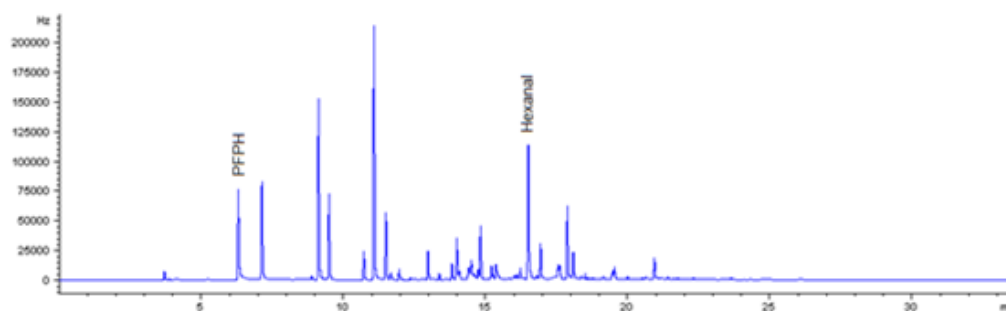
Perfil cromatográfico obtenido por GC/ECD, de los productos secundarios generados en el Sistema Lipídico II (crema cosmética, o/w), sometido a la radiación UVA, en presencia de la vitamina E.



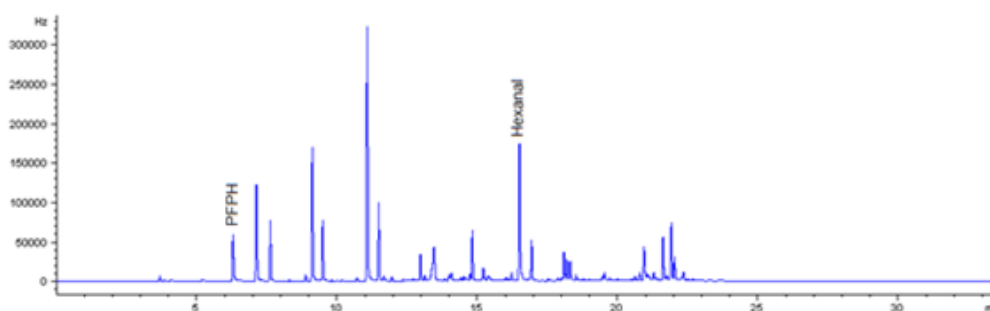
Perfil cromatográfico obtenido por GC/ECD, de los productos secundarios generados en el Sistema Lipídico II (crema cosmética, o/w), sometido a la radiación UVA, en presencia de BHT.

ANEXO H

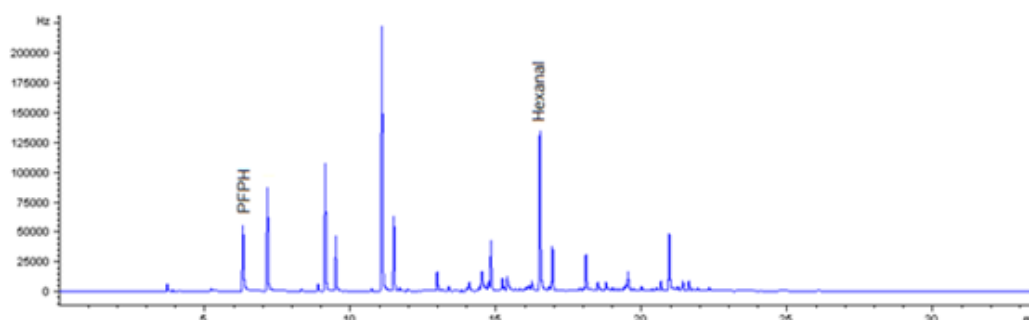
Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD (Columna HP-5, 30 m), donde se muestra el efecto protector en el Sistema Lipídico II (crema cosmética, o/w), sometido a la irradiación con la luz UVA, de los AE de las plantas bajo estudio.



Perfil cromatográfico obtenido por GC/ECD, de los productos secundarios generados en el Sistema Lipídico II (crema cosmética, o/w), sometido a la radiación UVA, con el AE de *Lippia origanoides*.



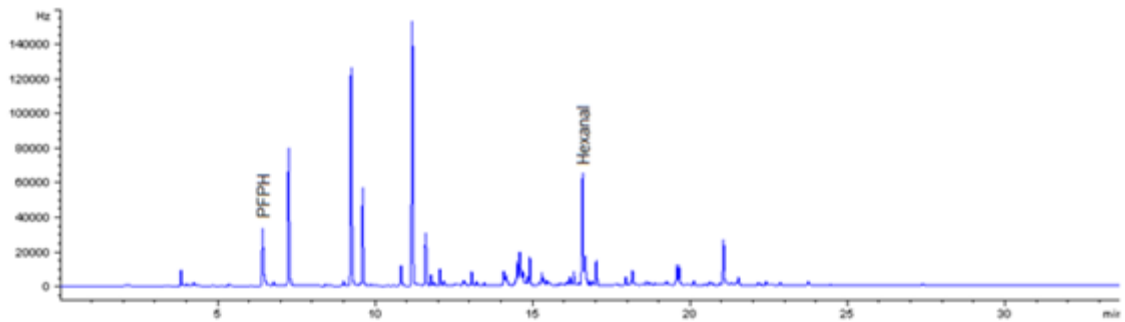
Perfil cromatográfico obtenido por GC/ECD, de los productos secundarios generados en el Sistema Lipídico II (crema cosmética, o/w), sometido a la radiación UVA, con el AE de *Rosmarinus officinalis*.



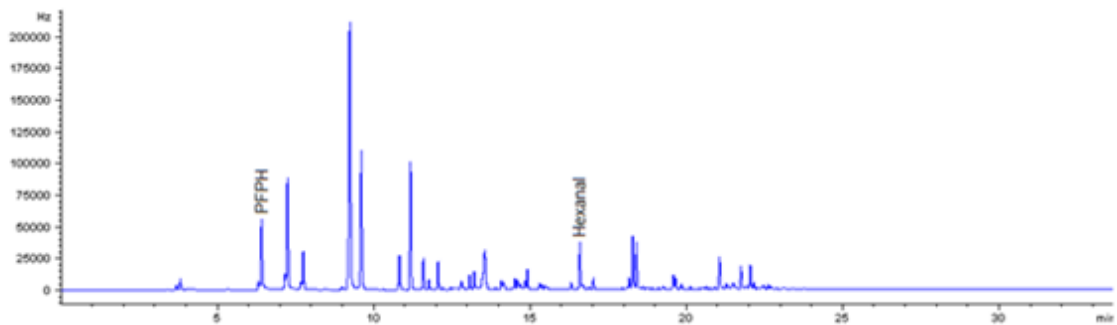
Perfil cromatográfico obtenido por GC/ECD, de los productos secundarios generados en el Sistema Lipídico II (crema cosmética, o/w), sometido a la radiación UVA, con el AE de *Salvia officinalis*.

ANEXO I

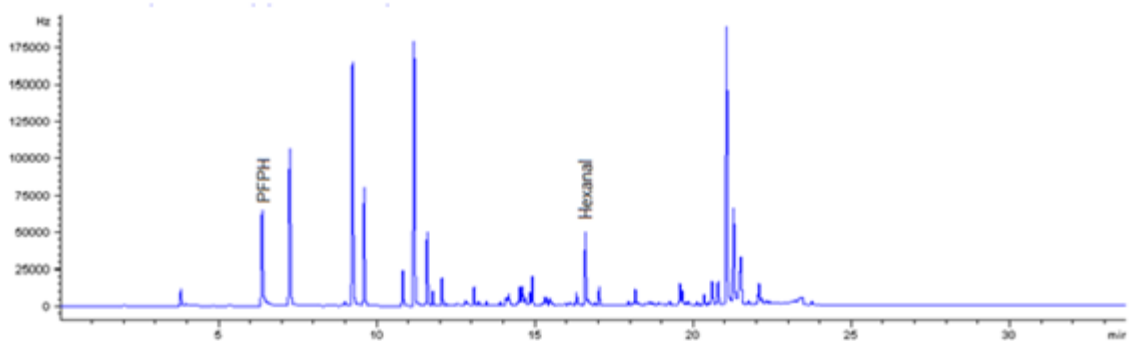
Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD (Columna HP-5, 30 m), donde se muestra el efecto protector en el Sistema Lipídico II (crema cosmética, o/w), sometido a la irradiación con la luz UVA, de los extractos de las plantas bajo estudio.



Perfil cromatográfico obtenido por GC/ECD, de los productos secundarios generados en el Sistema Lipídico II (crema cosmética, o/w), sometido a la radiación UVA, con extracto de *Lippia origanoides*.



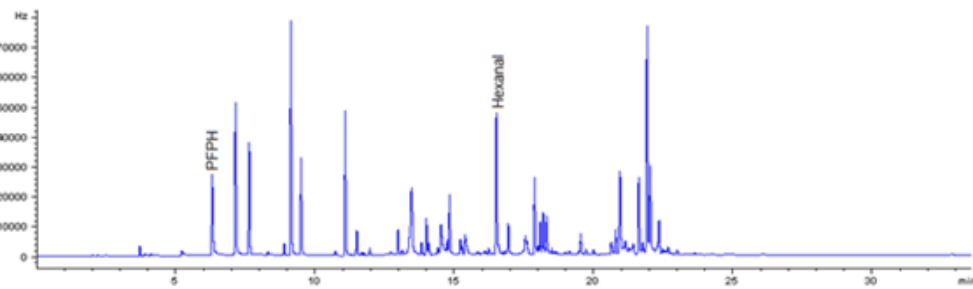
Perfil cromatográfico obtenido por GC/ECD, de los productos secundarios generados en el Sistema Lipídico II (crema cosmética, o/w), sometido a la radiación UVA, con extracto de *Rosmarinus officinalis*.



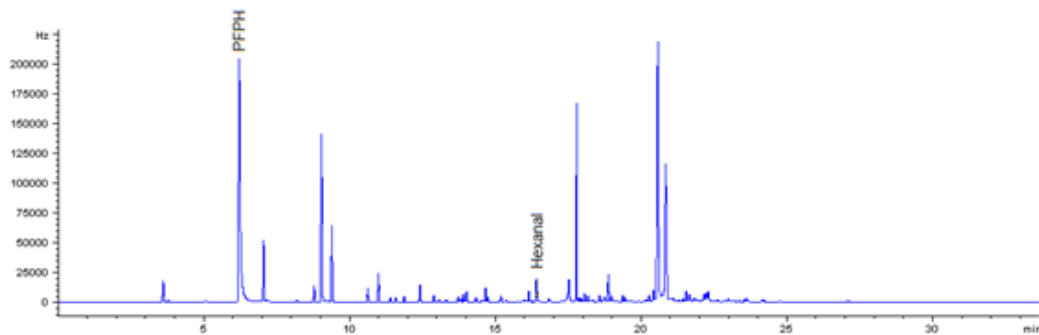
Perfil cromatográfico obtenido por GC/ECD, de los productos secundarios generados en el Sistema Lipídico II (crema cosmética, o/w), sometido a la radiación UVA, con extracto de *Salvia officinalis*.

ANEXO J

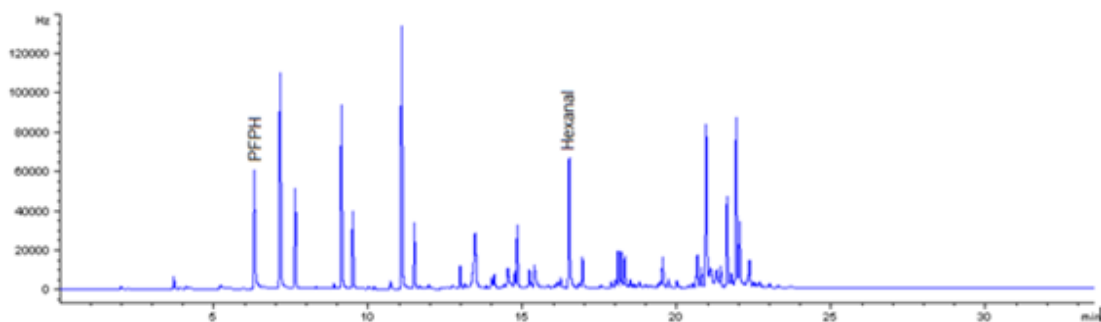
Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD (Columna HP-5, 30 m), donde se muestra el efecto protector en el Sistema Lipídico II (crema cosmética o/w), sometidos a la irradiación con la luz UVA, de las mezclas binarias (1:1), de los AE bajo estudio.



Perfil cromatográfico obtenido por GC/ECD, de los productos secundarios generados en el Sistema Lipídico II (crema cosmética o/w), sometido a la radiación UVA, con la mezcla de AE de *Rosmarinus officinalis* y *Lippia origanoides*.



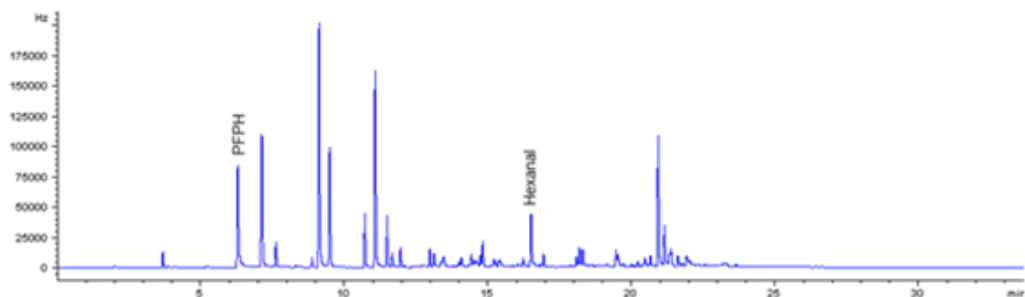
Perfil cromatográfico obtenido por GC/ECD, de los productos secundarios generados en el Sistema Lipídico II (crema cosmética o/w), sometido a la radiación UVA, con la mezcla de AE de *Lippia origanoides* y *Salvia officinalis*.



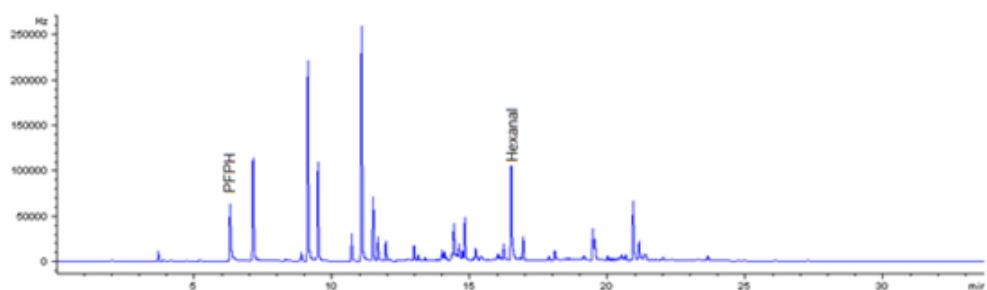
Perfil cromatográfico obtenido por GC/ECD, de los productos secundarios generados en el Sistema Lipídico II (crema cosmética o/w), sometido a la radiación UVA, con la mezcla de AE de *Salvia officinalis* y *Rosmarinus officinalis*.

ANEXO K

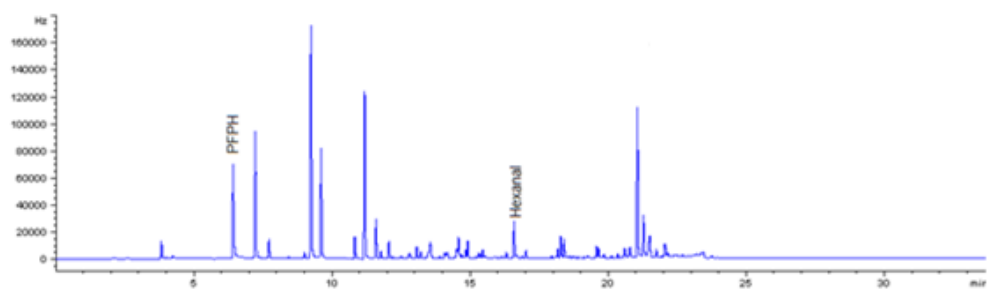
Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD (Columna HP-5, 30 m), donde se muestra el efecto protector en el Sistema Lipídico II (crema cosmética o/w), sometidos a la irradiación con la luz UVA, de las mezclas binarias (1:1), de los extractos bajo estudio.



Perfil cromatográfico obtenido por GC/ECD, de los productos secundarios generados en el Sistema Lipídico II (crema cosmética o/w), sometido a la radiación UVA, con la mezcla de extractos *Rosmarinus officinalis* y *Lippia organoides*.



Perfil cromatográfico obtenido por GC/ECD, de los productos secundarios generados en el Sistema Lipídico II (crema cosmética o/w), sometido a la radiación UVA, con la mezcla de extractos *Lippia organoides* y *Salvia officinalis*.



Perfil cromatográfico obtenido por GC/ECD, de los productos secundarios generados en el Sistema Lipídico II (crema cosmética o/w), sometido a la radiación UVA, con la mezcla de extractos *Salvia officinalis* y *Rosmarinus officinalis*.