ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS EXTRACTOS Y ACEITES ESENCIALES DE *Lippia origanoides* H.B.K., *Zingiber officinale y Rosmarinus officinalis* L., COMO AGENTES ANTIOXIDANTES EN POLVOS COMPACTOS.

ANDREA CAROLINA ACOSTA RAMÍREZ
LAURA MARCELA CARREÑO BUSTOS

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2011

ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS EXTRACTOS Y ACEITES ESENCIALES DE *Lippia origanoides* H.B.K., *Zingiber officinale y Rosmarinus officinalis* L., COMO AGENTES ANTIOXIDANTES EN POLVOS COMPACTOS.

ANDREA CAROLINA ACOSTA RAMÍREZ
LAURA MARCELA CARREÑO BUSTOS

Trabajo presentado como requisito
parcial para optar al título de Química.

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

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2011

DEDICATORIA

A mi mami que ha sido mi motor, mi **Luz** y mi **Amparo** en cada etapa y peldaño de mi vida.

A mi hermano **Alejandro**, que con su experiencia siempre ha querido guiarme en todos los caminos de la vida.

A mi nono **Saúl** que en esta última etapa ha sido un apoyo excepcional.

A mi papi **Isaías** que desde el cielo se debe sentir orgulloso de este logro tan importante en mi vida.

Laura Marcela.

DEDICATORIA

A mis padres por ser mi ejemplo a seguir, por apoyarme y estar a mi lado siempre que los he necesitado. Gracias por su amor, comprensión y por confiar en mi, los amo con todo mi corazón.

A mis hermanos Lu y Huguito, a quienes adoro y por quienes siento profunda admiración. Su apoyo incondicional y sus consejos me permitieron sobrellevar cada prueba en este camino y hoy puedo decir lo logré, vendrán muchas cosas más, confío en que la vida nos permita compartirlas una a una juntos.

A mis nonitos, Isabel y Evaristo, ejemplo de sabiduria y amor. Gracias por sus oraciones y por enseñarme que el camino de la vida está lleno de muchas cosas y oportunidades que solo Dios sabe por qué las puso ante mis ojos.

A Rubén, mi novio y gran apoyo. Te debo muchos años de amor, paciencia, consejos y vivencias. Tenerte a mi lado a pesar de la distancia que superamos juntos es una bendición de Dios, te amo mi cielo. Gracias por saberme llevar en esta etapa de estudiante y por apoyarme siempre en todo lo que me he propuesto.

A Sonia, Alfredito y Cris… sin palabras, simplemente mi segundo hogar, Gracias por estar pendientes de mi, siempre que lo he necesitado. Los quiero mucho.

Andrea Carolina.
"Monis"

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elena Stashenko y al Dr. Jairo René Martínez, especial agradecimiento por sus aportes al desarrollo de esta investigación. A todos mis compañeros de CENIVAM, especialmente a Vane, Eva, Andrew y a Cori.

A la planta docente de la Escuela de Química de la Universidad Industrial de Santander. A Adolfo Hernández, por sus contínuas enseñanzas de laboratorio y apoyo en esta etapa de mi vida, un gran amigo y profesional.

Al Ministerio de Agricultura por financiar este proyecto y, a la Dra. Martha Neira, Directora científica de Laboratorios M&N, empresa cosmética que suministró la base de polvos compactos "*in-line*".

A Yauris, a quien siempre le ha sobrado corazón de madre. Lili, Ronal, Cami, Nicky y Osquitar… mi primer hogar en Bucaramanga.

A Sheryl, figuito, mis tios Consuelo y George,, por ser mi compañía en casa estos últimos años, gracias por todo.

A mis amigas y amigos que hicieron que este camino lo viviera como una etapa de alegría, esperanza y aprendizaje. Lauris, Gloris, Luis, Pili, Mayita, Lelys, Pao, Eli y Vero. Infinitas gracias por abrirme su corazón y permitirme estar en él. A Camilo Meléndez, ejemplo de esmero y dedicación. Gracias por los buenos momentos compartidos, un aula nos espera.

A todos los cercanos y lejanos que me acompañaron siempre, realmente las palabras sobran para agradecerles por creer en mí.

Andrea Carolina.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la energía y la fuerza día a día en mi vida para no desfallecer y salir siempre adelante.

A mi mami, por ser ejemplo de mujer, por ser mí apoyo incondicional, por su esfuerzo, dedicación y confianza en mí.

A mi hermano y mi abuelo, por su apoyo, confianza y compañía.

A la Dra. Elena y el Dr. Jairo René por su gran contribución a mi formación profesional.

A todos mis compañeros de CENIVAM que contribuyeron a culminar este logro en mi carrera y en mi vida, Corina, Mary Andrea, Viviana, Nathalia, Freys por sus sabios aportes profesionales y a Andrea (mi compañerita) por su comprensión, apoyo y paciencia en este último tiempo.

A Alejo que desde que llegó a mi vida la iluminó, con sus sabios consejos me dio ánimo y fuerzas para culminar esta etapa.

A Olga, compañera de carrera y amiga del alma que siempre me apoyó, y creyó en mí.

Y a todos aquellos seres queridos, amigos y familiares que de una u otra forma han estado al lado mio y que hoy se alegran de este gran logro en mi vida.

Laura Marcela Carreño B.

CONTENIDO

Pág.

INTRODUCCIÓN 21

1. ESTADO DEL ARTE 23

1.1 ANTECEDENTES 24

1.2 GENERALIDADES DE LOS ACEITES ESENCIALES 27

1.3 LOS ACEITES ESENCIALES EN EL COMERCIO MUNDIAL 28

1.4 REGULACIÓN DE LA INDUSTRIA COSMÉTICA 29

1.4.1 Cosmecéuticos. 30

1.4.2 Reacciones de hipersensibilidad a los cosméticos. 32

1.4.3 Polvos compactos faciales. 33

1.5 ANTIOXIDANTES 35

1.5.1 Vitamina E. 37

1.5.2 Butil-hidroxitolueno (BHT). 37

1.5.3 Antioxidantes naturales. 38

1.6 RADICALES LIBRES 40

1.7 ESTRÉS OXIDATIVO 41

1.7.1. Definición. 41

1.7.2 Generalidades. 41

1.8 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO) 42

1.9 RADIACIONES UV 42

1.10 PEROXIDACIÓN LIPÍDICA 43

1.11 Aceites esenciales de *Lippia origanoides* H.B.K., *Rosmarinus officinalis* L. *y Zingiber officinale.* 46

1.11.1 *Rosmarinus officinalis* L. 46

1.11.2 *Lippia origanoides* H.B.K. 47

1.11.3 *Zingiber officinale* Roscoe 47

2. PARTE EXPERIMENTAL 49

2.1 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS DE LABORATORIO 49

2.1.1 Reactivos. 49

2.1.2 Materiales 49

2.1.3. Equipos menores 50

2.1.4. Material vegetal. 51

2.1.5. Polvos compactos. 51

2.2 METODOLOGÍA GENERAL 51

2.3.1. Obtención de aceites esenciales. 52

2.3.2. Obtención de extractos. 53

2.4. EXTRACCIÓN SOXHLET DE POLVOS COMPACTOS Y ANÁLISIS POR GC/MS DEL EXTRACTO OBTENIDO 56

2.4.1. Extracción *Soxhlet*. 56

2.4.2. Determinación de ésteres metílicos de ácidos grasos. 57

2.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES 57

2.5.1. Identificación y caracterización de los componentes de los aceites esenciales. 58

2.6. Implementación y validación del método cromatográfico para la determinación del hexanal, como derivado PFPH, usando microextracción en fase sólida con derivatización simultánea sobre la fibra PDMS/DVB. 58

2.6.1. Determinación de la concentración de la pentaflúorfenilhidracina (PFPH). 58

2.6.2. Valoración del tipo de fibra y tiempos de equilibrio. Se trabajó con una fibra de PDMS/DVB, 59

2.6.3. Análisis GC-μECD del derivado PFPH-hexanal. 59

2.6.4. Determinación de la repetibilidad de los t_R y las áreas cromatográficas. 60

2.6.5. Calibración externa del derivado del hexanal-PFPH. 61

2.7. VALIDACIÓN DEL SISTEMA LIPÍDICO MODELO 62

2.7.1. Peroxidación lipídica en el aceite de girasol sometido a radiación UV. 62

2.7.2. Evaluación de la actividad antioxidante *in-vitro* de los AE, extractos, mezclas de AE y mezclas de extractos de orégano de monte (quimiotipo carvacrol), romero y jengibre en el sistema lipídico modelo sometido a radiación UV. 64

2.8. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *in-vitro* EN POLVOS COMPACTOS DE LOS AE, EXTRACTOS, MEZCLAS DE AE Y MEZCLAS DE EXTRACTOS DE ORÉGANO DE MONTE (quimiotipo carvacrol), ROMERO Y JENGIBRE SOMETIDOS A RADIACIÓN UV. 66

3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS 67

3.1 OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES, POR MWHD, Y EXTRACTOS, POR SFE CON CO_2 SUPERCRÍTICO 67

3.1.1 Rendimientos obtenidos de los AE y extractos. 67

3.2 CARACTERIZACIÓN POR GC-MS DE LOS ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS OBTENIDOS 68

3.2.1 *Zingiber officinale*. 68

3.2.2 *Rosmarinus officinalis* L. 75

3.2.3 *Lippia origanoides* H.B.K. 80

3.3 FORMACIÓN DE LA PENTAFLÚORFENILHIDRAZONA 84

3.3.1. Determinación del solvente en la preparación de las disoluciones de la pentafluórfenilhidracina (PFPH). 84

3.2 CALIBRACIÓN EXTERNA PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL DERIVADO DE HEXANAL CON LA PFPH. 85

3.3 ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DEL DERIVADO HIDRAZÓNICO POR GC-μECD 86

3.3.1 Actividad antioxidante in-vitro de los AE, extractos, mezclas de AE y mezclas de extractos de orégano de monte (quimiotipo carvacrol), romero y jengibre en el sistema lipídico modelo (aceite de girasol) sometido a radiación UV 86

3.3.2 Actividad antioxidante *in-vitro* de los AE, extractos, mezclas de AE y mezclas de extractos de orégano de monte (quimiotipo carvacrol), romero y jengibre en los polvos sometidos a radiación UV. 91

3.4 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS EN EL EXTRACTO OBTENIDO DE LOS POLVOS COMPACTOS 94

3.4.1. Rendimiento de la extracción *Soxhlet*. 94

3.4.2. Determinación del contenido de ésteres metílicos. 95

4. CONCLUSIONES 96

5. RECOMENDACIONES 96

BIBLIOGRAFÍA 99

ANEXOS

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Lista de reactivos y solventes empleados en el presente estudio. 49
Tabla 2. Condiciones de extracción por MWHD de los aceites esenciales del material vegetal bajo estudio. 52
Tabla 3. Condiciones de extracción con fluido supercrítico (tiempo, 1h) del material vegetal bajo estudio. 55
Tabla 4. Muestras evaluadas sometidas a radiación UV en el presente estudio. 65
Tabla 5. Rendimientos de los aceites esenciales y extractos de cada planta. 67
Tabla 6. Composición química del extracto de *Zingiber officinale*, aislado por SFE. 70
Tabla 7. Composición química del AE de *Zingiber officinale*, aislado por MWHD. 73
Tabla 8. Composición química del AE de *Rosmarinus officinalis*, aislado por MWHD. 77
Tabla 9. Composición química del extracto de *Rosmarinus officinalis*, aislado por SFE. 79
Tabla 10. Composición química del AE de *Lippia origanoides* H.B.K., aislado por MWHD. 82
Tabla 11. Composición química del extracto de *Lippia origanoides* H.B.K., aislado por SFE. 84
Tabla 12. Valores estadísticos para la validación del método con los correspondientes límites de detección y cuantificación. 86
Tabla 13. Áreas cromatográficas, desviación estándar (S), coeficiente de variación (%CV) y grado de protección (%GP), del derivado hidrazónico de la pentaflúorfenilhidrazona en los AE, extractos, mezclas de aceites, mezclas de extractos, BHT y vitamina E en aceite de girasol y empleando μ-ECD en el sistema de detección. 90
Tabla 14. Áreas cromatográficas, desviación estándar (S), coeficiente de variación (%CV) y grado de protección (%GP), del derivado hidrazónico de la pentaflúorfenilhidrazona en los AE, extractos, mezclas de aceites, mezclas de extractos, BHT y vitamina E en polvos compactos y empleando μ-ECD en el sistema de detección. 93

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Demanda de los principales ingredientes químicos empleados en los cosmecéuticos. 32
Figura 2. Estructuras químicas de algunos antioxidantes sintéticos usados en alimentos y cosméticos. BHT: Butil-hidroxitolueno; BHA: Butil-hidroxianisol; TBHQ: *terc*-Butilhidroquinona; PG: Galato de propilo. 36
Figura 3. Estructura química del α-tocoferol (vitamina E). 37
Figura 4. Estructuras químicas de los compuestos antioxidantes de los extractos de romero. 39
Figura 5. Estructuras químicas de los compuestos principales en el aceite esencial de *Lippia origanoides* H.B.K. 40
Figura 6. Esquema de acción de los rayos UV y la contaminación en la oxidación celular mediante la peroxidación lipídica. 44
Figura 7. Esquema general de la peroxidación lipídica, en sus etapas de iniciación, propagación y finalización, en el cual, 1, 2, 3 y 4 dan lugar a derivados de tipo alquílico y carbonílico. 45
Figura 8. *Rosmarinus officinalis* L. 46
Figura 9. *Lippia origanoides* H.B.K. 47
Figura 10. Rizomas y planta completa de *Zingiber officinale* Roscoe. 48
Figura 11. Metodología seguida en el presente trabajo de investigación. 51
Figura 12. Equipo de hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD) empleado en el presente trabajo. 53
Figura 13. Extractor con CO_2 supercrítico *SFE-2000-2-FMC50* (*Thar Instruments, Inc,* Pittsburgh, PA, EE.UU.), empleado en el presente trabajo. 54
Figura 14. Fotografías de cada planta después de picar y secar para su posterior extracción con fluido supercrítico SFE. 55
Figura 16. Cromatografo de gases *Hewlett-Packard* (Palo Alto, CA, EE.UU.), HP 6890 Plus, dotado con microdetector de captura de electrones (GC-μECD) usado en el presente estudio. 60
Figura 17. Reactor dotado con lámparas UV, empleado en el estudio de la peroxidación lipídica. 63
Figura 18. Perfil cromatográfico del extracto de *Zingiber officinale,* aislado por SFE. Columna DB-5 (60 m). MSD (EI, 70 eV). 69
Figura 19. Perfil cromatográfico típico del aceite de *Zingiber officinale,* aislado por MWHD. Columna DB-5 (60 m), MSD (EI, 70 eV). 72
Figura 20. Perfil cromatográfico típico del AE de *Rosmarinus officinalis* L., aislado por MWHD. Columna DB-5 (60 m), MSD (EI, 70 eV). 76
Figura 22. Perfil cromatográfico típico del AE de *Lippia origanoides* H.B.K., aislado por MWHD. Columna DB-5 (60 m), MSD (EI, 70 eV). 81

Figura 23. Perfil cromatográfico típico del extracto de *Lippia origanoides* H.B.K., aislado por SFE, a 500 bar, durante 1 hora. Columna DB-5 (60 m), MSD (EI, 70 eV). 83
Figura 24. Determinación del mejor solvente para preparar las disoluciónes de la PFPH. Áreas relativas obtenidas para los solventes metanol, agua y hexano. 85
Figura 25. Perfil cromatográfico típico del derivado hexanal-PFPH, en el aceite de girasol. 87
Figura 26. Perfiles cromatograficos del derivado hexanal-PFPH obtenido en los extractos de romero (A) y jengibre (B). 88
Figura 27. Perfil cromatográfico de la mezcla de AE de *Lippia origanoides* H.B.K. *y Rosmarinus officinalis* (ALORO). 89
Figura 28. Grado de protección de los aceites, extractos, mezclas de aceites, mezclas de extractos, BHT y vitamina E en aceite de girasol. A: Aceite, E: Extracto, LO: *Lippia origanoides* H.B.K.*;* RO: *Rosmarinus officinalis* L.*;* JE: *Zingiber officinale*; LORO: Mezcla de *Lippia origanoides* H.B.K. y *Rosmarinus officinalis* L.*;* LOJE: Mezcla de *Lippia origanoides* H.B.K. y *Zingiber officinale;* JERO: Mezcla de *Zingiber officinale* y *Rosmarinus officinalis* L. 91
Figura 29. Grado de protección de los aceites, extractos, mezclas de aceites, mezclas de extractos, BHT y vitamina E en polvos. A: Aceite, E: Extracto, LO: *L. origanoides;* RO: *R. officinalis;* JE: *Z. officinale*; LORO: Mezcla de *L. origanoides* y *R. officinalis;* LOJE: Mezcla de *L. origanoides* y *Z. officinale;* JERO: Mezcla de *Z. officinale* y *R. officinalis.* 94

LISTA DE ANEXOS

Pág.

Anexo A. Principales resultados encontrados sobre la actividad científica en el campo del estudio de la actividad antioxidante y uso en cosméticos, en las bases de datos *Scopus* y *Web of Science*. 112

Anexo B. Composición química de los polvos compactos *"in line"* suministrados por la empresa cosmética, Laboratorios *M & N.* 115

Anexo C. Perfil cromatográfico de los ésteres metílicos identificados con el patrón de referencia usado por el método FAME. 116

Anexo D. Perfil cromatográfico de los ésteres metílicos identificados con el patrón de referencia usado por el método FAME. 116

Anexo E. Perfiles cromatográficos del derivado hexanal-PFPH de las muestras promisorias de AE, extractos y patrones de referencia sometidos a PL en polvos compactos. A: AE de L. origanoides. B: Mezcla extractos de L. origanoides. y Z. officinale. C: Patron de referencia, BHT. D: Patron de referencia, vitamina E. 117

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

μ -ECD	Detector de micro-captura de electrones
AA	Actividad antioxidante
ABTS	2,2'-Azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico)
ADN	Ácido desoxirribonucléico
AE	Aceite esencial o aceites esenciales
AG	Aceite de girasol
AO	Agente antioxidante
BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
CCV	Compuestos carbonílicos volátiles
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales.
DPPH	Radical 1,1-difenil-2-picrilhidracilo
EE.UU.	Estados Unidos
ECD	Detector de captura de electrones
ERO	Especies reactivas de oxígeno
et al.	y colaboradores
FAME	Metilésteres de ácidos grasos
FAO	Organización de agricultura y alimentos de las naciones unidas
FDA	Administración de alimentos y drogas de Estados Unidos
FID	Detector de ionización en llama
GC	Cromatografía de gases
GC/MS	Cromatografía de gases con detector selectivo de masas
i.e.	es decir, o sea
IR	Índice de retención lineal
m/z	Relación masa/carga
MS	Espectrometría de masas
MWHD	Hidrodestilación asistida por radiación de microondas
OMS	Organización mundial de la salud
PDMS/DVB	Polidimetil siloxano/ Divinil benceno
per se	Por sí mismo, de por sí, por su propia naturaleza
PFPH	Pentafluorofenilhidracina
PG	Galato de propilo
PL	Peroxidación lipídica
PUFA's	Ácidos grasos poliinsaturados
RL	Radical libre
SFE	Extracción con fluido supercrítico

SPME	Micro extracción en fase sólida
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBHQ	Terbutilhidroquinona
UIS	Universidad Industrial de Santander
UV	Ultravioleta

RESUMEN

TÍTULO: ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS EXTRACTOS Y ACEITES ESENCIALES DE *Lippia origanoides* H.B.K.*, Zingiber officinale* y *Rosmarinus officinalis L*., COMO AGENTES ANTIOXIDANTES EN POLVOS COMPACTOS**

AUTORES
ANDREA CAROLINA ACOSTA RAMIREZ
LAURA MARCELA CARREÑO BUSTOS**

PALABRAS CLAVES
Antioxidantes, cromatografía de gases, peroxidación lipídica, aceites esenciales, cosméticos

CONTENIDO

La Industria cosmética se ha interesado por adicionar en sus productos sustancias que disminuyan la acción de los radicales libres, por tal razón, en esta investigación se evaluó la actividad antioxidante (AA) en polvos compactos de los aceites esenciales (AE), extractos, mezclas de extractos y de AE de tres plantas que se pueden cultivar en la región conocidas como: orégano de monte (*Lippia origanoides* H.B.K.), romero (*Rosmarinus officinalis L*.) y jengibre (*Zingiber officinale*). Para tal fin, se desarrolló una metodología implementada en el laboratorio mediante cromatografía de gases con detector selectivo de micro-captura de electrones para cuantificar compuestos carbonílicos de bajo peso molecular con previa derivación de éstos con pentaflúorfenilhidracina (PFPH).

La metodología establecida se desarrolló *in-vitro* en aceite de girasol como sistema lipidico modelo y en una matriz de polvos compactos "*in-line*", con el fin de cuantificar el producto de la oxidación inducida por radiación UV. De este modo, fue posible evaluar la actividad antioxidante de las especies vegetales bajo estudio mediante el monitoreo de la degradación oxidativa de ácidos grasos insaturados (PUFA's), denominado peroxidación lipídica. Finalmente, la AA de los aceites esenciales, extractos y mezclas entre ellos, se comparó con la determinada por los antioxidantes de referencia, vitamina E y Butil-hidroxitolueno (BHT). Usando el aceite de girasol, se pudo determinar que la capacidad antioxidante indicada como porcentaje de grado de protección y entre paréntesis, de la mezcla de los AE de oregano y romero (54%) y la mezcla de extractos de romero y jengibre (63%) es mayor a los antioxidantes de referencia BHT (36%) y vitamina E (52%). A su vez, en los polvos compactos, la capacidad antioxidante del AE de romero (65%) y la mezcla de extractos de oregano y jengibre (62%) supera a la del BHT (52%) pero no la de la vitamina E (99%).

---

[*] Proyecto de grado

[**] Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Directores: Dra. Elena Stashenko y Dr. Jairo René Martínez

ABSTRACT

TITLE: COMPARATIVE STUDY OF EXTRACTS AND ESSENTIAL OILS FROM *Lippia origanoides* H.B.K.*, Zingiber officinale,* and *Rosmarinus officinalis* L. AS ANTIOXIDANTS AGENTS IN COMPACT POWDERS*.

AUTHORS
ANDREA CAROLINA ACOSTA RAMIREZ
LAURA MARCELA CARREÑO BUSTOS**

KEYWORDS
Antioxidants, gas chromatography, lipid peroxidation, esential oils, cosmetics

CONTENT

The cosmetics industry has been interested in their products add substances that reduce the action of free radicals, which accelerate the oxidative degradation of polyunsaturated fatty acids, which leads to the formation of aldehydes and ketones of lowmolecular weight.

This research evaluated the antioxidant activity (AA) in compacts of essential oils (AE), extracts, mixtures of extracts and three-storey AE can be grown in the region and are known as mountain oregano (*Lippia origanoides* H.B.K.), rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and ginger (*Zingiber officinale*). To this end, we developed a methodology implemented in the laboratory by gas chromatography with micro-selective detector for measuring electron capture carbonyl compounds with low molecular weight prior to their referral pentaflúorfenilhidracina (PFPH).

The established methodology developed in-vitro system sunflower oil as a model lipid matrix compacts "in line" in order to quantify the final product of the oxidation induced by UV radiation. Thus, it was possible to evaluate the antioxidant activity of plant species under study by monitoring the oxidative degradation of unsaturated fatty acids (PUFAs), commonly called lipid peroxidation. Finally, the AA of essential oils, extracts and mixtures of them, compared with that determined by reference antioxidants, vitamin E and butylated hydroxytoluene (BHT). Using sunflower oil, it was determined that the antioxidant capacity is indicated as a percentage of degree of protection and in parentheses, the mixture of oregano and rosemary AE (54%) and the mixture of extracts of rosemary and ginger (63%) is higher than the reference antioxidant, BHT (36%) and vitamin E (52%). In turn, pressed powders, the antioxidant capacity of rosemary AE (65%) and the mixture of oregano and ginger extracts (62%) exceeds that of BHT (52%) lower than that of vitamin E (99%).

*Work of degree
**Faculty of science, school of chemistry, program of chemistry, Elena Stashenko, phD. and Jairo René Martínez, phD.

INTRODUCCIÓN

La piel es el órgano más extenso y la primera barrera externa, que está en el frente de batalla contra los daños causados por los radicales libres que son generados por la luz ultravioleta, la contaminación ambiental y otros tipos de radiación.

Los radicales libres son moléculas altamente reactivas que ocasionan daños irreversibles en las moléculas y tejidos; su daño más significativo ocurre en las biomembranas y en el ADN; por lo tanto, para prevenir esto, la Industria cosmética se ha interesado por adicionar, en sus productos, sustancias de origen natural que disminuyan la acción de los radicales libres. Las hierbas aromáticas y las especias han sido parte importante en la dieta y salud humana en el transcurso de los siglos, pues han sido las encargadas de aportar el olor, sabor y aroma a los alimentos pero también, se usan como preservantes, antioxidantes y antimicrobianos en productos alimenticios y cosméticos.

De igual forma, no se puede dejar de lado a los compuestos carbonílicos de bajo peso molecular, los cuales, son los responsables del aroma desagradable en los productos, ya que producen su deterioro organoléptico. Los compuestos carbonílicos, generados en el estrés oxidativo, son los productos finales de la degradación oxidativa de los lípidos, promovida por los radicales libres, radiaciones ionizantes y diferentes sustancias pro-oxidantes (Ferreira, M., 1997).

En esta investigación, se evaluó la actividad antioxidante (AA) de los aceites esenciales (AE), extractos, mezclas de extractos y mezclas de aceites esenciales de tres plantas en polvos compactos. Estas especies son conocidas como orégano de monte (*Lippia origanoides* H.B.K.), romero (*Rosmarinus officinalis* L.*)* y jengibre (*Zingiber officinale),* de las cuales ya se han reportado estudios de AA, antimicrobial, antifúngica y antibacterial (Salgar, W., 2001; Stashenko, E., 1997;

2000). Estas plantas se pueden cultivar en la región y sus cultivos experimentales existen en el complejo agroindustrial piloto CENIVAM, ubicado en el campus de la Universidad Industrial de Santander.

En el presente trabajo, la metodología implementada en el Laboratorio de Cromatografía, para determinar compuestos carbonílicos de bajo peso molecular, productos finales de la degradación oxidativa de los lípidos. Se realizó su previa derivación con pentaflúorfenilhidracina (PFPH), usando microextracción en fase sólida y cromatografía de gases con detector selectivo de micro-captura de electrones. La metodología establecida se desarrolló *in-vitro* en un sistema lipídico modelo y en una matriz de polvos compactos *"in-line",* con el fin de cuantificar el producto de la oxidación inducida por radiación UV. De este modo, fue posible caracterizar y determinar la actividad antioxidante de las especies vegetales bajo estudio, mediante el monitoreo del hexanal, principal producto de la degradación oxidativa del ácido linoléico.

La actividad antioxidante de los aceites esenciales, extractos y mezclas entre ellos, se comparó con la de los antioxidantes de referencia, vitamina E y Butil-hidroxitolueno (BHT). En el sistema lipídico modelo (aceite de girasol) se determinó que el grado de protección o capacidad antioxidante (que se indica en porcentaje y entre paréntesis) de la mezcla de los AE de oregano y romero (54%) y de la mezcla de extractos de romero y jengibre (62%) superó el grado de protección de los antioxidantes de referencia BHT (36%) y vitamina E (52%). No obstante, los mejores resultados de AA, obtenidos para los polvos compactos "*in-line",* correspondieron al AE de orégano (65%) y la mezcla de extractos de orégano y jengibre (62%), por encima del valor de la AA del antioxidante sintético, BHT (52%).

1. ESTADO DEL ARTE

1.1 ANTECEDENTES

El constante desarrollo y el crecimiento científico en el área del estudio de aceites esenciales como agentes antioxidantes surgen como respuesta a la necesidad de encontrar nuevas y mejores mezclas de origen natural que permitan conservar los productos ya sea de tipo cosmético o dietario.

La obtención de aceites esenciales y extractos a través de la historia se ha llevado a cabo por medio de varios métodos. Entre ellos figuran: destilación por arrastre con vapor, hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD), extracción con solventes volátiles (alcohol, cloroformo, diclorometano, pentano, hexano, éter de petróleo, etc.) y extracción con CO_2 supercrítico (SFE). Las técnicas más empleadas son MWHD y SFE, puesto que han sido reportados, a la fecha, en innumerables trabajos de investigación que corroboran su efectividad, siendo éstas las técnicas que favorecen la composición y rendimiento de los aceites y extractos, respectivamente. Esto se debe a que éstos se obtienen puros, libres de solventes, a bajo costo y sin alteraciones químicas. La extracción con solvente presenta la desventaja, ya que su eliminación aumenta los costos energéticos y los riesgos de pérdida de compuestos volátiles durante la obtención del extracto.

Baratta, M.T. *et al*. (1998), determinaron la actividad antimicrobial y antioxidante de algunos aceites esenciales, entre los cuales se destacó el AE de *Rosmarinus officinalis* L.*,* por su alto potencial de inhibición de crecimiento de hongos y bacterias*,* así como poralto contenido de compuestos fenólicos, que le confieren muy buena capacidad antioxidante, comparada con la de otros antioxidantes sintéticos, como el BHT y el α-tocoferol. Nogala-Kalucka *et al.* (2005) han determinado la eficiencia de obtención del extracto de romero, para interactuar con

radicales libres formados en emulsiones acuosas del ácido linoléico con β-caroteno y, por medio de un modelo cinético, evaluaron su actividad antioxidante.

Por otra parte, los estudios realizados por Oboh, G. *et al.* (2010), para el *Zingiber officinale* var. rubra (jengibre rojo) y *Zingiber officinale* Roscoe (jengibre blanco), con respecto a su potencial antioxidante y de inhibición, fueron realizados induciendo la peroxidación lipídica en el cerebro de ratas *in vitro,* por medio de iones Fe^{2+}. Los extractos acuosos fueron capaces de proteger al cerebro de la peroxidación lipídica. Sin embargo, el extracto acuoso de jengibre rojo presentó un mayor efecto protector que el jengibre blanco, comparado con el calculado de la peroxidación lipídica inducida *in vitro* en el cerebro, debido a que el extracto de jengibre posee la habilidad de reducir el hierro Fe^{3+} a Fe^{2+}, lo que constituye un potente mecanismo de defensa a la oxidación producida por metales de transición, con los cuales los componentes del extracto pueden formar complejos quelantes. Se aclara, que los antioxidantes son especies reductoras, pero, no todos los agentes reductores se consideran como antioxidantes. Asímismo y de acuerdo con las propiedades fitoquímicas, el extracto acuoso de jengibre posee la capacidad de atrapar los radicales hidroxilo, por su alto contenido fenólico, y debido a esto posee una excelente actividad antioxidante (Puertas M., 2002).

Un estudio similar, realizado por Ahmed, S. *et al*., (2009), en el *Radio BiologyCenter* del Ministerio de Ciencia y Tecnología de Baghdad, Iraq, con el fin de determinar el contenido fenólico de algunas especies, emplearon la peroxidación lipídica como metodología con la cual determinaron que el contenido fenólico del extracto de *Zingiber officinale* era de 64.8 mg/100g, en comparación con el método del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), donde el contenido fenólico del extracto de jengibre encontrado fue de 54.8 mg/100g. Según los autores, esto lleva a seleccionar la técnica de peroxidación lipídica como la más selectiva debido a que se obtiene casi 10% más de compuestos fenólicos que con la otra técnica.

Los resultados obtenidos por Singh, G. *et al.* (2008),demostraron que al someter el aceite de *Zingiber officinale* y su oleorresina a un control con aceite de girasol incubados a 70ºC por periodos de 7 a 28 dias, el AE resultó poseer una actividad antioxidante mayor que la del BHT, porque contiene α-zingibereno, que le confiere además su actividad antifúngica y, a la vez permite inhibir la peroxidación; el buen potencial de inhibición de esta molécula, se le puede atribuir a la presencia de un anillo aromático que contiene en su estructura un grupo polar.

Dos Santos, *et al*. (2004), reportaron el análisis de los aceites, obtenidos de las hojas de *Lippia origanoides* H.B.K.*,* de diferentes cosechas, utilizando las técnicas analíticas de GC/MS, ^{1}H y ^{13}C-RMN, los aceites mostraron una composición química similar.El principal componente identificado fue carvacrol (33.5 - 42.9%), junto con γ-terpineno (8.0 - 10.5%), timol (5.1 - 8.4%), metil timol (6.1 - 8.7%) y *p*-cimeno (11.9 - 15.8%). La evaluación *in vitro* de los aceites mostró una significativa actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus* MRSA*, Candida albicans y C. tropicalis*.

En el Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM, Castañeda, M. (2007) y Ruiz, C. (2008), estudiaron la composición del aceite esencial de *Lippia origanoides* H.B.K.y de sus diferentes quimiotipos (carvacrol, *p*-cimeno y timol). El trabajo de investigación realizado por Castañeda, M. (2007), concluye que el AE de *Lippia origanoides* H.B.K. (quimiotipo carvacrol) presentó el rendimiento de extracción más alto y fue más activo en los ensayos de $DPPH^{\bullet}$ y $ABTS^{+\bullet}$, siendo el antioxidante natural muy efectivo, y, que además, presenta una alta actividad biológica, inhibe el crecimiento de los hongos: *Candida parapsilosis, C. krusei, Aspergillus flavus y A. fumigatus.* Por otro lado, en diversas patentes consultadas, se registra que los antioxidantes utilizados en polvos compactos, son aquellos con alto contenido fenólico. De igual forma, polvos compactos usan en sus formulaciones los ácidos grasos esenciales que el cuerpo humano por si solo no

puede sintetizar, siendo el ácido linoléico y el ácido α-linolénico los más representativos (Bracco, U., 1995).

Con el objetivo de enmarcar el estudio de las plantas aromáticas medicinales y su aplicación como antioxidantes, se realizó un análisis cienciométrico utilizando las bases de datos *Web of Science* y *Scopus*; se analizó la producción intelectual desde el año 2000 hasta el año 2010 (Véase **Anexo A**). Al analizar los resultados de la búsqueda en la literatura química especializada durante la última década, se destaca un creciente interés en el estudio de la capacidad antioxidante del material vegetaly sus aceites esenciales. Hay mayor número de estudios sobre *Rosmarinus officinalis* L., seguido de *Zingiber officinale* y, por último, *Lippia origanoides* H.B.K., que solo presenta tres publicaciones, dos de ellas, de *Stashenko E.* y sus colaboradores. Entre las áreas de mayor interés se encuentran: tecnología en alimentos, farmacología, toxicología, farmacéutica. Las revistas científicas en donde se ha publicado sobre el tema son *Food Chemistry, Journal of Agricultural and Food Chemistry, Journal of Food Science, Food Science & Technology* y A*pplied Chemistry*.

Por otro lado, en la última década, cada una de estas plantas presenta muy pocos estudios sobre su aplicación en cosméticos; romero, nuevamente, es la planta más estudiada, con 14 publicaciones, jengibre, con 2 publicaciones y orégano de monte, no presenta hasta la fecha de consulta publicaciones relacionadas con su aplicación en cosméticos. Por ello, esta investigación será un aporte en este campo innovador, poco estudiado y con mucha aplicabilidad tanto científica como industrial.

1.2 GENERALIDADES DE LOS ACEITES ESENCIALES

Los AE se definen, desde el punto de vista fitoquímico, como el conjunto de metabolitos secundarios volátiles de la planta, que evocan fragancia o pueden ser aislados de ella por métodos de arrastre con vapor o hidrodestilación. Son mezclas

complejas de hasta más de 100 componentes los cuales pueden ser compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos (Bandoni, A., 2000). El valor económico y la aplicación industrial de las esencias están directamente relacionada con su composición química, la cual, a su vez, determina todas las propiedades macroscópicas, ya sean su olor, color, apariencia y también su actividad antioxidante y biológica.

Teniendo en cuenta que los aceites esenciales son producto del metabolismo de la planta, su composición puede presentar un constante cambio, modificándose las proporciones de los analitos o transformándose unos en otros.

1.3 LOS ACEITES ESENCIALES EN EL COMERCIO MUNDIAL

El mercado internacional de los aceites esenciales es alrededor de 1.300 millones de dólares anuales (Biocomercio Sotenible, 2003; Dinámica de comercio exterior, 2008). Un análisis del comercio de los AE a lo largo de los últimos años permite observar que los principales exportadores e importadores han mantenido una constante presencia en el comercio global del sector. Cabe a su vez destacar, que las importaciones mundiales en los últimos años han superado los mil millones de dólares anuales. Estados Unidos, es el principal proveedor de AE, exportando AE de *Mentapiperita* y *M. spearmint* y los aceites agrios. Otros exportadores importantes son Indonesia, India, China, Vietnam y Brasil, entre otros.

Generalmente, los aceites esenciales tienen un alto valor en relación al volumen que representan, con una demanda internacional moderada, según el mercado y la industria, ya sea que se trate de alimentos, fármacos o cosméticos. En América Latina, los principales exportadores son Argentina, con AE de limón, y Brasil, con aceite de naranja. La producción de aceites esenciales en Colombia es muy escasa y por esto se puede considerar que éstos son prácticamente importados en su

totalidad de otros países. Con respecto a exportación, las principales exportaciones de AE se dieron con Venezuela en el año 2006, donde junto con perfumería y cosméticos alcanzaron una participación del 3.2% del total de exportaciones (Dinámica Comercio Exterior, 2007).

Este análisis nos enmarca a nivel mundial en la industria esenciera y nos muestra una vía de desarrollo poco explotada por Colombia. En lugar de sólo importar los AE se podría incursionar en su exportación, si se mantiene la unión armónica de tres elementos vitales: Producción, control de calidad y mercadeo (Stashenko, E., 2006).

1.4 REGULACIÓN DE LA INDUSTRIA COSMÉTICA

El crecimiento de la industria cosmética, la elaboración de nuevos productos y la incorporación de nuevos ingredientes, generan la necesidad de actualizar las normas de seguridad para los productos cosméticos, a raíz del suceso ocurrido en el año de 1938 en EE.UU., en donde más de cien personas murieron después de haber consumido un "*sulfa-elixir"* con sabor a frambuesa fabricado por *S.E. Massengill Company*, el cual salió al mercado sin haber realizado las pruebas de toxicidad correspondientes. Bajo una investigación, se comprobó que el 70% del "*sulfa-elixir"* era dietilenglicol, altamente tóxico. Como consecuencia del escándalo y protesta pública se estableció la Ley Federal de Alimentos, Drogas y Cosméticos, (*Federal Food, Drug and Cosmetic Act.*). *Véase,FD&C Act. Chapter V: Drugs and Device; Chapter VI: Cosmetics*.

Se denomina "cosmético" a todo artículo producido para ser frotado, espolvoreado, rociado, salpicado, introducido o aplicado, del modo que sea, sobre la superficie del cuerpo, con el fin de limpiar, embellecer, aumentar el atractivo o modificar su apariencia. Según la directiva europea, se especifica que deben actuar sobre piel,

cabello, uñas, labios, genitales externos, dientes o cavidad bucal (Directiva de Cosmética CEE/76/768. Artículo 1), (Deon, M., 2006).

En los principales mercados del mundo, las leyes exigen que todos los cosméticos o productos de cuidado personal, que se comercialicen en las tiendas, sean seguros para su uso indicado. La normatividad sobre estos productos es definida por cada país, pero, en general, se observan tienen criterios comunes, con las definiciones propuestas por la *U.S. Food and Drug Administration* (FDA). En Europa, no existía una directiva comunitaria hasta 1976 y no era obligatorio hasta 1997 el etiquetado detallado de los ingredientes. En Estados Unidos, aunque se especifican los componentes de los cosméticos desde hace 20 años, es la FDA la que legisla este tema. La Comunidad Andina de Naciones (CAN), integrada por Bolivia, Colombia, Ecuador y Perú, establecieron en marzo de 2002 la Decisión 516, que regula el comercio de los productos cosméticos en estos países. En Colombia, la regulación de los productos cosméticos está a cargo del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos, INVIMA, y se basa en la Decisión 516.

1.4.1 Cosmecéuticos. El término "Cosmecéuticos" fue mencionado por primera vez en 1984, por el dermatólogo americano Albert Kligman, quien los definió como "Agentes tópicos que tienen tanto una función cosmética como terapéutica". Por primera vez, se propuso una estrecha relación entre la categoría de cosméticos y la de fármacos. La empresa de investigación de mercado reconocida a nivel internacional, Euromonitor, define los cosmecéuticos como aquellos productos tópicos híbridos, con características cosmético-farmacéuticas, que contienen ingredientes biológicamente activos con un efecto sobre el usuario.

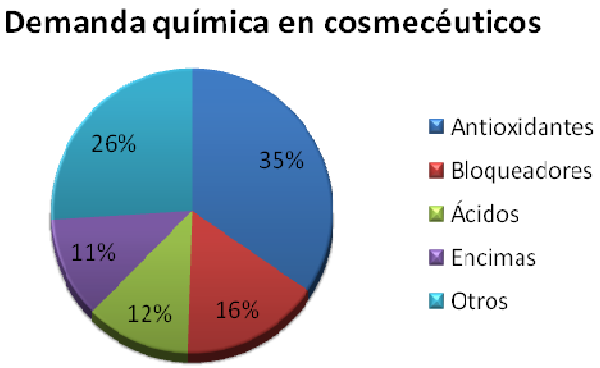
El término "cosmecéuticos" no ha sido revisado por la FDA. Según la FDA un producto puede ser un medicamento, un cosmético, o una combinación de ambos, pero el término “cosmecéutico” no está considerado. Actualmente, tanto los

cosméticos, como los cosmecéuticos, son probados para certificar su seguridad, pero no hay una normativa que revise las afirmaciones de los fabricantes respecto a los beneficios de los ingredientes que contienen. En general, los cosmecéuticos contienen ingredientes como vitaminas, extractos de hierbas, aceites y otros nutrientes, pero el fabricante no tiene cómo demostrar que su producto tiene una mayor biodisponibilidad, penetra más a nivel dérmico o tiene efectos terapéuticos beneficiosos para la salud de la piel, en comparación con los cosméticos comunes (Schneider, S., 2009).

Según un estudio realizado por *Freedonia* en octubre de 2008, se estima que la demanda de productos cosmecéuticos en los EE.UU., aumentará 7,4 % anualmente hasta el año 2012, impulsado por los fenómenos relacionados con el envejecimiento de la población y su deseo de mantener la apariencia de juventud. Los antioxidantes seguirán siendo la principal categoría de productos químicos, seguidos de bloqueadores solares, ácidos y enzimas botánicas. Los productos de cuidado de la piel inyectables registrarán el crecimiento más rápido.

El estudio también considera factores ambientales, detalles de estructura de la industria y evalúa la cuota de mercado de las empresas como *Johnson & Johnson, Procter & Gamble* y *L'Oreal.* La **Figura 1** muestra la tendencia de mayor demanda de productos que han sido utilizados en los cosmecéuticos a través de la historia.

Figura 1. Demanda de los principales ingredientes químicos empleados en los cosmecéuticos.



Fuente: *The Freedonia Group Inc*, 2008.

1.4.2 Reacciones de hipersensibilidad a los cosméticos. Entre las mujeres, se describe un mayor número de reacciones adversas al uso de cosméticos (jabón, crema facial, desodorante, champú y sombra de ojos). Entre los hombres, se han realizado investigaciones que evidencian reacciones alérgicas al jabón, seguidas de la loción para después del afeitado, el desodorante y el gel de baño. La prevalencia de reacciones adversas, alérgicas o no, a los cosméticos es difícil de establecer. Clásicamente, se ha situado en torno del 2 - 4% de las consultas dermatológicas, aunque es probable que la prevalencia real sea mayor (Domínguez, J. *et al.* 2009). Por una parte, el alto consumo de estos productos, hace que la población potencialmente susceptible sea muy alta. Además, algunas reacciones no son percibidas como tales por los pacientes o, simplemente, no son motivo de consulta al médico y el paciente se limita a no utilizar más el cosmético sospechoso. Finalmente, un porcentaje variable de casos puede quedar a nivel de médicos generales, quienes remiten sus pacientes para estudio especializado.

Es de destacar, que sólo el 10% de las reacciones adversas a los cosméticos, son debidas realmente a una etiología alérgica. En la mayoría de los casos, se trata de un efecto irritativo, ya sea por la sustancia utilizada "*per se*", o por empeorar una

dermatosis ya existente, como un acné, una dermatitis atópica o seborreica (Dominguez, J. *et al.,* 2009).

Según el doctor Honeyman (2007), los cosméticos son mezclas complejas de componentes químicos, se emplean hasta 8000 sustancias diferentes en la industria de la cosmética. Las fragancias pueden provocar cuadros alérgicos de asma o conjuntivitis. También éstos han descrito episodios asmáticos provocados por colorantes de las bases de maquillaje, como el Carmín. Otros episodios de asma ocupacional pueden ser producidos por los persulfatos. Las zonas del cuerpo en las que se produce con más frecuencia una dermatitis por contacto por cosméticos son la cara y, en especial los párpados, pero también se puede originar en cuello, axilas, brazos, antebrazos y las manos. Sustancias preservantes, antimicrobianas, fragancias, son los principales agentes cosméticos causantes de una dermatitis por contacto.

Para esto se han diseñado productos hipoalergénicos con el objeto de emplearlos en personas alérgicas. Un producto sólo puede denominarse hipoalergénico si su composición no incluyera sustancias cosméticas alergénicas. Pero esto no siempre ocurre, en la mayoría de los casos sólo describen ciertos alérgenos específicos, nunca todos. En 1977, la FDA determinó que el término "hipoalergénico", o términos similares, en cosméticos era inexistente, ya que los ingredientes básicos en los primeros son los mismos que en otros productos para el mismo uso. La denominación no está legalmente protegida. En consecuencia, cualquier producto puede atribuirse el término de hipoalergénico después de superar ciertas pruebas, no estandarizadas, sobre la piel. Por lo tanto, a juicio de los expertos, este término no tendría ningún valor científico (Martini, M. *et al*. 1997).

1.4.3 Polvos compactos faciales.Según la cosmetología de Harry (Wilkison, J.B., 1990), la función del polvo facial es proporcionar una terminación suave a la piel, enmascarando imperfecciones visibles menores y todo brillo debido a la humedad,

grasa de la sudoración o preparaciones utilizadas sobre la piel, proteger la epidermis de agentes externos, aterciopelarlo y fijar la base de maquillaje. El objeto parece ser que la piel aparezca agradable al tacto. El grado de opacidad del polvo puede variar desde opaco a mate, cualquiera que sea esta terminación, debe poseer propiedades razonablemente duraderas para que pueda adherirse a la piel y ser resistente a las mezclas de las secreciones de ésta. Finalmente, deberá servir como vehículo para diseminar un olor agradable durante el contacto de partículas cargadas con perfume con una superficie como la de la piel. Un polvo facial moderno es una mezcla de varios constituyentes, cada uno seleccionado por sus cualidades específicas.

El dióxido de titanio, el óxido de zinc, el caolín y el óxido de magnesio son las sustancias más utilizadas para mejorar el poder enmascarador de los polvos faciales. El almidón o almidones modificados (*e. g.,* arroz) se utilizan casi exclusivamente en las formulaciones de los polvos faciales, por sus excelentes propiedades absorbentes, buen poder enmascarador y suavidad que imparte a la piel. El deslizamiento es la cualidad de fácil extensión y aplicación del polvo para proporcionar una sensación de suavidad característica sobre la piel. Esta propiedad la imparte principalmente el talco y también jabones metálicos, como estearato de zinc y, en menor grado, el almidón. La adherencia es otra propiedad importante de los constituyentes de polvos faciales, que determina cómo el polvo se sujeta al rostro. Esta propiedad se imparte a los polvos faciales por la inclusión de talco y algunos jabones metálicos del ácido esteárico, insolubles en agua tales como, estearatos de zinc y magnesio. Los últimos se utilizan en polvos faciales en cantidades que varían entre el 3 y el 10%. Además de dar adherencia a la piel, también proporcionan suavidad y esponjosidad al producto terminado, dotan a los polvos de alguna repelencia al agua. También la adherencia de los polvos a la piel se puede mejorar con la incorporación de ciertos emolientes, tales como alcoholes cetílico y estearílico y monoestearato de glicerilo, usualmente en cantidades que varían entre 0,5 y 1,5%. Otra propiedad es la luminosidad; para esto se usan

sustancias como yeso, almidón de arroz y almidón preparado. Los colorantes son sustancias inorgánicas, tanto coloreadas como incoloras. La FDA estableció las sustancias permitidas como aditivos colorantes; éstas dan los tonos particulares tostado, melocotón, etc. Debe evitarse el uso de colorantes hidrosolubles o liposolubles en un polvo facial pues conducen a rayas, manchas y tintes en la piel cuando se aplican sobre maquillajes normales. Para la preparación de polvos faciales se usan máquinas para mezclar, tamizar y pulverizar.

Las exigencias anteriores con respecto a polvos faciales convencionales también se aplican a polvos compactos. Durante su fabricación se debe garantizar que las pastillas formadas sean de densidad uniforme. La diferencia fundamental entre polvos sueltos y polvos compactos estriba en sus propiedades aglutinantes. Si éstas son inadecuadas, las pastillas se desintegran fácilmente después de la compresión. Si son excesivas, la pastilla formará grumos y resultará grasienta al aplicar. Por tanto son esenciales las propiedades de aglutinación para una compresión sin problemas que le otorgue calidad el producto final. Otra diferencia es que los polvos compactos deben cumplir con mayor cohesión. El caolín coloidal, el óxido de zinc y los estearatos metálicos habitualmente están presentes en una proporción superior a la de los polvos faciales sueltos y, en ocasiones, el almidón se incorpora para facilitar la compresión. Se pueden utilizar aglutinantes hidrosolubles como gomas naturales y sintéticas, entre 0,1 a 3% en peso del producto. Para observar la composición de materias primas de los polvos compactos "*in-line"*, véase **Anexo B.**

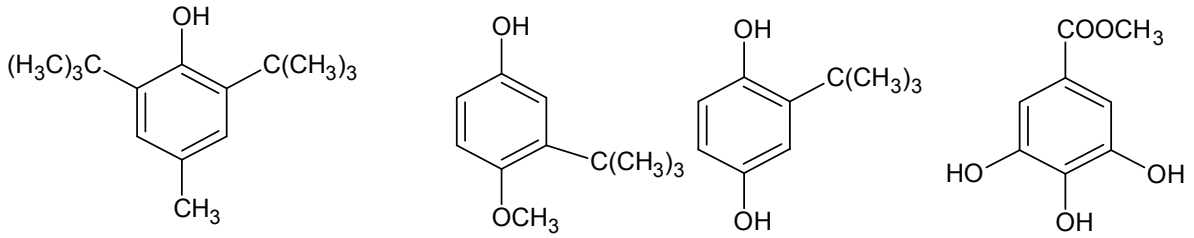
1.5 ANTIOXIDANTES

Un antioxidante se define de forma general como "cualquier sustancia que cuando está presente en concentraciones bajas, inhibe o previene la oxidación de un sustrato" (Tafurt, G., 2003). En el caso biomédico se definen como "un tipo de sustancias que se caracterizan por la disminución de la velocidad de las reacciones

de radicales libres en el organismo humano". Según su origen, los antioxidantes pueden ser clasificados como naturales o sintéticos, siendo los primeros los que pueden ser extraídos de plantas o tejidos animales; la mayoría de éstos son compuestos fenólicos (*e.g.*, tocoferoles, flavonoides, ácidos fenólicos) y entre los antioxidantes sintéticos se encuentran compuestos fenólicos a los que se les han introducido diversos grupos alquílicos para aumentar su solubilidad en grasas y aceites; entre los más utilizados se encuentran el Butil-hidroxianisol (BHA), el Butil-hidroxitolueno (BHT), la *ter*-butilhidroquinona (TBHQ) y el galato de propilo (PG). Fenoles, que en su anillo aromático tienen grupos alquilo, son antioxidantes extremadamente efectivos; son también efectivos antimicrobianos. BHA y BHT son fuertemente lipofílicos y se usan extensivamente en emulsiones tipo aceite-agua, también se utilizan juntos, generalmente en mezclas, actuando sinérgicamente.

La CFR (*U.S. Code of Federal Regulations*), regula, en sus títulos 9 y 21, el uso de antioxidantes en productos cárnicos y en alimentos; éstos deben estar a una concentración menor del 0,01%. Los antioxidantes pueden ser de tipo preventivo, ya que evitan la reacción de peroxidación, como α-tocoferol. También pueden ser de tipo "barredor" o "secuestrador", que actúan sobre los radicales reactivos ya formados, donándoles un H o un electrón, para generar especies más estables, menos reactivas.

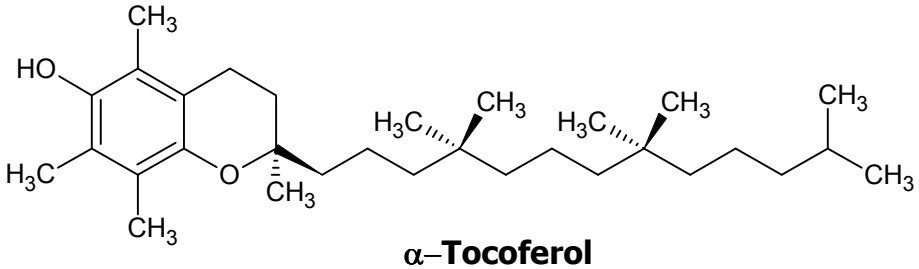
Figura 2. Estructuras químicas de algunos antioxidantes sintéticos usados en alimentos y cosméticos. BHT: Butil-hidroxitolueno; BHA: Butil-hidroxianisol; TBHQ: *terc*-Butilhidroquinona; PG: Galato de propilo.



BHT **BHA** **TBHQ** **PG**

1.5.1 Vitamina E. La vitamina E es el mayor antioxidante lipofílico, presente en muchas fuentes, especialmente en soya, nueces, harina de trigo y aceites. Han sido reportados sus numerosos beneficios en la salud, desde los ojos hasta el sistema cardiovascular, debido a su habilidad de reducir la peroxidación lipídica (Lupo, M., 2001). Cuando se aplica tópicamente, se observan numerosos beneficios cutáneos. El principal mecanismo de acción para justificar la importancia de la vitamina E es su potente caracter antioxidante, porque tiene la habilidad de "secuestrar" los radicales libres, especialmente, los radicales lipídicos tipo peróxido. Numerosos estudios muestran su habilidad de reducir los eritemas y edemas, quemaduras solares de células y peroxidación lipídica inducidas por la radiación UV. Mientras el tocoferol es la forma activa primaria de la vitamina E, los ésteres de la vitamina E también han penetrado la epidermis cuando se aplican tópicamente. Todos estos datos validan la popularidad de la vitamina E y de sus derivados como ingredientes antioxidantes y rejuvenecedores en cosméticos (Packer, L., 2002). En la Figura 3, se presenta la estructura química de α-tocoferol.

Figura 3. Estructura química del α-tocoferol (vitamina E).



α–Tocoferol

1.5.2 Butil-hidroxitolueno (BHT). Es el antioxidante monofenólico más ampliamente utilizado, sólido cristalino blanco, soluble en grasa, apropiado para procesos a alta temperatura, pero no es muy estable como el Butil-hidroxianisol (BHA). Sin embargo, ambos antioxidantes, de carácter sintético, actúan sinérgicamente para proveer una actividad antioxidante mayor que la que cada uno puede proporcionar por sí mismo. Por lo tanto, se puede encontrarlos a niveles superiores al 0.02% en alimentos. El BHT actúa efectivamente como un radical que

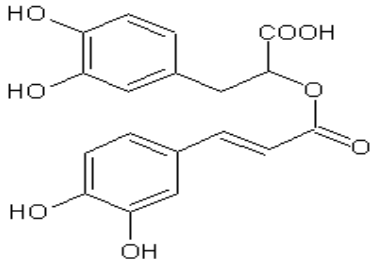
reestablece el BHA permitiéndole recuperar su estabilidad; así mismo, puede reaccionar con un radical peróxido y finalizar la reacción de oxidación en cadena (Kurechi, T., 1980).

1.5.3 Antioxidantes naturales. Numerosas plantas han sido identificadas como fuentes de componentes fenólicos con actividad antioxidante. La lista de antioxidantes naturales está creciendo como resultado de la investigación conducida para aislar e identificar estos componentes en las plantas. Derivados flavonoides han sido identificados como potentes antioxidantes, se encuentran en arroz, malta, cebada, hierbas, especias y extractos de especias, entre otras. Las especias, han sido consideradas, por cientos de años, como saborizantes. Su actividad antioxidante se basa primero en la presencia de compuestos fenólicos, especialmente, ácidos fenólicos y flavonoides pero, su fuerte sabor puede ser una limitante para la aplicación en muchos productos. Los investigadores han tratado de aislar e identificar aquellos componentes de estas hierbas y especias que pueden aportar los *flavors*. Hasta la fecha, en el comercio solamente están disponibles los extractos antioxidantes sin sabor, olor y color, del romero y la salvia. Los antioxidantes del romero (**Figura 4**) han sido utilizados en procesos alimenticios por décadas. Actualmente, el uso de estos extractos está aumentando significativamente con la creciente demanda, por parte del consumidor, por aditivos alimenticios de origen natural. Estos extractos, son más costosos que los antioxidantes sintéticos y requieren cantidades más grandes debido a su más baja eficiencia en comparación con las sustancias sintéticas. Los ácidos fenólicos y los diterpenos fenólicos, tales como el carnosol y el ácido carnósico (hidrofóbicos) y el ácido rosmarínico y rosmanol (hidrofílicos), son compuestos mayoritarios en el extracto de romero. Estos derivados fenólicos, son tan activos como la vitamina E. El ácido carnósico es incluso más potente que el BHT y el BHA; más del 90% de esta actividad se atribuye a los compuestos hidrofóbicos principalmente al ácido carnósico, pero este compuesto es bastante inestable y su degradación conduce a

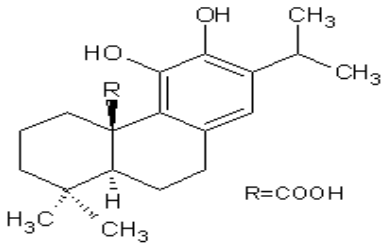
la formación del carnosol (éster metílico del ácido carnósico) y éste, a su vez, se degrada en rosmanol, epi-rorosmanol y 7-metilrosmanol (Rodríguez, O., 2008).

El jengibre pertenece a la familia *Zingiberaceae,* la cual se distribuye ampliamente en las regiones del suroeste de Asia y el archipiélago Malayo, e incluye más de 1200 especies distribuidas en 53 géneros. El género *Zingiber* incluye aproximadamente 85 especies. Las plantas de esta familia, en general, presentan grandes cantidades de ingredientes picantes y, en el caso específico del jengibre, los componentes responsables de su sabor picante son principalmente los gingeroles. Estos compuestos, en especial, el **6-gingerol**, es también el componente más activo en este tipo de extracto (Puengphian, C., 2008). El jengibre, es una especia ampliamente usada en la medicina tradicional, para aliviar molestias como la inflamación, dolencias reumáticas y gastrointestinales. Sus extractos y sus componentes picantes han demostrado alta actividad biológica, antiespasmódica y antioxidante (Remadevi, R., 2005).

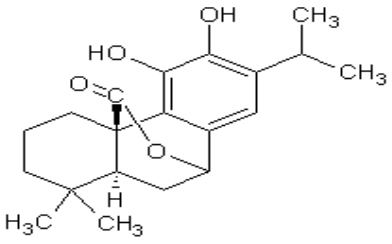
Figura 4. Estructuras químicas de los compuestos antioxidantes de los extractos de romero.



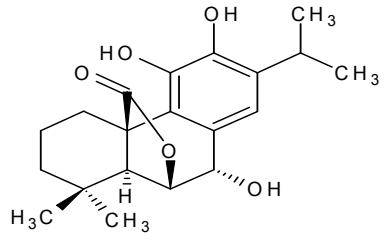
Ácido rosmarínico



Ácido carnósico



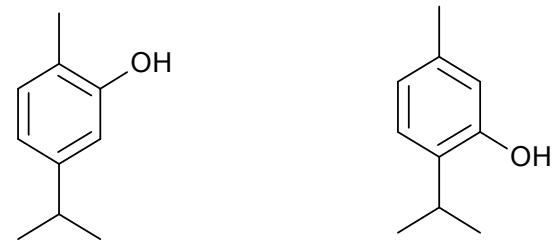
Carnosol



Rosmanol

El timol y el carvacrol son compuestos fenólicos naturales, con propiedades antifúngicas, antibacteriales y antioxidantes; Se encuentran en cantidades significativas en los AE de géneros *Thymus, Origanum, Satureja, Thymbra* y *Lippia* (Casteñeda, M., 2007).Debido a la relación de estos dos compuestos y a sus potenciales actividades antioxidantes, muchos estudios en el Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM, se han enfocado en *Lippia origanoides* H.B.K.*,* ya que esta planta se destaca por su alto contenido de compuestos fenólicos.

Figura 5. Estructuras químicas de los compuestos principales en el aceite esencial de *Lippia origanoides* H.B.K.



Carvacrol **Timol**

1.6 RADICALES LIBRES

Los radicales son especies químicas, moleculares o atómicas que poseen un electrón desapareado en sus orbitales más externos a causa de una ruptura homolítica. Este electrón desapareado le confiere su alta reactividad química. Los radicales libres (RL) reaccionan entre sí apareando sus electrones, dando origen a moléculas estables. Sin embargo, los RL no siempre acaban reaccionando con otras especies radicalarias, sino que pueden reaccionar con especies químicas estables, en varias formas, ya sea cediendo el electrón desapareado (radical reductor) o tomando a un electrón de la molécula estable (radical oxidante), o bien uniendóse a esta molécula estable; en cualquiera de los tres casos resulta otra especie radicalaria químicamente agresiva. El oxígeno es una molécula oxidante,

hasta el punto que en las células del metabolismo aerobio es el principal responsable de la producción de agentes oxidantes. Esta molécula es un radical, que posee dos electrones libres. Como tal no es una especie altamente reactiva, debido a su configuración electrónica. En el organismo humano y en condiciones normales la mayoría de los RL proceden de la respiración aerobia y constituyen las denominadas Especies Reactivas de Oxígeno, ERO (Salgar, W., 2001).

1.7 ESTRÉS OXIDATIVO

1.7.1. Definición. El concepto de "estrés oxidativo" es atribuido al científico alemán Helmunt Sies. Ocurre cuando la concentración de especies oxidantes es superior a la de especies antioxidantes, es decir, existe un cambio en la proporción de oxidantes y antioxidantes de más de uno. Básicamente, nuestro cuerpo usa el oxígeno para el mantenimiento de la vida. El oxígeno se utiliza en la oxidación de los carbohidratos, para generar energía para vivir, y en la formación de lípidos oxidados y los ácidos nucléicos, para producir las cuatro bases que constituyen el código de la vida. Por ejemplo, el oxígeno puede existiren un estado fundamental o, si se absorbe la energía, en dos estados diferentes excitados, *epsilon* y *delta*. Cuando se agrega un electrón al oxígeno, se produce el superóxido $O_2^{\cdot -}$. Cuando se hace aún más reducida, puede formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Puede existir en un estado altamente tóxico y energéticamente se denota como radical libre hidroxilo ($OH\cdot$), el cual se forma en presencia de iones de hierro reducido (Fe^{2+}) y peróxido de hidrógeno en una reacción de Fenton (Salgar, W., 2001).

1.7.2 Generalidades. La piel posee, evidentemente, mecanismos de defensa antioxidante (enzimáticos y no enzimáticos), para hacer frente a las agresiones ambientales. Pero ante un exceso de los contaminantes, el mecanismo endógeno resulta insuficiente y aparecen los problemas. Así pues, si la relación pro-oxidantes/antioxidantes es a favor de los primeros, ocurre el llamado estrés

oxidativo, que parece ser la causa extrínseca más importante del envejecimiento cutáneo. El grado de esta anomalía depende de la agresividad química del oxidante. Una consecuencia es la peroxidación lipídica que consiste en el ataque del oxígeno sobre los ácidos grasos, principalmente los poliinsaturados (PUFA), generando peróxidos e hidroperóxidos, compuestos que, a su vez, se descomponen en un gran número de productos.

1.8 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO)

El estrés oxidativo se manifiesta con la producción de ERO en las membranas biológicas expuestas a los contaminantes ambientales. Éstos son radicales libres, como el anión superóxido y el radical hidróxilo (OH▪), muy reactivos y, por tanto, muy tóxicos (Salgar, W., 2001).

Pero no solo los RL u otras especies reactivas provienen del metabolismo del oxígeno, sino que también resultan de procesos metabólicos de los fagocitos debido a que éstos, para cumplir su función destructiva, contienen enzimas líticas (proteasas, lipasas y nucleasas), que generan las ERO, para lesionar o destruir cuerpos extraños.

1.9 RADIACIONES UV

Es bien conocido el daño que provoca una excesiva exposición de la piel a las radiaciones UV, desde la quemadura solar y el fotoenvejecimiento, hasta las consecuencias más drásticas, como el cáncer y la inmunosupresión. El fotoenvejecimiento, provoca la formación de ERO (*e.g.,* radical hidróxilo), además facilita la movilización de iones metálicos. Precisamente los metales pesados o de transición catalizan reacciones secundarias de las ERO, formando aldehídos tóxicos. Estos aldehídos, son extremadamente dañinos para las proteínas presentes en la matriz extracelular, como el colágeno y la elastina. La luz solar está subdividida en: luz visible 400 nm (violeta) a 700 nm (roja); infrarojo lejano

(>700 nm) y radiación UV (<400nm), la cual se divide en radiación UV-A (320-400 nm), UV-B (290-320 nm) y UV-C (190-290 nm). Las radiaciones UV-A y UV-B constituyen menos del 1% de la luz solar que alcanza la superficie terrestre, pero son las responsables de daños severos en la piel. Los efectos de radiación solar son variados y, entre ellos, podemos destacar los siguientes:

- UV-A: Pigmentación directa, reacciones cutáneas (fotoalergia, fototoxicidad), envejecimiento (formación de radicales) y fotocarcinogénesis.
- UV-B: Antirraquítica (estimula la síntesis de vitamina D), pigmentación directa enzimática (síntesis de melanina), enrojecimiento de la piel y quemaduras, inductora de cáncer epitelial.
- UV-C: Quemaduras; normalmente se filtra por la capa de ozono.

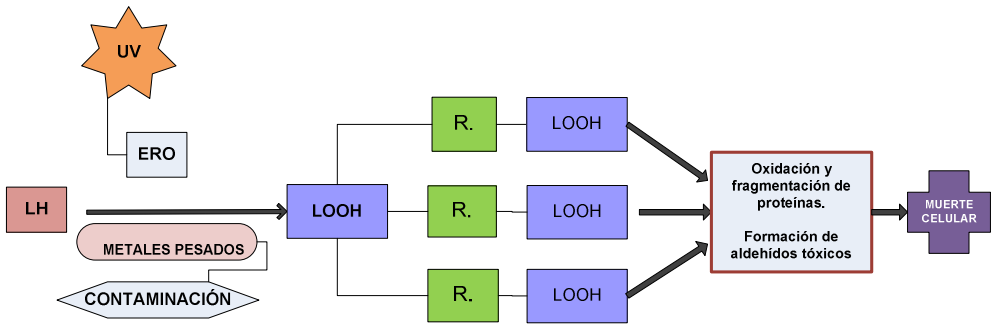
La radiación UV-B actúa sobre moléculas biológicas causando envejecimiento prematuro y cáncer de piel; en contraste, la radiación UV-A actúa indirectamente por medio de las ERO causando una quemadura solar inmediata; también es una de las principales causantes del estrés oxidativo y provoca daños en el ADN, alteraciones sobre las membranas lipídicas, daños cutáneos y así mismo inactiva enzimas, microorganismos y células mamarias. Por tal razón, los antioxidantes por medio de diferentes mecanismos, ayudan a la defensa celular contra el daño causado por este tipo de radiación (Yasuhara, A., y Shibamoto. T., (1991)).

1.10 PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Las ERO y los elementos característicos de la contaminación (monóxido de nitrógeno, metales pesados y ozono) actúan sobre los fosfolípidos insaturados de las membranas biológicas (LH) y provocan la formación de radicales libres (R▪), que, por propagación, favorecen la peroxidación de los lípidos (**Figura 6**). La toxicidad de los hidroperóxidos (LOOH) formados es debida a su mayor hidrofilia y, por tanto, a su capacidad de migrar hacia el interior de las células y dañar el ADN,

o también de migrar hacia otra zona cercana, la matriz extracelular, provocando la oxidación del colágeno y la elastina.

Figura 6. Esquema de acción de los rayos UV y la contaminación en la oxidación celular mediante la peroxidación lipídica.

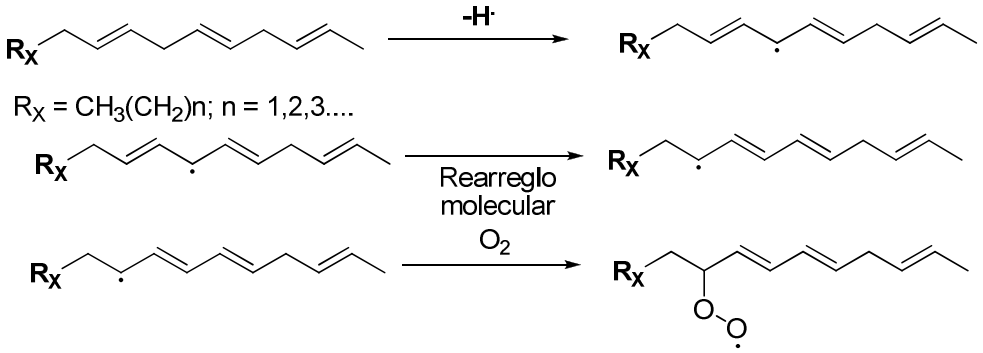


Fuente: Martini, M. (1997).

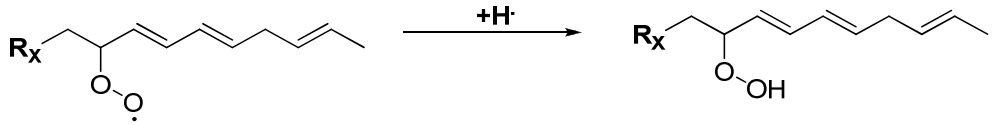
La reacción en cadena ocurre en varias etapas. Primero, se da la **iniciación**, cuando se produce el ataque de una especie radicalaria X▪, que es suficientemente reactiva para abstraer un radical hidrógeno $H^{\bullet}$ de un grupo metileno (-CH_2-), formándose así radicales de los correspondientes ácidos grasos. En la segunda etapa, conocida como **propagación**, los radicales peróxido, anteriormente formados, pueden abstraer H▪ de otras moléculas de lípidos vecinos, para formar LOOH y un nuevo radical graso (R▪), que, a su turno, también reaccionará con O_2 y dará origen a un nuevo radical peróxido, para continuar así la reacción en cadena. Por último, está la etapa de **finalización,** donde los LOOH en presencia de iones o complejos de transición como Fe^{2+} y Cu^{2+} originan los radicales alcoxi (RO▪), que también pueden abstraer H▪ de otras moléculas para formar derivados hidroxilados o cetonas o sufrir una escisión beta (β-esc) y formar así un aldehído y un radical alquílico, que pueden dar origen a un hidrocarburo por abstracción de un H▪ de otra molécula. De esta manera, y de acuerdo con este proceso, se puede obtener hexanal como un producto mayoritario final de degradación del ácido linoleíco, como se aprecia en la **Figura 7**.

Figura 7. Esquema general de la peroxidación lipídica, en sus etapas de iniciación, propagación y finalización, en el cual, 1, 2, 3 y 4 dan lugar a derivados de tipo alquílico y carbonílico.

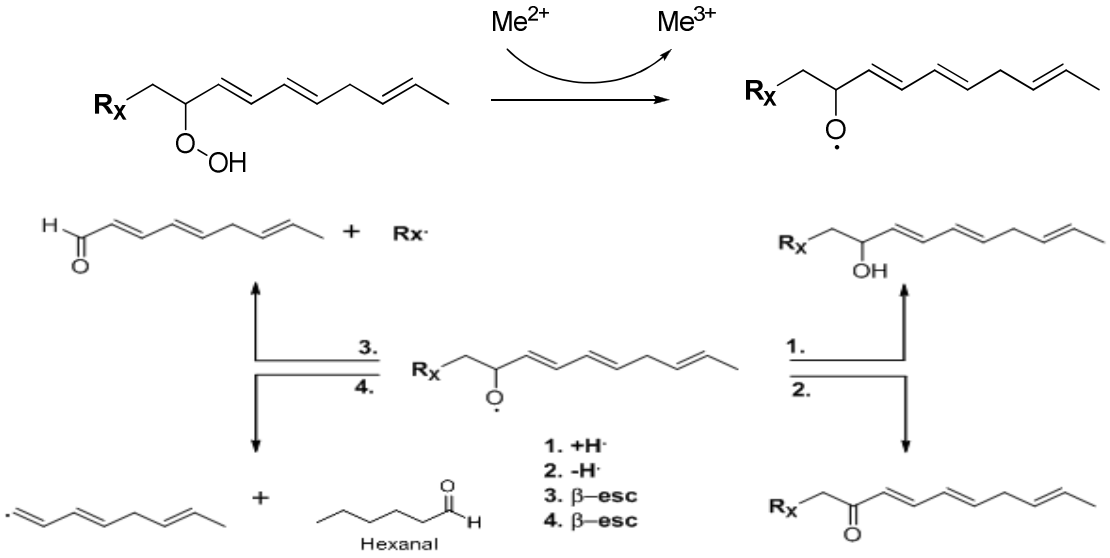
Iniciación:



Propagación:



Finalización:



Fuente: AKOH, C., MIN, D., *Food Lipids Chemistry,Nutrition, and Biotechnology*, Chapter 15: Antioxidants. Second Edition. Marcel Deeker Inc., 2002.

1.11 Aceites esenciales de *Lippia origanoides* H.B.K., *Rosmarinus officinalis* L. y *Zingiber officinale*.

1.11.1 *Rosmarinus officinalis* L.El romero pertenece a la familia *Lamiaceae*, es un arbusto leñoso que llega a alcanzar un metro o más de altura, siempre verde, despide un perfume aromático alcanforado. Presenta hojas sentadas y lineales, flores en cimas racimosas auxiliares de color azulado. La especie es originaria de las tierras del mediterráneo, donde se cultiva desde tiempos remotos, fundamentalmente en Grecia, Italia, España y Portugal. Adicionalmente, de ser usado como saborizante en alimentos, el AE y el extracto son poderosos antibacteriales, con propiedades antimutagénicas y se emplean como poderosos agentes antioxidantes (Castañeda, M., 2007; Chaparro, F., 2004; Offord, E., 2004).

Figura 8. *Rosmarinus officinalis* L.

Fuente: MENDEZ, L., http://www.moonmentum.com/blog/tag/romero/ Marzo 13 de 2009.

1.11.2 *Lippia origanoides*H.B.K. El orégano de monte es una hierba perenne de 1 a 2 m de altura que presenta hojas con ápice redondeado, flores blancas, pequeñas y muy aromáticas. Se encuentra en la región del cañon del río de Chicamocha, en Santander. Posee en su composición compuestos fenólicos como carvacrol y timol, los cuales se consideran los responsables de los resultados positivos de actividad antioxidante realizadas en 2007 por Castañeda, quien reporta la actividad biológica de éste AE frente a organismos patógenos de enfermedades gastrointestinales y respiratorias.

Figura 9. *Lippia origanoides* H.B.K.

Fuente: CARREÑO, L., cultivo Complejo Agroindustrial piloto CENIVAM. Febrero 24 de 2010.

***1.11.3 Zingiber officinale* Roscoe.** El jengibre, es una planta perene, de un metro de altura. El rizoma, es aromático, de lóbulos tubulares gruesos, ramificados y escamosos, con olor picante parecido al limón. El jengibre ha sido cultivado y procesado en China y ha sido usado en la medicina natural por más de 3000 años. Se ha propagado desde China hasta India y, en regiones tropicales y sub-tropicales en el mundo, en el sureste de Asia, Japón, Taiwán, Indonesia y Suramérica, entre otras. Se usa para afecciones respiratorias y gastrointestinales, entre otras, según

Remadevi y colaboradores (2005). El aceite esencial y el extracto de su oleorresina son productos muy valiosos responsables del sabor y picante característico del jengibre. Ambos se usan en alimentos, bebidas y sustancias medicinales. Existen numerosos estudios sobre la composición y las actividades antifúngica, antibacterial y antioxidante del aceite esencial y el extracto (Singh, G., 2008; Vásquez, O., 2001).

Figura 10. Rizomas y planta completa de *Zingiber officinale* Roscoe.

Fuente: CARREÑO, L., cultivo Complejo Agroindustrial piloto CENIVAM. Febrero 24 de 2010.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS DE LABORATORIO

2.1.1 Reactivos. Para la realización de este estudio se emplearon los siguientes reactivos y solventes:

Tabla 1. Lista de reactivos y solventes empleados en el presente estudio.

REACTIVOS	Pureza, Grado	Casa productora
Pentaflúorfenilhidracina	97%	Aldrich Chemical Co., Milwaukee WI 53233, EE.UU.
Butil-hidroxitolueno (BHT)	99%	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO 63178, EE.UU.
Ácido linoléico	97%	Aldrich Chemical Co., Milwaukee WI 53233, EE.UU.
α-Tocoferol	97%	Sigma Chemical Co., Milwaukee T 3634, EE.UU.
Hexanal	98%	Aldrich Chemical Co., Milwaukee WI 53233, EE.UU.
Sulfato de sodio anhidro	Analítico	J.T. Backer (Phillipsburg, NJ, EE.UU.)
SOLVENTES		
Hexano	HPLC	Mallinckrodt, Phillipsburg, NJ 08865, EE.UU.
Metanol	HPLC	Mallinckrodt, Phillipsburg, NJ 08865, EE.UU.
Agua	HPLC	Mallinckrodt, Phillipsburg, NJ 08865, EE.UU.
Éter de petróleo	Analítico	Aldrich Chemical Co., Milwaukee 77379, EE.UU.
Diclorometano	HPLC	Sigma Chemical Co., Milwaukee, EE.UU.

2.1.2 Materiales

- Balones aforados de 2, 5, 10 y 25 mL.
- Pipetas de 1, 5 y 10 mL (Schott, Hofheim, Alemania).
- Micropipeteadores de 2-20 y 25-250 µL (BRAND GMBH Co, Wertheim, Alemania).
- Puntas plásticas para las micropipetas (BRAND GMBH Co, Wertheim, Alemania).
- Pipetas Pasteur en vidrio (BRAND GMBH Co, Wertheim, Alemania).
- Tubos de ensayo 16 x 150 mm.
- Tubos cónicos de poli(propileno) de 1.5 mL (BRAND GMBH Co, Wertheim, Alemania).
- Frascos ámbar de 2 y 5 mL.
- Barras magnéticas (2 x 10 mm, 1 x 5 mm).
- Vaso refrigerante (10 cm x 80 mm y 10 cm x 70 mm, ancho 1,8 mm).
- Consumibles cromatográficos (septas, gases, jeringa Hamilton de 10 µL, viales de 1,5 mL, entre otros).
- Fibra para SPME de PDMS/DVB, 65 µm 57310-U. Sigma Chemical Co., Supelco Inc., Bellefonte, Pennsylvania, EE.UU.
- *Holder* manual para SPME. Sigma Chemical Co., Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, EE.UU.

2.1.3. Equipos menores

- *Minishaker* (IKA, JKMS, Hofheim, Alemania).
- Balanzas de precisión (Mettler Toledo AG258 ± 0,00001 g., Zurich, Suiza).
- Balanza de precisión BA31OS Sartorius Basis ± 0,005 g, Göttingen, Alemania).
- Plancha de calentamiento con agitación magnética (SCHOTT MR 1065, Schott-Geräte Gmbh, D-65719 Hofheim, Alemania).
- Baño circulatorio de refrigeración (Fisher Scientific, Model 901, Pittsburg, EE.UU.)

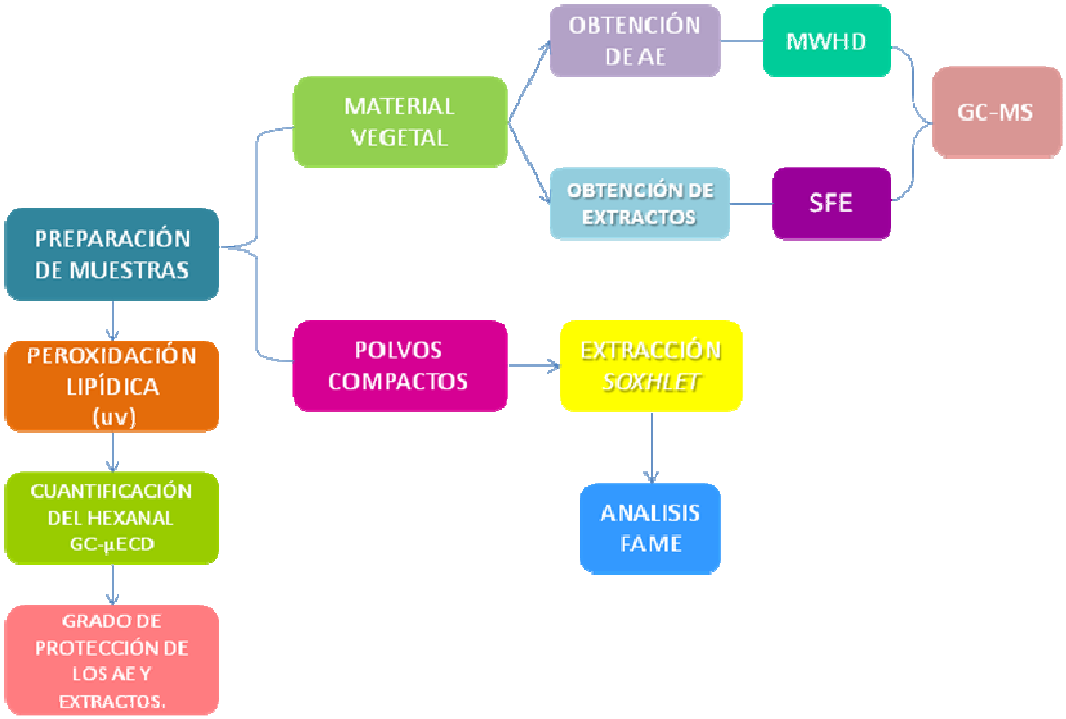
2.1.4. Material vegetal. El jengibre y el orégano de monte (Quimiotipo carvacrol) se recolectaron en la zona de cultivos experimentales del CENIVAM, ubicado en el campus de la Universidad Industrial de Santander. El romero fue obtenido de cultivos ubicados en la vereda La Trinidad, Duitama, Boyacá.

2.1.5. Polvos compactos. Los polvos compactos "*In-line*" fueron suministrados en presentaciones de 16 g, por Laboratorios M&N y Cía. Ltda. (Bogotá, Colombia).

2.2 METODOLOGÍA GENERAL

En la **Figura 11** se resumen las etapas desarrolladas en el presente trabajo de investigación, con el fin de determinar la actividad antioxidante de los aceites esenciales, extractos, mezclas de aceites y mezcla de extractos de romero, jengibre y orégano de monte (Quimiotipo carvacrol).

Figura 11. Metodología seguida en el presente trabajo de investigación.



2.3. PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN

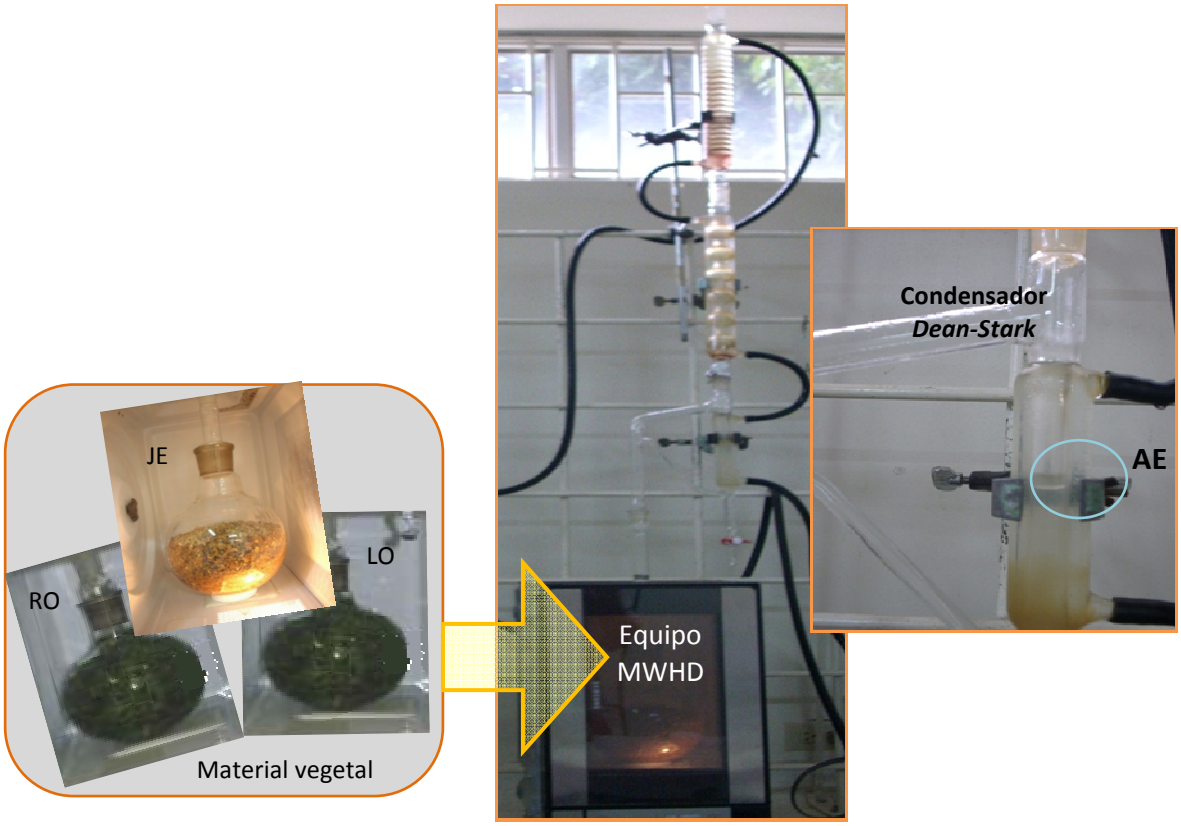
2.3.1. Obtención de aceites esenciales. Los aceites se obtuvieron por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD). El material vegetal previamente pesado, se somete al proceso de extracción en un equipo tipo *clevenger* con reservorio de destilación *Dean-Stark* adaptado a un sistema de calentamiento, en un horno de microondas doméstico Samsung, modelo AMW81135T (Seul, Corea), con potencia de salida 1100 W, capacidad de 1.1 pies cúbicos.

En la **Tabla 2** se especifican las condiciones de extracción del aceite de cada planta y en la **Figura 12** se puede observar el montaje para MWHD. Los AE obtenidos se secaron con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) para eliminar humedad, se pesaron para calcular con base en el peso inicial de material vegetal su rendimiento. Posteriormente se almacenaron en tubos de ensayos protegidos de la luz y en una nevera a 4ºC, donde se conservaron para los futuros ensayos.

Tabla 2. Condiciones de extracción por MWHD de los aceites esenciales del material vegetal bajo estudio.

Planta	Estado	Parte de la planta	Tiempo de extracción	Vol. Agua, mL
Rosmarinus officinalis L.	Seco	Hojas y tallos	4 x 15 min	300
Lippia origanoides H.B.K.	Fresco	Hojas y tallos	4 x 15 min	250
Zingiber officinale	Seco	Rizoma	4 x 15 min	400

Figura 12. Equipo de hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD) empleado en el presente trabajo.



Fuente: CARREÑO, L., ACOSTA. A., Laboratorio de preparación de muestras Antoine Lavoisier, Complejo Agroindustrial piloto, CENIVAM. Septiembre 13 de 2010.

2.3.2. Obtención de extractos. Se usó la técnica de extracción con fluido supercritico (SFE), empleando CO_2. Se utilizó un equipo *Thar SFE-2000-2-FMC50* (*Thar Instruments, Inc,* Pittsburgh, PA, EE.UU.) (**Figura 13**), equipado con un portamuestra en acero inoxidable con capacidad de 2 x 10^{-3} m^3; un sistema de separación y colección de los extractos tipo ciclón, con capacidad para 5 x 10^{-4} m^3; regulador automático de presión; bombas de alta presión *P-200A* (*Thar Instruments, Inc,* Pittsburgh, PA, EE.UU.), para el CO_2 y P-50 (*Thar Instruments,*

Inc, Pittsburgh, PA, EE.UU.), para el modificador; y un medidor de flujo *Sitrans FC Massflo tipo MASS 6000* (Siemens AG, Berlín, Alemania).

Figura 13. Extractor con CO_2 supercrítico *SFE-2000-2-FMC50* (*Thar Instruments, Inc,* Pittsburgh, PA, EE.UU.), empleado en el presente trabajo.

Fuente: CARREÑO, L., ACOSTA. A., Complejo agroindustrial piloto, CENIVAM. Febrero 25 de 2010.

El material vegetal se picó, se pesó y se secó a 50ºC en un horno durante 4 horas, con el fin de reducir la humedad (<10%). Se realizaron tres extracciones a diferentes condiciones de presión, para el romero y orégano de monte, con el fin de escoger el valor de presión que permite obtener el mejor rendimiento y el efecto protector antioxidante más alto. Para el jengibre sólo se realizó (1) extracción, puesto que no se contaba con suficiente material vegetal, ya que rizomas, al picar y secar, pierden más del 50% de peso **(Figura 14).** En la **Tabla 3** se registran los parámetros y condiciones usadas para la correspondiente extracción SFE de cada planta.

Tabla 3. Condiciones de extracción con fluido supercrítico (tiempo, 1h) del material vegetal bajo estudio.

Planta	Flujo, g/min	Temp., ºC	Presión, bar		
			1	2	3
Rosmarinus officinalis L.	40	50	200	300	400
Lippia origanoides H.B.K.	40	50	300	400	500
Zingiber officinale	40	60	600	-	-

Figura 14. Fotografías de cada planta después de picar y secar para su posterior extracción con fluido supercrítico SFE.

Fuente: CARREÑO, L., ACOSTA. A., Complejo agroindustrial piloto, CENIVAM. Fecrero 12 de 2010.

2.4. EXTRACCIÓN SOXHLET DE POLVOS COMPACTOS Y ANÁLISIS POR GC/MS DEL EXTRACTO OBTENIDO

2.4.1. Extracción Soxhlet. Se pesaron 20.5 g de los polvos compactos, esta cantidad se colocó dentro de un dedo de papel celulosa (Figura 15) en el cuerpo del extractor Soxhlet. Se empleó como solvente éter de petróleo, durante 24 h, usando un baño de aceite mineral para homogeneizar el calentamiento y un baño refrigerante con mezcla de agua-propilenglicol. El extracto obtenido, de carácter viscoso, se rotoevaporó a presión baja, hasta eliminar la mayor cantidad de solvente. Se inyectó 1 μL del extracto obtenido al GC/MS.

Figura 15. Equipo de extracción *Soxhlet.* 1. Refrigerante; 2. Cuerpo del extractor Soxhlet; 3. Dedo de papel con una alícuota de polvo "*in-line*"; 4. Balón de fondo redondo.

Fuente: ACOSTA. A., Laboratorio de preparación de muestras Antoine Lavoisier, Complejo Agroindustrial piloto, CENIVAM. Octubre 18 de 2011.

2.4.2. Determinación de ésteres metílicos de ácidos grasos. Se determinó el contenido de ácidos grasos en el extracto evaporado de los polvos compactos. Se tomaron 100 mg del extracto, se adicionaron 5 mL de trifluoruro de boro al 12% en metanol. La mezcla se sumergió en un baño de aceite a 85 ºC con agitación continua durante 1 hora. Posteriormente, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionó 1 mL de hexano para extraer los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). La mezcla se agitó vigorosamente y se tomaron 0.5 mL de la fase orgánica superior la cual se diluyó con 1 mL de hexano. De la solución final, se inyectó 1 μL en el GC/FID.

2.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

Las soluciones para análisis cromatográfico se prepararon disolviendo 50 µL de AE en diclorometano, agregado en cantidad suficiente para completar un volumen final de 1 mL. Una vez preparadas las muestras de los aceites, se procedió a su análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), en un equipo *Agilent Technologies* 6890 *Plus* (Palo Alto, CA, EE.UU.) acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies* MSD 5975 Network, equipado con puerto de inyección *split/splitless* (250ºC, relación *split* 1:30), e inyector automático *Agilent* 7863. Para este análisis se usó una columna capilar de sílice fundida DB-5MS (*J & W,* Folsom, CA, EE.UU.), de 60 m x 0.25 mm, D.I x 0.25 µm, d_f, con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano). Como gas de arrastre (fase móvil) se utilizó helio (He, 99.9995%, AGA-Fano, S.A.), con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16.47 psi, velocidad lineal de 26 cm^{-1}, y flujo constante de 1 $mLmin^{-1}$. La temperatura del horno se programó desde 45 ºC (5 min), luego, se aumentó @ 4 $ºCmin^{-1}$ hasta 150 ºC (2 min), después @ 5 $ºCmin^{-1}$, hasta 250 ºC (5 min) y, finalmente, @ 10 $ºCmin^{-1}$ hasta 275 ºC (15 min).

2.5.1. Identificación y caracterización de los componentes de los aceites esenciales. La identificación se realizó por comparación de índices de retención y patrones de fragmentación de los espectros de masas obtenidos, con los encontrados en la literatura especializada (Adams, R., 2004), en bases de datos *QuadLib2004* (Adams), *NIST* 2005 y *Wiley* 2002. Los índices de retención se calcularon teniendo en cuenta los tiempos de retención de una serie homóloga de patrones de hidrocarburos (*AccuStandard,* New Haven, EE.UU.) desde C_{10} hasta C_{25}, que se analizaron por GC bajo las mismas condiciones operacionales que los aceites esenciales. Para esto, se utilizó la **ecuación (1)**:

$$I_R = 100n + 100\left(\frac{t_{RX} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}}\right) \quad (1)$$

Donde:

I_R: Índice de retención lineal;

n: Número de átomos de carbono del hidrocarburo lineal que eluye antes del compuesto de interés;

N: Número de átomos de carbono del hidrocarburo lineal que eluye inmediatamente después del compuesto de interés;

t_R X: Tiempo de retención del compuesto de interés;

t_R N, t_R n: Tiempos de retención de los hidrocarburos lineales que eluyen ántes y después del compuesto de interés, respectivamente.

2.6. Implementación y validación del método cromatográfico para la determinación del hexanal, como derivado PFPH, usando microextracción en fase sólida con derivatización simultánea sobre la fibra PDMS/DVB.

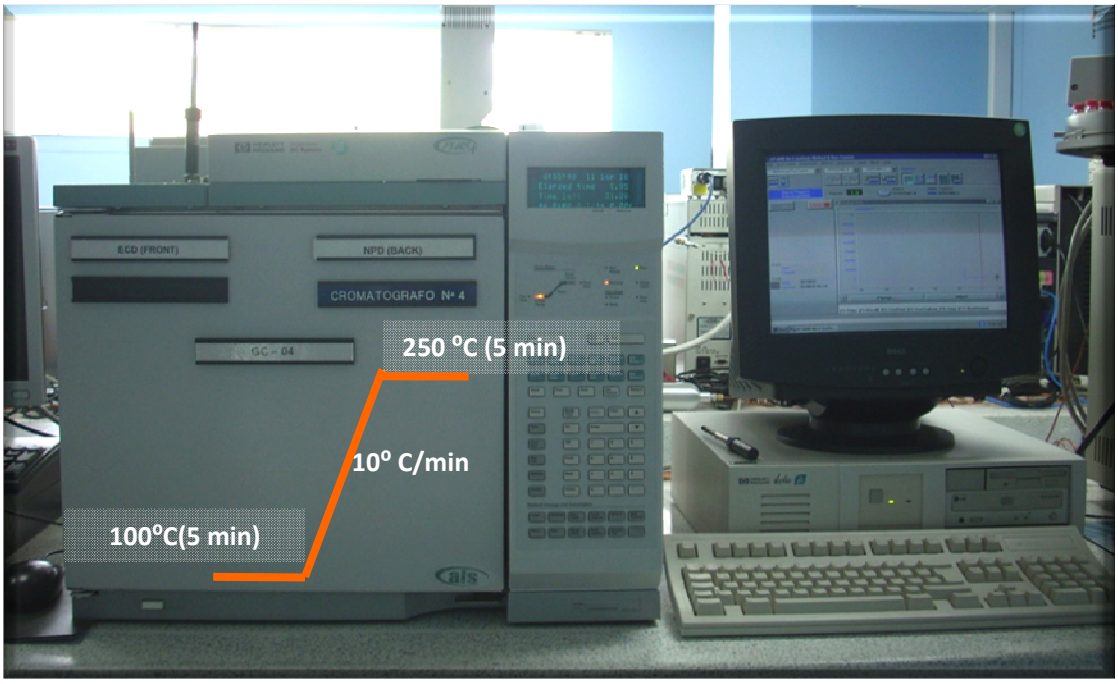
2.6.1. Determinación de la concentración de la pentaflúorfenilhidracina (PFPH). Para determinar la concentración, a emplear de PFPH, y el solvente, con que se prepararía esta solución, se utilizaron metanol, hexano y agua. Se obtuvo,

como mejor resultado, la solución de PFPH preparada con agua, como se observa en la **Sección 3(Figura 24).**

2.6.2. Valoración del tipo de fibra y tiempos de equilibrio. Se trabajó con una fibra de PDMS/DVB,a un tiempo de saturación de la fibra de 10 min en el espacio de cabeza de una solución acuosa (500 ppm) de PFPH (agente derivatizante), a temperatura ambiente, y a un tiempo de exposición de la fibra para la derivatización del hexanal a su respectiva hidrazona de 40 min. Se tuvieron en cuenta resultados obtenidos en diversos trabajos de investigación realizados por *Stashenko* y colaboradores (2000; 2002) sobre peroxidación lipídica empleando la técnica de microextracción en fase sólida en condiciones similares de derivatización.

2.6.3. Análisis por GC-μECD del derivado PFPH-hexanal. El análisis de los derivados PFPH se realizó en un cromatografo de gases *Hewlett-Packard* (Palo Alto, CA, EE.UU.), HP 6890 *Plus* (Figura 16), con control electrónico de presión, dotado con microdetector de captura de electrones (μ-ECD, 63Ni, 280ºC), puerto de inyección *split/splitless* (250ºC, relación *split* 1:10) y sistema de datos HP *ChemStation* HP, Rev. A.06.03. Se empleó una columna de HP-5, 30 m x 0.25 mm, D.I x 0.33 μm, d_f, 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano). La programación de temperatura del horno fue de 100ºC, por 5 min, hasta 250ºC, por 5 min @ 10ºCmin^{-1}. Se utilizó helio (99.995%), como gas de arrastre con una velocidad de 1 mL/min, y mezcla de argón-metano (9:1), como gas auxiliar.

Figura 16. Cromatografo de gases *Hewlett-Packard* (Palo Alto, CA, EE.UU.), HP 6890 Plus, dotado con microdetector de captura de electrones (GC-μECD) usado en el presente estudio.



Fuente: CARREÑO, L., ACOSTA. A., Centro de Cromatografía y Espectrometría de Masas Mikhail Tsweet, Complejo Agroindustrial piloto, CENIVAM. Septiembre 2 de 2010.

2.6.4. Determinación de la repetibilidad de los t_R y las áreas cromatográficas. El hexanal es muy volátil, reactivo y muy soluble en agua. Para lograr una alta selectividad, una buena reproducibilidad y una mejor sensibilidad en su determinación, el análisis del hexanal se realizó acompañado de su derivación, empleando como agente derivatizante la PFPH, se obtuvo la pentaflúorfenilhidrazona del hexanal, que genera una alta respuesta en el detector de captura de electrones (μ-ECD) durante su análisis por cromatografía de gases (GC). Con la derivación, se mejoran notoriamente los niveles de sensibilidad requeridos para la determinación del hexanal, ya que este aldehído, como otros compuestos carbonílicos volátiles (CCV), por lo general, se encuentra presente al nivel de trazas en los productos oxidativos.

2.6.4.1 Hexanal. Se preparó una solución "*stock*" del hexanal en metanol, de 1000 ppm. La fibra de PDMS/DVB de 65 µm, se expuso a una solución acuosa de PFPH (2 mL, 500 ppm, 1000 rpm, 10 min); después de su saturación con PFPH, la fibra se expuso al *headspace* de la solución del patrón del hexanal (2 mL, 1000 rpm, 40 min) diluido a diferentes concentraciones (0.05, 1, 5, 10, 15, 40, 50, 80, 100, 300, 500, 750 y 800 ppm). Los derivados formados sobre la fibra, se desorbieron individualmente, durante 5 minutos a 250ºC, en el puerto de inyección del cromatografo de gases.

2.6.5. Calibración externa del derivado del hexanal-PFPH. Se siguió el procedimiento descrito en el **Numeral 2.6.4.1.** Se utilizaron dos niveles de concentración del hexanal: nivel bajo (0.05, 1, 5, 10, 15 y 40 ppm) y nivel alto (50, 80, 100, 300, 500, 750 y 800 ppm), empleando como reactivo límite la PFPH en una relación molar 2:1 (PFPH: hexanal). Los patrones del hexanal de nivel bajo y nivel alto se derivatizaron con una solución de PFPH de 500 y 4000 ppm, respectivamente.

Con los valores de concentración, tiempos de retención (t_R) y las correspondientes áreas cromatográficas de cada derivado, se procedió a calcular la reproducibilidad y repetitividad de las áreas cromatográficas y la concentración del patrón del hexanal. Para esto, se escogió el patrón de 80 ppm, para realizar un quintuplicado de esta concentración, con el fin de determinar el valor promedio (), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (%CV) de las áreas cromatográficas del pico de interés, usando las ecuaciones 2, 3 y 4.

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^{n} Xi}{n} \qquad (2)$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum(X - \bar{X})^2}{(n-1)}} \qquad (3)$$

$$\%CV = \frac{S}{\bar{X}} * 100 \qquad (4)$$

Donde:

$\bar{X}$**:** Valor promedio de la variable X (área);

X_i**:** Valor "iésimo" obtenido para la variable X en una medición.

2.7. VALIDACIÓN DEL SISTEMA LIPÍDICO MODELO

2.7.1. Peroxidación lipídica en el aceite de girasol sometido a radiación UV. La degradación oxidativa del aceite de girasol (AG), acelerada por la acción de la radiación UV, se evaluó adicionando 400 mg del aceite vegetal en tubos cónicos de poli(propipleno), sellados herméticamente con un *septum*, papel parafina y teflón, como se observa en la Figura 17, con el fin de no permitir la fuga de volátiles generados tras la radiación. Estas muestras se ubicaron en el portamuestras del reactor y se irradiaron durante 12 h teniendo en cuenta que la temperatura no superara los 55ºC, con el fin de garantizar la presencia de los compuestos antioxidantes (AO) a evaluar. Después de ser irradiados, los tubos cónicos que contenían las muestras con el AG, se retiraron del reactor y se sometieron a enfriamiento a 4ºC en una nevera industrial INDUFRIAL.

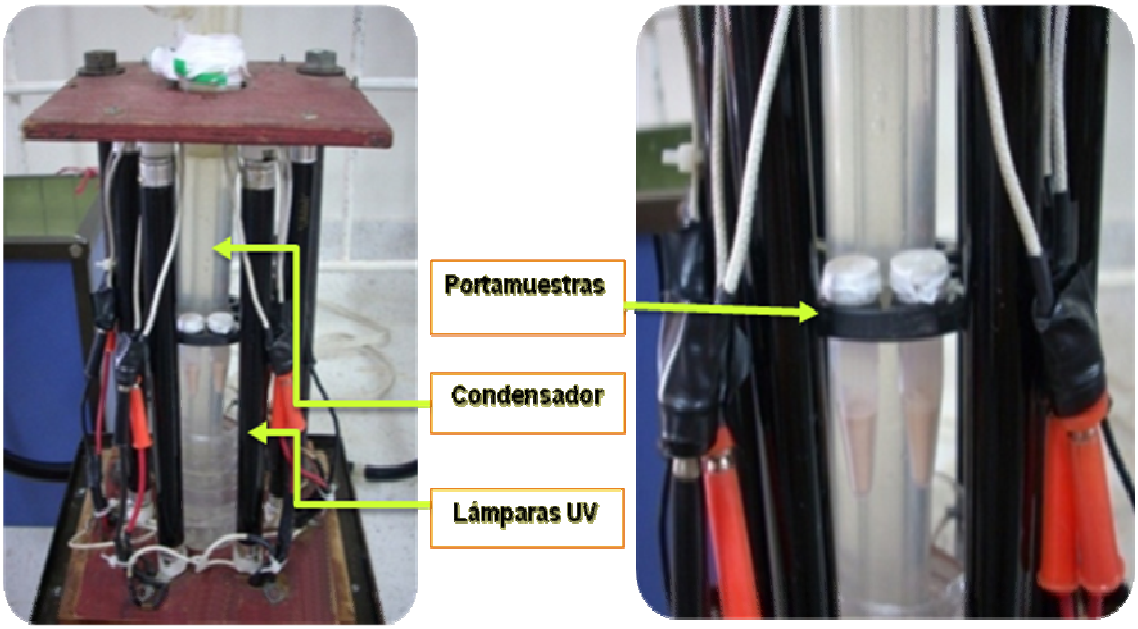
Se realizó por duplicado el mismo procedimiento para cada una de las muestras:

1. **Pre-equilibrio de la PFPH:** En un frasco ámbar de 4.5 mL, con sello de teflón/silicona, se colocaron 2 mL de la solución de PFPH (500 ppm), a temperatura ambiente y agitación magnética (1000 rpm), durante 5 min.

2. **Saturación de la fibra:** Inmediatamente después, la fibra de PDMS/DVB, se expuso a los vapores de la solución de PFPH durante 10 min en el espacio de cabeza del vial.

3. **Pre-equilibrio de la muestra:** Durante el paso anterior, la muestra previamente refrigerada, se colocó en un baño de agua a 40ºC durante 10 min con agitación magnética.
4. **Derivatización del hexanal en la muestra:** Después de alcanzar el pre-equilibrio de la muestra, la fibra se expuso al espacio de cabeza durante 40 min.
5. **Desorción:** La desorción de los derivados hidrazónicos se realizó en el puerto de inyección del GC- μECD, a 260ºC, durante 5 min.

Figura 17. Reactor dotado con lámparas UV, empleado en el estudio de la peroxidación lipídica.



Fuente: CARREÑO, L., ACOSTA. A., Laboratorio de preparación de muestras Antoine Lavoisier, Complejo agroindustrial piloto, CENIVAM. Septiembre 11 de 2010.

2.7.2. Evaluación de la actividad antioxidante in-vitro de los AE, extractos, mezclas de AE y mezclas de extractos de orégano de monte (Quimiotipo carvacrol), romero y jengibre en el sistema lipídico modelo sometido a radiación UV.

En la **Tabla 4** se listan las muestras evaluadas en el presente estudio; éstas se prepararon pesando 2 mg de muestra en tubos cónicos y agregando 400 mg de AG, para alcanzar una concentración de 0.5% p/p. En el caso de las mezclas, éstas se prepararon en proporción 1:1, y a cada una de ellas se les realizó el mismo procedimiento descrito en la **Sección 2.7.1.** El grado de protección (%GP) de las muestras en el sistema lipídico, contra su degradación oxidativa, se calculó empleando la **ecuación 5**, con base en la determinación y cuantificación del hexanal, por ser ésta, una de las sustancias que se produce en mayor proporción durante la peroxidación lipídica del ácido linoléico.

$$\%GP = \left[\left(\frac{Ao - Ax}{Ao}\right) * 100\right] \quad \textbf{(5)}$$

Donde:

Ao: Es el área del pico cromatográfico del hexanal medida en el sistema lipídico sometido a radiación UV, SIN ANTIOXIDANTE.

Ax: Es el área del pico cromatográfico del hexanal medida en el sistema lipídico sometido a radiación UV, CON ANTIOXIDANTE.

Tabla 4. Muestras evaluadas sometidas a radiación UV en el presente estudio.

No.	CONVENCIONES DE LAS MUESTRAS	
1	**BLAG**	Blanco del aceite de girasol irradiado
2	**LO**	AE de *L. origanoides.*
3	**RO**	AE de *R. officinalis.*
4	**JE**	AE de jengibre (*Z. officinale).*
5	**ELO1**	Extracto No. 1 de *L. origanoides.*
6	**ELO2**	Extracto No. 2 de *L. origanoides.*
7	**ELO3**	Extracto No. 3 de *L. origanoides.*
8	**EJE**	Extracto de jengibre (*Z. officinale*).
9	**ERO1**	Extracto No. 1 de *R. officinalis*.
10	**ERO2**	Extracto No. 2 de *R. officinalis*.
11	**ERO3**	Extracto No. 3 de *R. officinalis.*
12	**EROJE**	Mezcla de extracto de *R. officinalis* con *Z.officinale.*
13	**ELORO**	Mezcla de extracto de *L. origanoides* con *R. officinalis.*
14	**ELOJE**	Mezcla de extracto de *L. origanoides* con *Z. officinale.*
15	**AROJE**	Mezcla de AE de *R. officinalis* con *Z. officinale.*
16	**ALORO**	Mezcla de AE de *L. origanoides* con *R. officinalis.*
17	**ALOJE**	Mezcla de AE de *L. origanoides* con *Z. officinale.*
18	**BHT**	Antioxidante de referencia butil-hidroxitolueno.
19	**Vit. E**	Antioxidante de referencia vitamina E.

2.8. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *in-vitro* EN POLVOS COMPACTOS DE LOS AE, EXTRACTOS, MEZCLAS DE AE Y MEZCLAS DE EXTRACTOS DE ORÉGANO DE MONTE (Quimiotipo carvacrol), ROMERO Y JENGIBRE SOMETIDOS A RADIACIÓN UV.

Las muestras se emplearon en la misma concentración indicada en la **Sección 2.7.2**, ya que Akoh y Min en el 2002, reportaron que esa es la concentración máxima permitida de AO en los polvos compactos. En tubos cónicos se pesaron 400 mg de polvos compactos "*In-line*"; así mismo, en otro tubo cónico, se pesaron 2 mg de muestra y, en el caso de las mezclas, se conservó el nivel de concentración en proporción 1:1. A estas muestras de AE, extractos, mezclas de AE y mezclas de extractos se agregó 1 mL de éter de petróleo, se agitó en un *minishaker* (2500 rpm) durante 1 min, con el fin de homogeneizar muy bien la solución. Finalizado este proceso, la solución se agregó a los polvos compactos, previamente pesados, y nuevamente se agitó en el *minishaker* (2500 rpm) durante 1 min, las muestras se dejaron reposar por 1 min más; a temperatura ambiente, se dejó volatilizar el solvente, dejando en la matriz final los analítos de interés. Realizada la preparación de las muestras, los tubos se sellaron y se sometieron a la degradación oxidativa por radiación UV durante 12 h (**Figura 17**). Luego, se siguió el procedimiento descrito en la **Sección 2.7.1.**

3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES, POR MWHD, Y EXTRACTOS, POR SFE CON CO2 SUPERCRÍTICO

3.1.1 Rendimientos obtenidos de los AE y extractos. En la **Tabla 5** se presentan los rendimientos obtenidos para los AE y extractos de las plantas bajo estudio. Los rendimientos se calcularon relacionando las cantidades másicas obtenidas del AE o extracto con la cantidad de material vegetal seco usado, según la siguiente ecuación:

$$\%R = \left(\frac{W_i}{W_{MV}}\right) \times 100 \qquad \textbf{(6)}$$

Donde:

W_i: Masa del AE o extracto obtenido (g);

W_{MV}: Masa del material vegetal seco empleado (g);

R: Porcentaje de rendimiento (%).

Tabla 5. Rendimientos de los aceites esenciales y extractos de cada planta.E1-E3 corresponden al número de extracciones realizadas por SFE.

Material Vegetal	Rendimiento, %			
	MWHD	SFE		
		E1	E2	E3
***Rosmarinus officinalis* L.**	0,9	2,0	2,5	3,0
***Lippia origanoides* H.B.K.**	0,6	4,3	2,7	3,2
Zingiber officinale	0,4	2,8	-	-

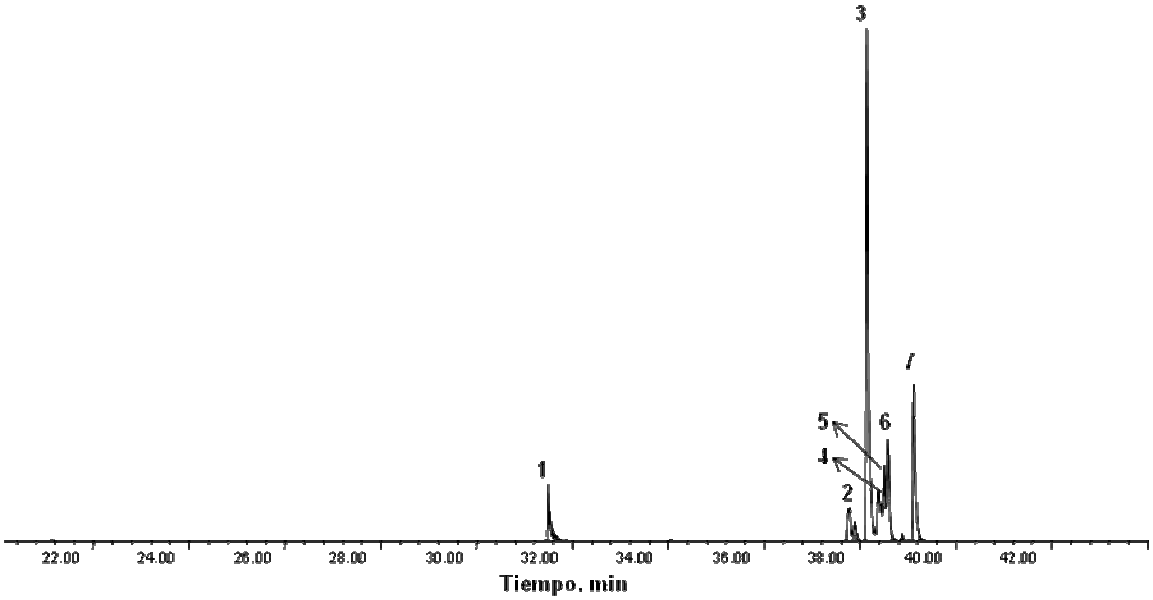
De acuerdo con la información reportada en la **Tabla 5**, se observó que el aceite esencial de romero fue de mayor rendimiento. Sin embargo, empleando la extracción con CO_2 supercrítico se obtuvieron, en mayor cantidad, los extractos de romero, a una presión de 400 bar (E3) y, de orégano de monte, a una presión de 300 bar (E1); en el caso del jengibre, fue posible realizar una sola extracción debido a que se disponía apenas de 538.97 g de material vegetal, para realizar la extracción con SFE y 259.05 g, para obtener el AE por MWHD.

3.2 CARACTERIZACIÓN POR GC-MS DE LOS ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS OBTENIDOS

La identificación de los componentes de los AE y extractos obtenidos mediante MWHD y SFE, respectivamente, se realizó así como se describe en el **Numeral 2.5.1.**

3.2.1 ***Zingiber officinale***.Para el **extracto de jengibre** obtenido por SFE se detectaron, por GC-MS, 7 compuestos en cantidades > 1%; de ellos, se identificaron positivamente 6 compuestos, que representa el 94,2% del aceite esencial total. La identificación se realizó mediante comparación de los espectros de masas experimentales con los de las bases de datos disponibles, se analizaron: ion molecular, índices de retención y empleando el parámetro de integración: (*Initial Threshold* = 13). Se utilizó una columna apolar DB-5MS (60 m) y la ionización se llevó a cabo con electrones de energía 70 eV. En la **Figura 18** se ilustra el perfil cromatográfico del extracto de *Zingiber officinale.*

Figura 18. Perfil cromatográfico del extracto de *Zingiber officinale,* aislado por SFE. Columna DB-5 (60 m). MSD (EI, 70 eV).



Los compuestos mayoritarios en el extracto corresponden a α-zingibereno (57,4%) y β-sesquifelandreno (18,4%); este último y el ar-curcumeno son los principales contribuyentes al olor característico del jengibre. En la **Tabla 6,** se registran los nombres y la cantidad relativa de los compuestos identificados. De acuerdo con la literatura consultada, estos hidrocarburos sesquiterpénicos ($C_{15}H_{24}$) están presentes en la mayoría de los AE y extractos de este rizoma (Vasquez, O. *et al.,* 2001).

Para el **AE de jengibre** se lograron identificar positivamente 68 compuestos, en cantidad relativa > 1%. Para 12 compuestos sólo fue posible determinar su fórmula molecular, completando un 85,3% total identificado, bajo el parámetro de integración aplicado (*Initial Threshold* = 17,5). En la **Figura 19,** se ilustra el perfil

cromatográfico típico de los metabolitos secundarios volátiles del aceite esencial de *Zingiber officinale.*

Tabla 6. Composición química del extracto de *Zingiber officinale*, aislado por SFE.

No. Pico [a]	Compuesto	IR[b]	Cantidad relativa, %
1	N.I.	-	2,7
2	ar-Curcumeno	1486	4,3
3	α-Zingibereno	1499	57,4
4	E,E-α-Farneseno	1507	0,4
5	γ-Cadineno	1511	4,4
6	β-Bisaboleno	1513	9,2
7	β-Sesquifelandreno	1531	18,4

a Número de pico en la **Figura 18**
b Índices de retención lineales determinados experimentalmente.
N.I. No identificado.

El AE de jengibre está compuesto en su mayoría de monoterpenos, sesquiterpenos y alcoholes terpénicos como linalool, geraniol, terpinen-4-ol, 1,8-cineol, *trans*-hidrato de sabineno, *cis*-p-ment-2-en-ol, *trans*-hidrato de pineno, *trans*-p-ment-2-en-ol, hidrato de canfeno, *trans*-β-terpineol, borneol, α-terpineol, citronelol, a los que se les pueden atribuir las propiedades antioxidantes. En una menor proporción, se encuentran aldehídos y cetonas como citroneral, decanal, geranial, 2-nonanona, neral, *n*-octanal, alcanfor, entre otros. En la **Tabla 7,** se registran los nombres y la cantidad relativa (%) de los compuestos identificados en el aceite esencial de jengibre.

El AE de jengibre obtenido tiene un aroma bastante fresco y cítrico. Estas propiedades en la fragancia son características de uno de sus componentes mayoritarios, el geranial (11,6%) (Remadevi, R. *et al.,* 2005). Por otro lado, presenta un aroma picante, típico de estas especias debido a la presencia del *trans*-metil-isoeugenol (10,2%), sustancia bastante común en las especias, como

estragón, el hinojo, mejorana, pimienta de Jamaica, anís estrellado, anís y albahaca. El AE de jengibre es un importante ingrediente bioactivo con un amplio rango de aplicaciones en las industrias farmacéutica y aromatizante, bebidas no alcohólicas, condimentos, dulces duros y blandos.

Figura 19. Perfil cromatográfico típico del aceite de *Zingiber officinale,* aislado por MWHD*.* Columna DB-5 (60 m), MSD (EI, 70 eV).

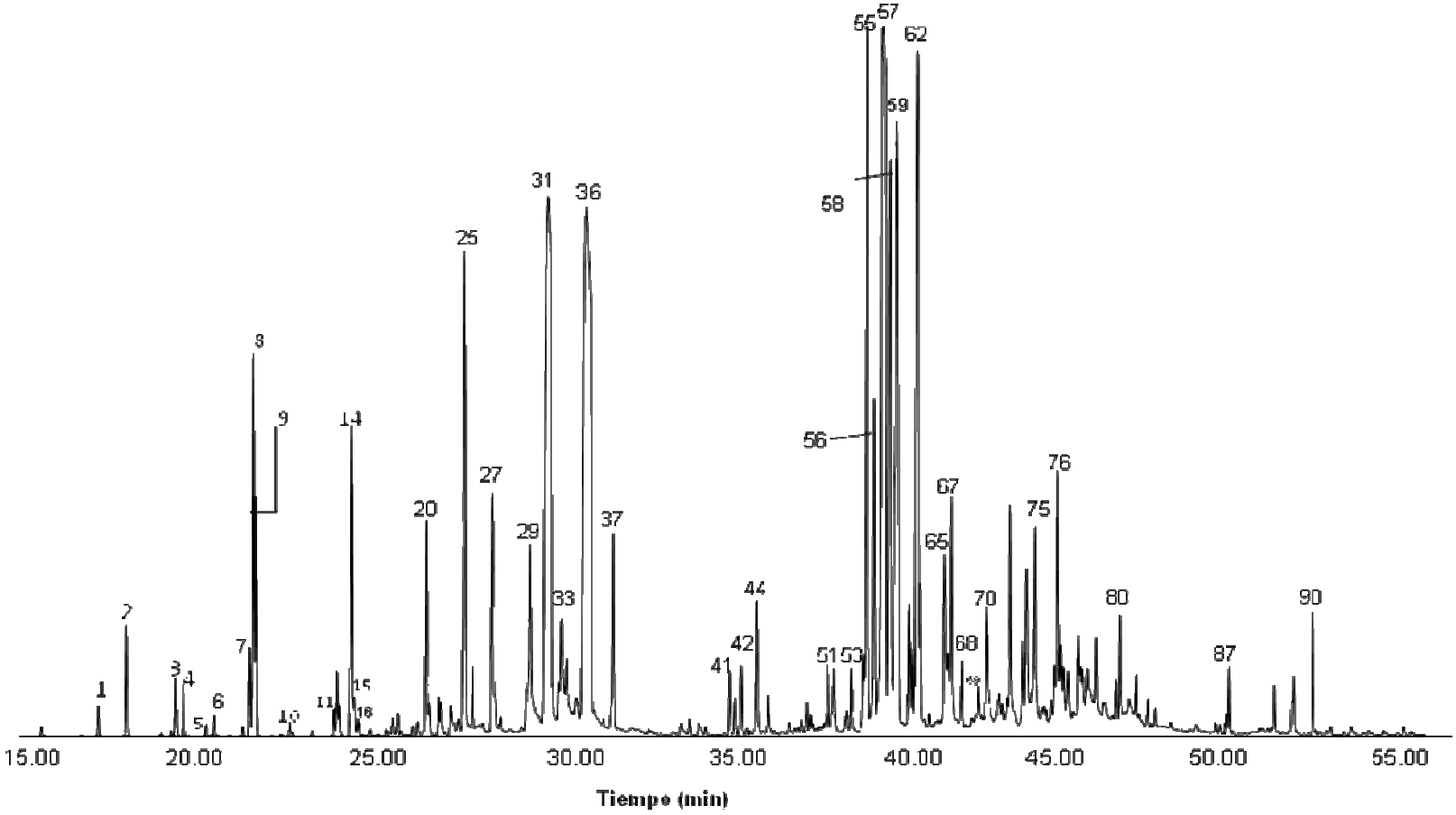


Tabla 7. Composición química del AE de *Zingiber officinale*, aislado por MWHD.

No. Pico [a]	Compuesto	IR[b]	Cantidad relativa, %
1	α-Pineno	939	0,1
2	Canfeno	954	0,5
3	6-Metil-5-hepten-2-ona	986	0,3
4	Mirceno	991	0,2
5	*n*-Octanal	1003	0,1
6	α-Felandreno	1009	0,1
7	Limoneno	1032	0,4
8	β-Felandreno	1035	1,9
9	1,8-Cineol	1037	1,0
10	$C_{12}H_{26}O$, N.I.	1059	0,1
11	Terpinoleno	1088	0,1
12	2-Nonanona	1090	0,3
13	$C_{10}H_{14}O$, N.I.	1092	0,1
14	Linalool	1100	1,7
16	*trans*-Hidrato de sabineno	1105	0,1
17	*cis*-p-Ment-2-en-ol	1129	0,1
18	*trans*-Hidrato de pineno	1133	0,1
19	*trans*-p-Ment-2-en-ol	1147	0,1
20	Citronelal	1153	1,1
21	Alcanfor	1155	0,1
22	$C_{10}H_{16}O$, N.I.	1162	0,2
23	Hidrato de canfeno	1164	0,2
24	Epóxido de rosefurano + *trans*-β-Terpineol	1171	0,2
25	Borneol	1180	3,2
26	Terpinen-4-ol	1187	0,3
27	α-Terpineol	1201	1,7
28	Decanal	1206	0,1
29	Citronelol	1229	1,9
30	$C_{10}H_{20}O$, N.I.	1236	0,1
31	Neral	1243	9,9
32	$C_{10}H_{18}O$, N.I.	1251	0,2
33	Geraniol	1253	0,9
34	$C_{10}H_{18}O$, N.I.	1257	0,5
35	$C_{10}H_{18}O$, N.I.	1265	0,2
36	Geranial	1272	11,6
37	2-Undecanona	1293	1,0

Tabla 7. Continuación

No. Pico [a]	Compuesto	IR[b]	Cantidad relativa, %
38	δ-Elemeno	1342	0,1
39	Acetato de citronelilo	1348	0,1
40	α-Cubebeno	1355	0,1
41	Acetato de geranilo	1377	0,3
42	Ciclosativeno	1382	0,2
43	α-Copaeno	1386	0,3
44	Sibireno	1397	0,7
45	7-*epi*-Sesquitujeno	1406	0,2
46	*trans*-Cariofileno	1423	0,1
47	γ-Elemeno	1433	0,1
48	*trans*-α-Bergamoteno	1438	0,1
49	*trans*-β-Farneseno	1441	0,1
50	*trans*-9-*epi*-Cariofileno	1455	0,4
51	Sesquisabineno	1460	0,5
	$C_{15}H_{24}$, N.I.		
52	*allo*-Aromadendreno	1470	0,1
53	$C_{15}H_{24}$, N.I.	1474	0,3
54	*ar*-Curcumeno	1484	0,5
55	Germacreno D	1488	4,9
56	α-Zingibereno	1494	1,9
57	*trans*-Metil isoeugenol + E;E-α-Farneseno	1501	10,2
58	δ-Amorfeno	1507	4,5
59	γ-Cadineno	1514	6,0
60	δ-Cadineno	1525	0,6
61	β-Sesquifelandreno	1528	0,3
62	7-*epi*-α-Selineno	1533	5,8
63	Cadina-1,4-dieno	1535	0,5
64	Elemol	1545	0,1
65	*trans*-Hidrato de sesquisabineno	1558	1,3
66	*trans*-Nerolidol	1561	0,4
67	Germacreno B	1564	1,3
68	$C_{15}H_{26}O$, N.I.	1575	0,3
69	$C_{15}H_{26}O$, N.I.	1590	0,3
70	$C_{15}H_{26}O$, N.I.	1635	0,5
74	*epi*-α-Muurolol	1648	1,5
75	α-Cadinol	1669	0,3

a Número de pico en la **Figura 19.**
b Índices de retenciónlinealesdeterminados experimentalmente.
N.I. No identificado.

3.2.2 *Rosmarinus officinalis* L. En el AE de *R. officinalis*L.**,** obtenido por MWHD, se detectaron por GC-MS, 26 compuestos en cantidades >0,1%; de ellos, se identificaron positivamente 24 compuestos, que representan el 96,9% del total del aceite, se uso el parámetro de integración (*Initial Threshold* = 17,5). En la **Figura 20,** se ilustra el perfil cromatográfico típico de los metabolitos secundarios volátiles de *Rosmarinus officinalis* y en la **Tabla 8,** se registran los nombres y la cantidad relativa de los compuestos identificados.

El AE de esta planta se destaca por su contenido alto de verbenona (22,5%), que es un potente mucolítico y antiinfeccioso para los bronquios. También se encuentra alcanfor (13,3%), que se usa para estimular el sistema hepatobiliar y el drenaje hepático; además, posee propiedades antisépticas, anticatarrales, antiespasmódicas, diuréticas y tónicas (Wang, W., 2008). Igualmente el aceite contiene borneol (10,3%), linalool (1,7%), terpinen-4-ol (1,6%) y α-terpineol (3,1%), que pueden tener las propiedades antioxidantes (atrapamiento de radicales), por la presencia del grupo hidroxilo.

En el extracto de ***Rosmarinus officinalis* L.** se lograron identificar positivamente, bajo el parámetro de integración *Initial Threshold* = 15; 32 compuestos, además, fue posible determinar la fórmula molecular en tres compuestos, completándose así 35 compuestos que representan el 75% del extracto total identificado. En la **Figura 20,** se ilustra el perfil cromatográfico típico de los metabolitos secundarios volátiles del AE de *Rosmarinus officinalis* y en la **Tabla 9,** se registran los nombres y la cantidad relativa de los compuestos identificados.

Figura 20. Perfil cromatográfico típico del AE de *Rosmarinus officinalis* L., aislado por MWHD. Columna DB-5 (60 m), MSD (EI, 70 eV).

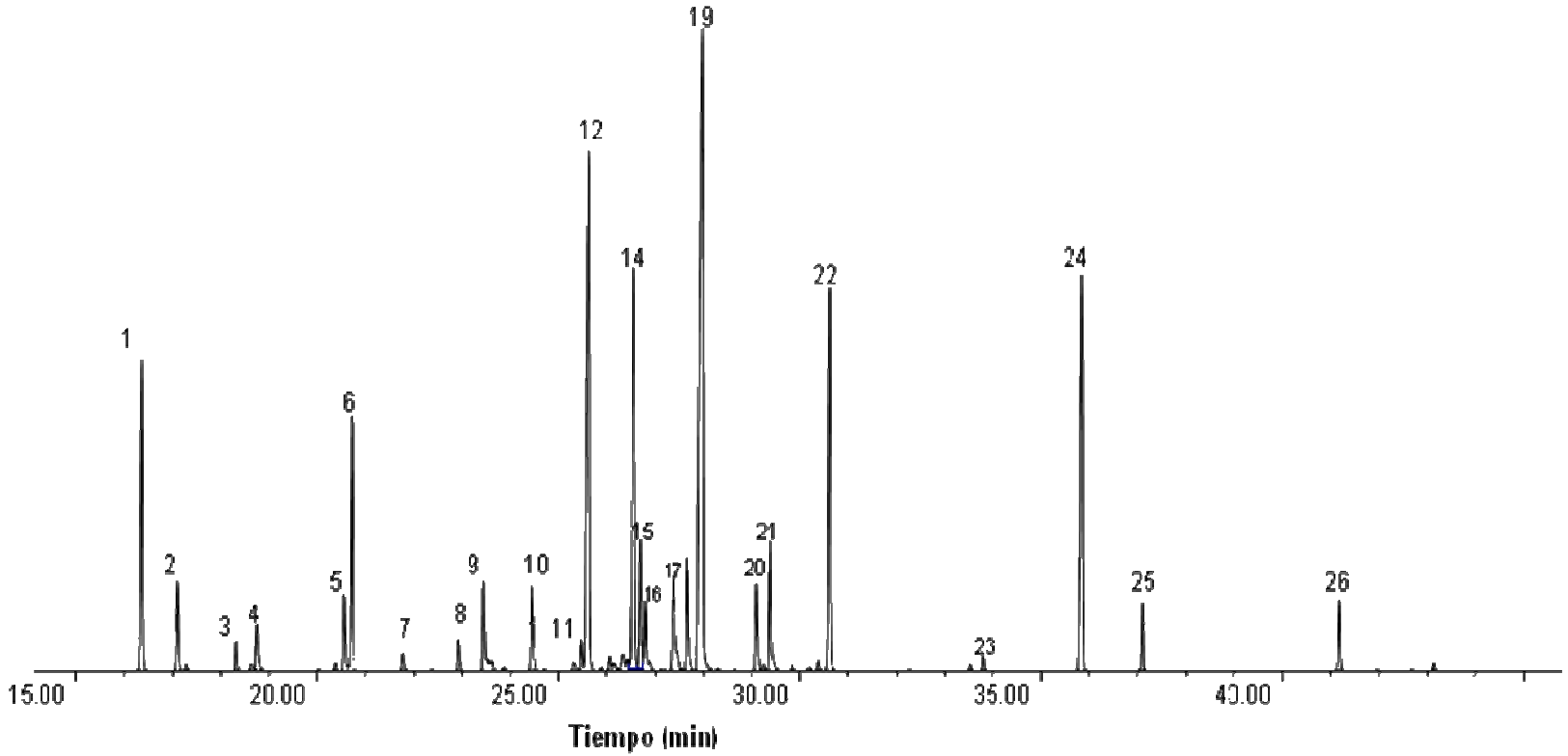


Tabla 8. Composición química del AE de *Rosmarinus officinalis*, aislado por MWHD.

No. Pico [a]	Compuesto	IR[b]	Cantidad relativa, %
1	α-Pineno	939	5,9
2	Canfeno	943	1,7
3	β-Pineno	979	0,6
4	β-Mirceno	991	1,0
5	Limoneno	1018	1,4
6	1,8-Cineol	1022	4,6
7	γ-Terpineno	1051	0,5
8	Terpinoleno	1081	0,7
9	Linalool	1096	1,7
10	Crisantenona	1123	1,7
11	*trans*-Verbenol	1150	0,6
12	Alcanfor	1154	13,3
13	*trans*-Pinocanfona	1167	0,2
14	Borneol	1180	10,3
15	*cis*-Pinocanfona	1184	2,4
16	Terpinen-4-ol	1187	1,6
17	α-Terpineol	1202	3,1
18	$C_{10}H_{18}O$, N.I.	1210	2,2
19	Verbenona	1218	22,5
20	$C_{10}H_{16}O$, N.I.	1250	1,7
22	Acetato de bornilo	1291	7,6
24	*trans*-Cariofileno	1433	8,7
25	α-Humuleno	1469	1,4
26	Óxido de cariofileno	1598	1,4

a Número de pico en la **Figura 20**
b Índices de retención lineales determinados experimentalmente.
N.I. No identificado.

Figura 21. Perfil cromatográfico típico del extracto de *Rosmarinus officinalis* L., aislado por SFE a 400 bar, durante 1 hora. Columna DB-5 (60 m), MSD (EI, 70 eV).

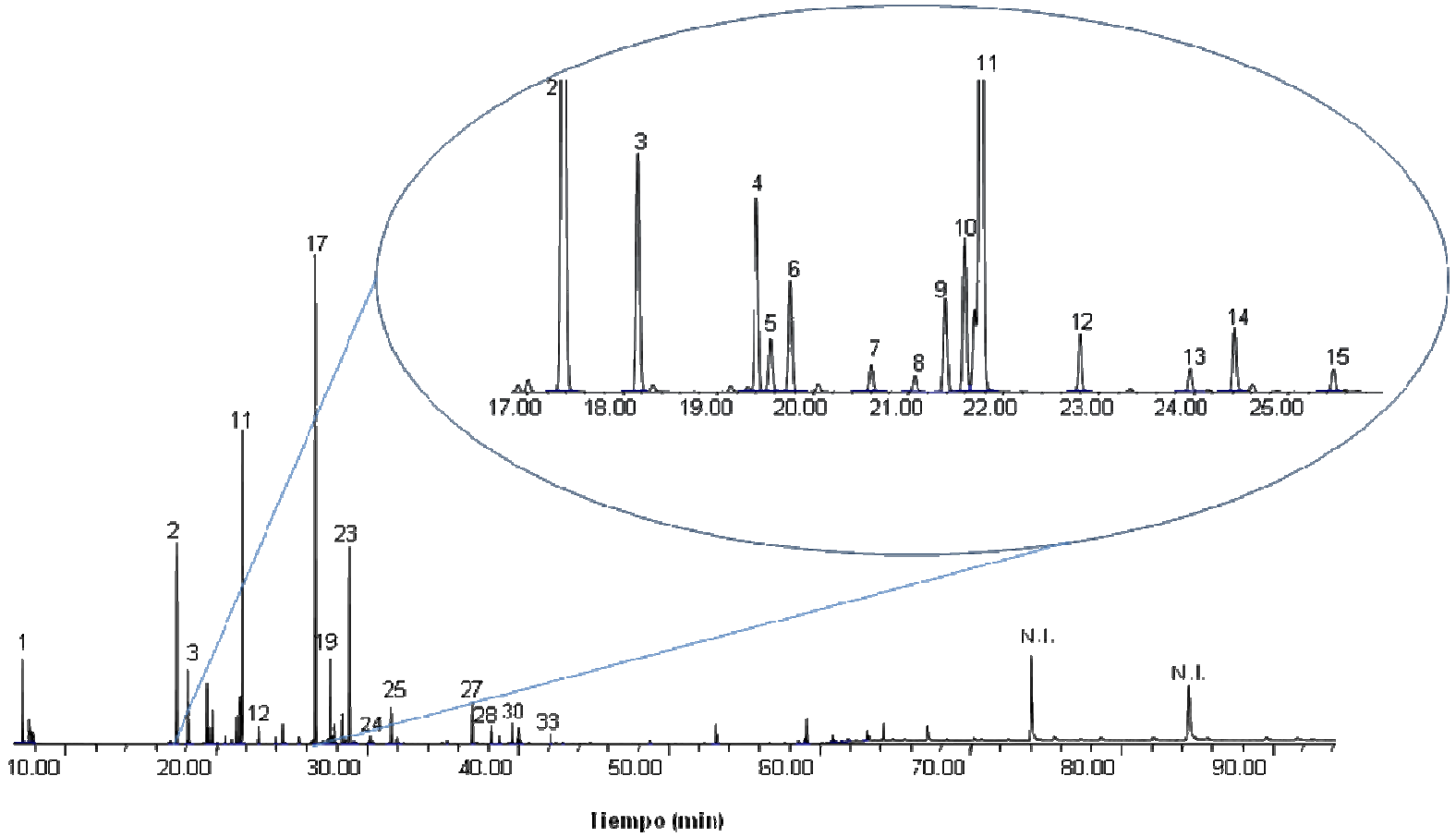


Tabla 9. Composición química del extracto de *Rosmarinus officinalis*L., aislado por SFE.

No. Pico [a]	Compuesto	IR[b]	Cantidad relativa, %
1	Ciclohexeno	-	3,3
4	α-Pineno	937	7,4
5	Canfeno	954	2,8
6	β-Pineno	982	2,3
7	3-Octanona	985	0,6
8	Mirceno	990	1,2
9	α-Felandreno	1010	0,3
10	α-Terpineno	1021	0,2
11	p-Cimeno	1028	1,1
12	Limoneno	1033	1,7
13	1,8-Cineol	1037	12,6
14	γ-Terpineno	1062	0,7
15	Terpinoleno	1090	0,3
16	Linalool	1101	0,7
17	Crisantenona	1127	0,3
18	$C_{10}H_{14}O$, N.I.	1152	0,1
19	Alcanfor	1156	19,0
20	$C_{10}H_{18}O$, N.I.	1176	0,2
21	*endo*-Borneol	1180	3,3
22	$C_{10}H_{16}O$, N.I.	1185	0,3
23	Terpin-4-ol	1187	0,8
24	α-Terpineol	1201	1,3
25	Verbenona	1215	7,3
26	Geraniol	1251	0,5
27	Acetato de bornilo	1290	1,5
28	Carvacrol	1300	0,5
29	*trans*-Cariofileno	1435	1,6
30	α-Humuleno	1471	0,7
31	γ-Muuroleno	1486	0,4
32	β-Bisaboleno	1514	0,8
33	γ-Cadineno	1525	0,2
34	δ-Cadineno	1528	0,6
35	Óxido de cariofileno	1599	0,4

a Número de pico en la **Figura 21**
b Índices de retención lineales determinados experimentalmente.
N.I. No identificado.

Se puede observar, que el extracto obtenido por SFE de romero está constituido principalmente por monoterpenos y sesquiterpenos. También posee alcoholes terpénicos como linalool, *endo*-borneol, terpin-4-ol, α-terpineol, geraniol y, como terpeno fenólico, se encuentra el carvacrol. El carvacrol, junto con los alcoholes terpénicos, es el principal compuesto responsable de la actividad antioxidante presente en este extracto, debido a la presencia del grupo hidroxilo en su estructura molecular.

3.2.3 *Lippia origanoides* H.B.K. En el AE de *Lippia origanoides* H.B.K. (quimiotipo carvacrol), obtenido por MWHD, se detectaron 17 compuestos en cantidades >0,1% bajo el parámetro de integración (*Initial Threshold* = 17,8); de ellos, todos se identificaron positivamente (100%). En la **Figura 22,** se ilustra el perfil cromatográfico típico de los metabolitos secundarios volátiles de *Lippia origanoides* H.B.K.

Los compuestos mayoritarios en el AE corresponden a carvacrol (50,2%) y timol (31,8%). Estos terpenos fenólicos son los que proporcionan la capacidad antioxidante de este aceite, y por tal razón se usan en la industria como antisépticos y germicidas en muchas preparaciones medicinales orales, y desinfectantes (Castañeda, M., 2007). La composición de este AE se puede considerar de tipo fenilpropanoide.

Para el extracto de ***Lippia origanoides* H.B.K.** (quimiotipo carvacrol), obtenido por SFE, a presión de 500 bar, se detectaron por GC-MS, 64 compuestos en cantidades >0,1%; de ellos, se identificaron positivamente 20 y, en dos compuestos, fue posible determinar también su fórmula molecular, completando un 89,7% total identificado. Se usó el parámetro de integración *Initial Threshold* = 15. En la **Figura 23**, se ilustra el perfil cromatográfico típico del extracto de *Lippia origanoides* H.B.K.y, en la **Tabla 11,** aparecen los nombres y la cantidad relativa (%) de los compuestos identificados.

Figura 22. Perfil cromatográfico típico del AE de *Lippia origanoides* H.B.K., aislado por MWHD. Columna DB-5 (60 m), MSD (EI, 70 eV).

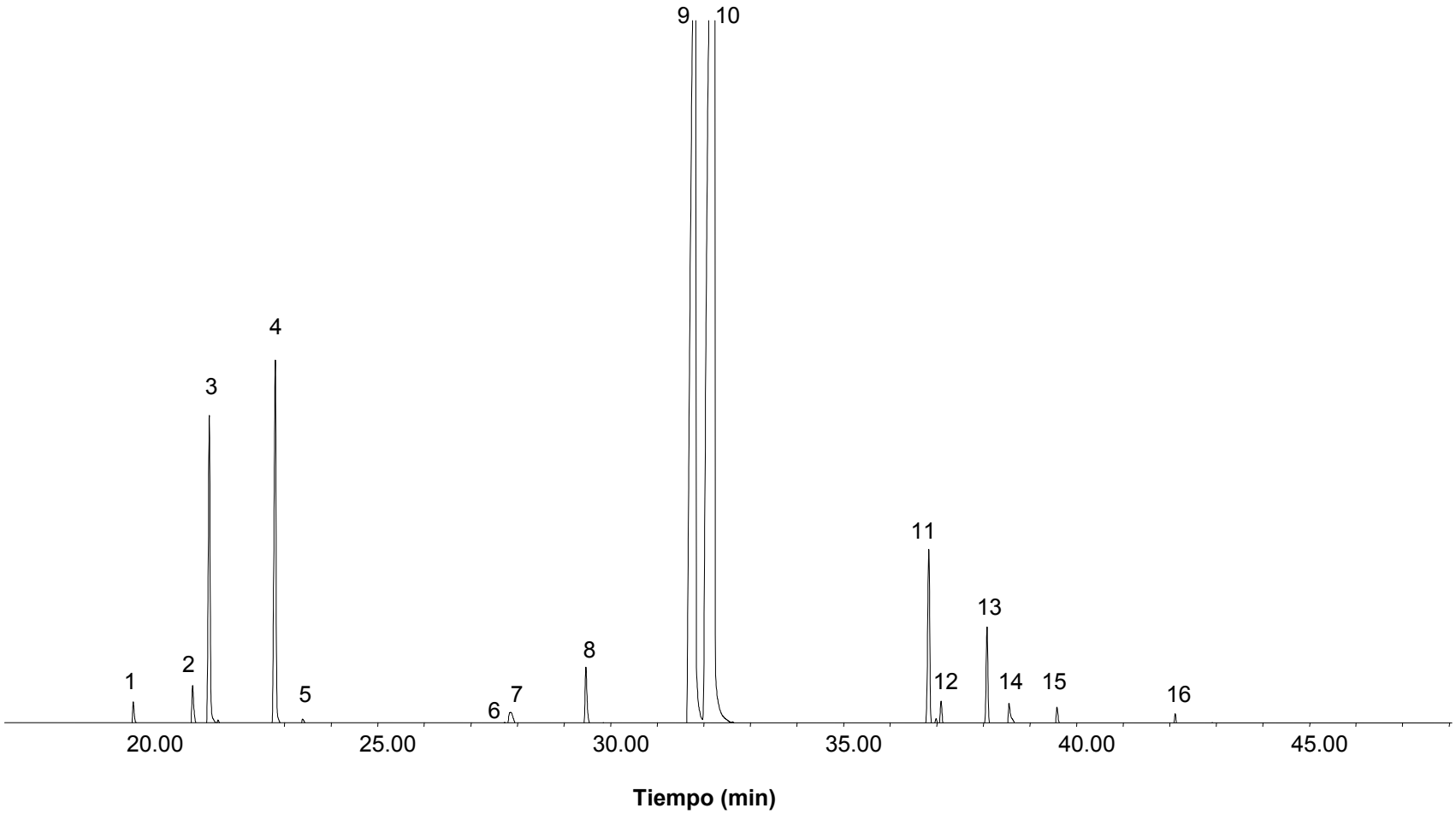


Tabla 10. Composición química del AE de *Lippia origanoides* H.B.K., aislado por MWHD.

No. Pico [a]	Compuesto	IR[b]	Cantidad relativa, %
1	β-Mirceno	991	0,4
2	Δ^3-Careno	1004	0,6
3	p-Cimeno	1013	4,2
4	γ-Terpineno	1052	5,5
5	*cis*-Hidrato de sabineno	1068	0,2
6	3-Tujen-2-ona	1185	0,1
7	Terpinen-4-ol	1188	0,5
8	Metil timil éter	1232	0,9
9	Timol	1297	31,8
10	Carvacrol	1308	50,2
11	*trans*-Cariofileno	1433	2,7
12	*trans*-α-Bergamoteno	1440	0,4
13	α-Humuleno	1468	1,4
14	Butilato de hidroxianisilo	1482	0,6
15	β-Bisaboleno	1513	0,3
16	δ-Amorfeno	1526	0,0
17	Óxido de cariofileno	1596	0,2

a Número de pico en la **Figura 22**
b Índices de retención lineales determinados experimentalmente.

En el extracto de *Lippia origanoides* H.B.K., el compuesto mayoritario es el carvacrol, con una cantidad relativa de 54%. En menor proporción, se encuentran *p*-cimeno (6,5%) y timol (5,1%). Por su alto contenido de carvacrol, el extracto de ***Lippia origanoides* H.B.K.**, puede considerarse un potente antioxidante. Este extracto, también contiene otros monoterpenos, sesquiterpenos, aldehídos, cetonas y acetatos, típicos de los aceites y extractos de *Lippia origanoides* H.B.K.(Castañeda, M., 2007).

Figura 23. Perfil cromatográfico típico del extracto de *Lippia origanoides* H.B.K., aislado por SFE, a 500 bar, durante 1 hora. Columna DB-5 (60 m), MSD (EI, 70 eV).

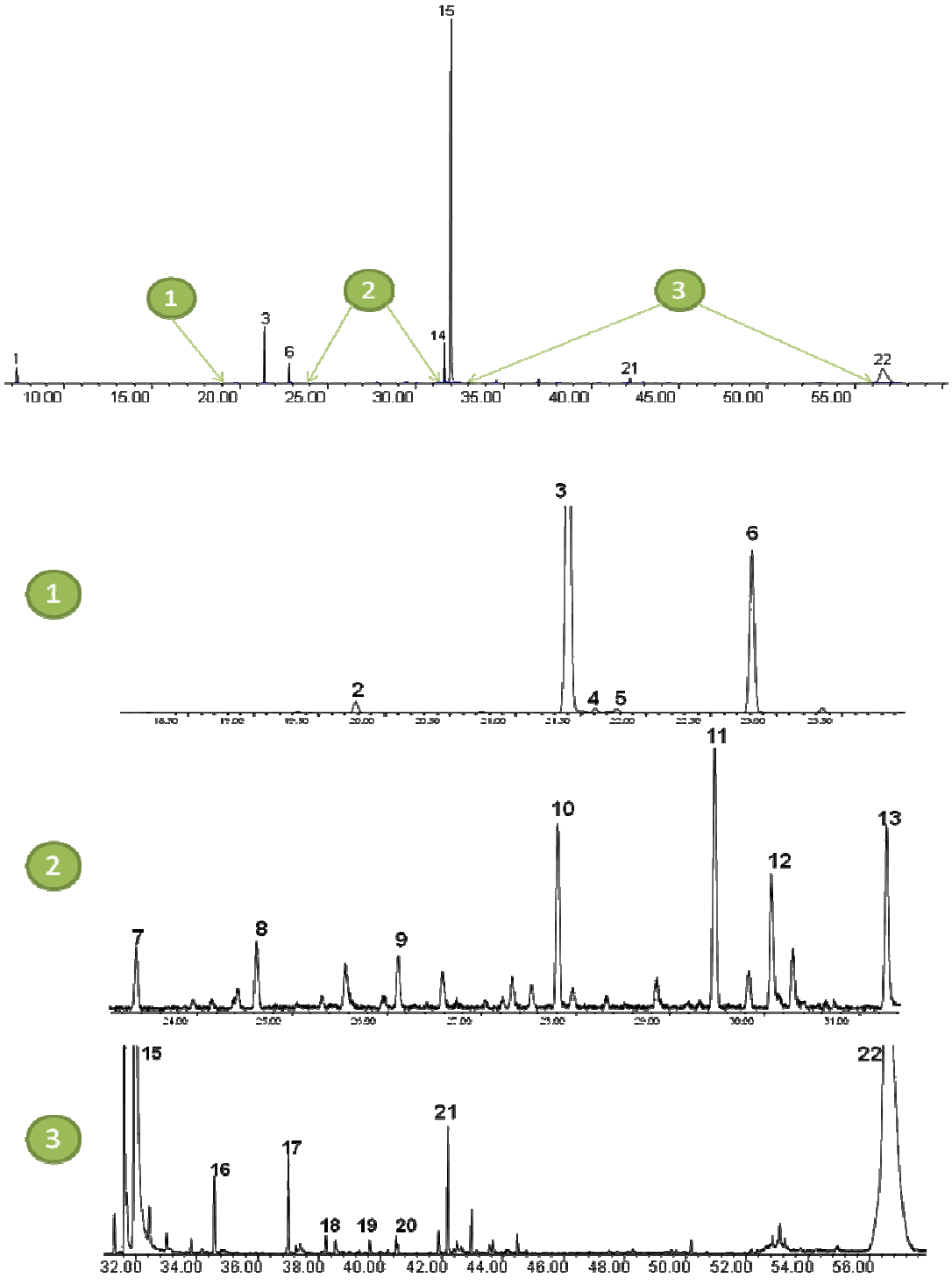


Tabla 11. Composición química del extracto de *Lippia origanoides* H.B.K., aislado por SFE.

No. Pico [a]	Compuesto	IR[b]	Cantidad relativa, %
1	α-Pineno	937	0,1
2	β-Pineno	991	0,2
3	*p*-Cimeno	1029	6,5
4	Limoneno	1034	0,1
5	1,8-Cineol	1038	0,1
6	γ-Terpineno	1062	2,4
7	*cis*-Hidrato de sabineno	1075	0,1
8	*trans*-Hidrato de sabineno	1106	0,1
9	Alcanfor	1156	0,1
10	Terpinen-4-ol	1187	0,2
11	Metil timil éter	1231	0,3
12	$C_{10}H_{16}$, N.I.	1248	0,2
13	Timol	1290	5,1
14	Carvacrol	1300	54,0
15	Acetato de timilo	1347	0,1
16	Acetato de carvacrilo	1367	0,5
17	*trans*- β -Cariofileno	1434	0,6
18	α-Humuleno	1470	0,2
19	β-Bisaboleno	1514	0,1
20	Óxido de cariofileno	1598	0,7
21	Epóxido de humuleno II	1627	0,3
22	$C_{30}H_{48}O$, N.I.	2239	18,0

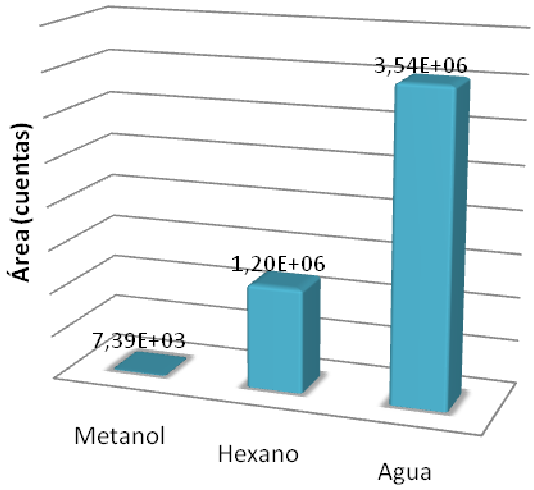
a Número de pico en la **Figura 23**
b Índices de retención lineales determinados experimentalmente.
N.I. No identificado.

3.3 FORMACIÓN DE LA PENTAFLÚORFENILHIDRAZONA

3.3.1. Determinación del solvente en la preparación de las disoluciones de la pentafluórfenilhidracina (PFPH). En diferentes trabajos realizados en el Laboratorio de Cromatografía (Ferreira, M. *et al.*, 1997; Stashenko, E. *et al.*, 1997; 2000), se emplearon metanol, hexano o agua como solventes para preparar las disoluciones del agente derivatizante, PFPH. En el presente trabajo, y con el fin de optimizar la técnica desarrollada (SPME), se prepararon tres soluciones de PFPH de 500 ppm con los solventes mencionados. La fibra de PDMS/DVB se expuso en

el espacio de cabeza del vial que contenía cada una de las disoluciones de PFPH (2 mL, 1000 rpm, 10 min); transcurrido este tiempo, la fibra se desorbió en el puerto de inyección del sistema GC-μECD a 250ºC. En la **Figura 24,** se observa que el mejor solvente para el presente análisis fue el agua debido a que permitió el paso de un mayor número de moléculas de PFPH a la fase vapor, facilitando su mayor adsorción sobre la fibra de PDMS/DVB. Esto se evidencia en la mayor cantidad de área relativa obtenida para el derivado hidrazónico, a diferencia de las disoluciones preparadas con metanol y hexano. En consecuencia, en esta investigación, se trabajó con agua como solvente, dado que la PFPH es más miscible con los otros dos solventes valorados.

Figura 24. Determinación del mejor solvente para preparar las disoluciónes de la PFPH. Áreas relativas obtenidas para los solventes metanol, agua y hexano.



3.2 CALIBRACIÓN EXTERNA PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL DERIVADO DE HEXANAL CON LA PFPH.

Se determinó la linealidad de la respuesta del μ-ECD para el derivado de hexanal-PFPH. Como se explica en la **Sección 3.4.5**, se trabajó con dos niveles de

concentración: Nivel bajo (0.05, 1, 5, 10, 15 y 40 ppm) y nivel alto (50, 80, 100, 300, 500, 750 y 800 ppm). Los valores que indican la linealidad de la respuesta del detector van desde 0.05 a 100 ppm. En el **Anexo C** se muestra la curva de calibración y el rango lineal de respuesta del detector. Las figuras analíticas de mérito obtenidas para la concentración de 80 ppm se muestran en la **Tabla 12,** donde se reporta un coeficiente de variación aceptable para el trabajo con la técnica de SPME. Para determinar el límite de detección (LD), se inyectó una solución de hexanal de 5 ppb al sistema por el GC- μ-ECD y se obtuvo una señal apenas distinguible que pudo ser medida; el límite de cuantificación (LQ) se determinó como 3 veces mayor que el límite de detección.

Tabla 12. Valores estadísticos para la validación del método con los correspondientes límites de detección y cuantificación.

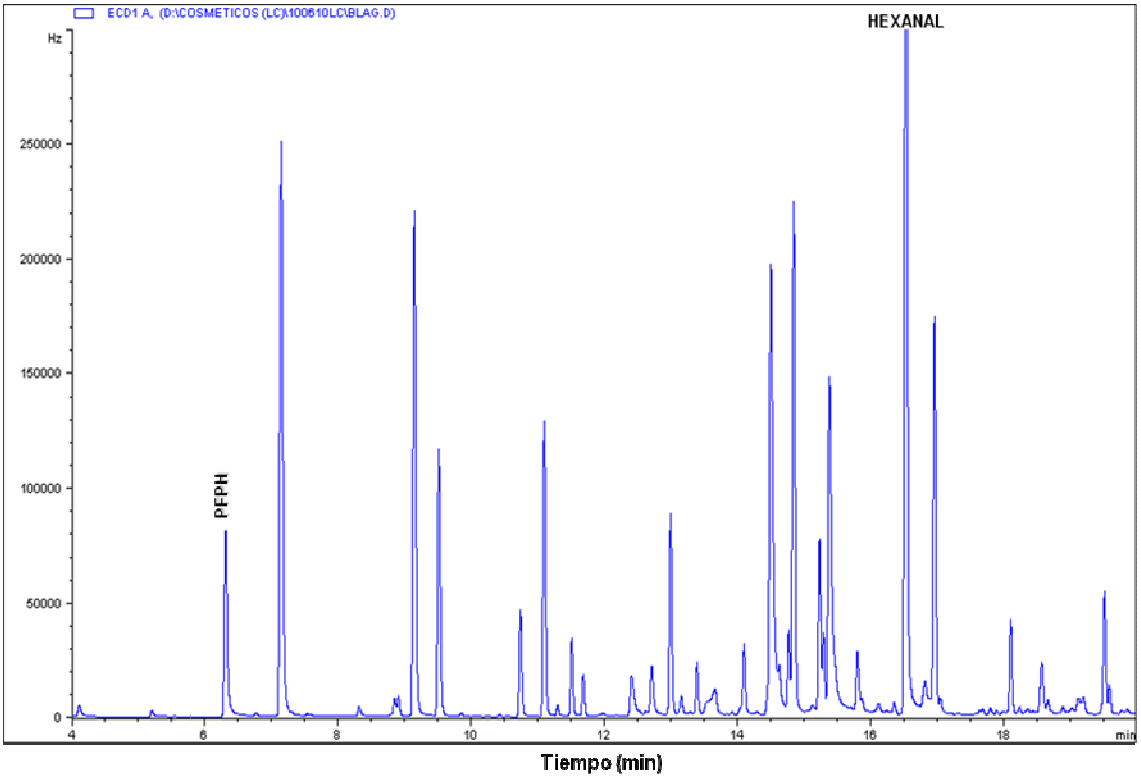
No. Mediciones	Área, cuentas	$\bar{X}$	S	CV, %	LD, nmol de hexanal	S/N
1	2,13E+06					
2	2,33E+06				50,5	
3	2,52E+06	2,32E+06	1,46E+05	6,3	**LQ, nmol de hexanal**	0,3
4	2,37E+06				151,5	
5	2,23E+06					

3.3 ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DEL DERIVADO HIDRAZÓNICO POR GC-μECD.

3.3.1 Actividad antioxidante in-vitro de los AE, extractos, mezclas de AE y mezclas de extractos de orégano de monte (quimiotipo carvacrol), romero y jengibre en el sistema lipídico modelo (aceite de girasol) sometido a radiación UV. El derivado hidrazónico del hexanal, producto de la descomposición producida por la peroxidación térmica, inducida durante 12 horas en el aceite de

girasol y, sometido al agente derivatizante (PFPH), con posterior extracción SPME, se puede observar en la **Figura 25**.

Figura 25. Perfil cromatográfico típico de derivados carbonílicos generados, en el aceite de girasol.

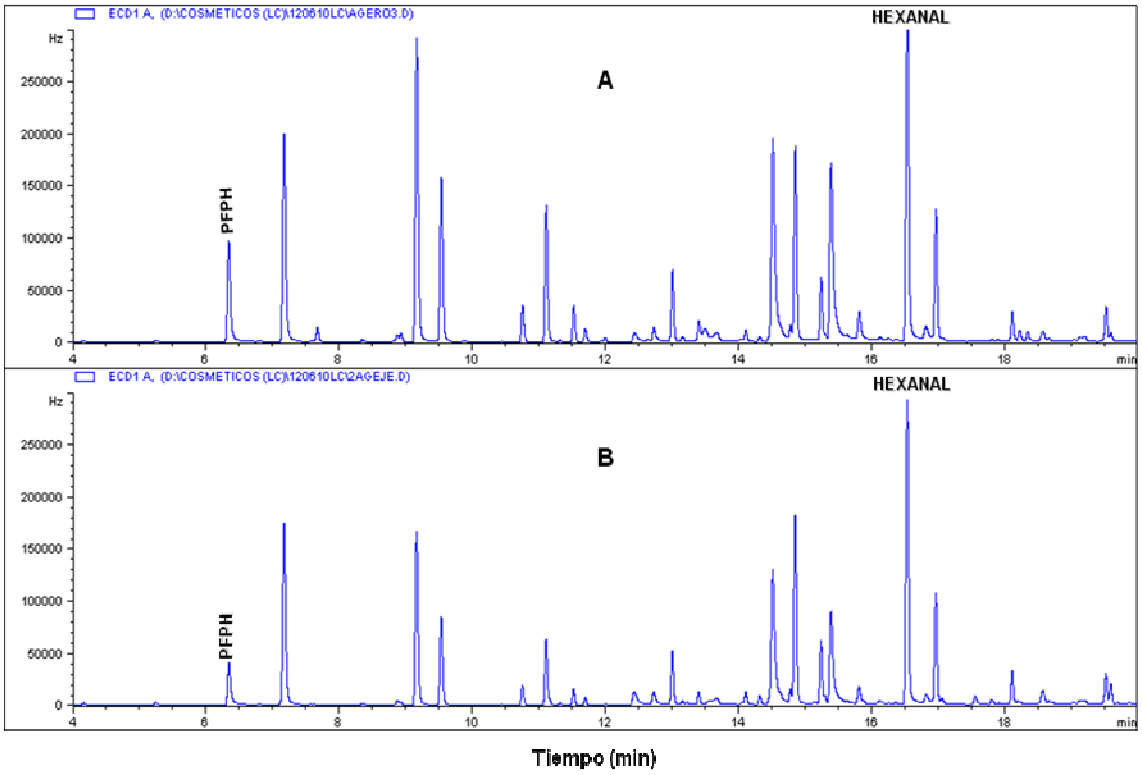


La presencia de ácido linoléico en el aceite de girasol se relaciona con la alta concentración del hexanal generado durante la peroxidación lipídica, debido a que la degradación oxidativa de este ácido debido a la presencia de enlaces que se encuentran en su estructura.

Al someter el aceite de girasol, en presencia de los AE o extractos, a la radiación UV, se observó que todos los productos presentaron, en menor o en mayor grado, un efecto protector, actuando como secuestradores de los radicales libres y generando especies estables que inhibieron la consecuente degradación de la matriz.

La combinación de extractos, que superó a todos los demás productos e incluso a los antioxidantes de referencia en cuanto a su actividad antioxidante, resultó ser la mezcla de los extractos de romero y jengibre, EROJE (63%). Teniendo en cuenta los resultados de los extractos individuales (**Figura 26**), se pudo evidenciar que la presencia de los compuestos fenólicos en el extracto de jengibre, favoreció la actividad antioxidante y, potencializó el efecto antioxidante del extracto de romero.

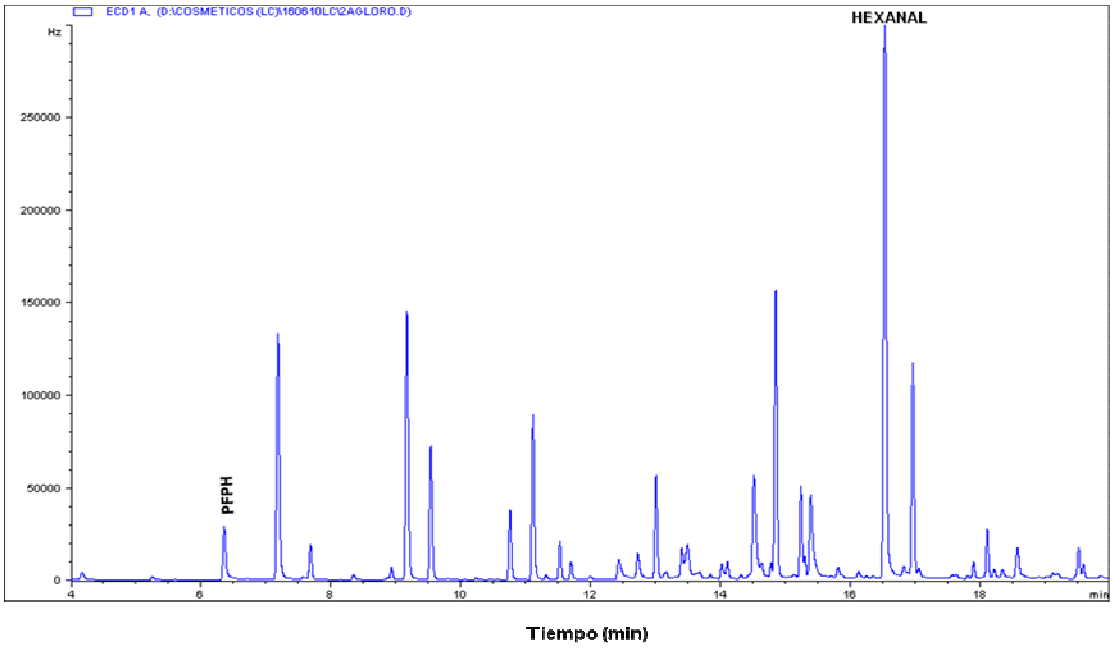
Figura 26. Perfiles cromatograficos del derivado hexanal-PFPH obtenido en los extractos de romero (A) y jengibre (B).



De igual manera, la mezcla de extractos de orégano de monte y jengibre (ELOJE), también exhibió un grado de protección más alto que el de la vitamina E, lo que confirma que los compuestos del extracto de jengibre si potencializaron el efecto antioxidante de otros extractos, *e.g.*, el del orégano de monte.

En la **Figura 27** se presenta el perfil cromatográfico de la mezcla de AE de orégano de monte y romero (ALORO). Esta mezcla mostró un mayor grado de protección (54%) que la vitamina E (52%), en el aceite de girasol. Teniendo en cuenta los resultados individuales de cada uno de estos AE (**Tabla 13**), se puede considerar, que el AE de orégano de monte aportó compuestos fenólicos que favorecieron la capacidad secuestradora de radicales libres de la mezcla.

Figura 27. Perfil cromatográfico de la mezcla de AE de *Lippia origanoides* H.B.K. *y Rosmarinus officinalis* (ALORO).



En la **Figura 28**, se observa el gráfico generado con los datos de la **Tabla 13;** en ésta, se aprecia el grado de protección de cada producto natural, comparado con los antioxidantes de referencia, BHT y vitamina E. De los AE, el que mayor grado de protección ofreció en el sistema lipídico modelo fue el AE de jengibre (41%) en concordancia con numerosos estudios, entre estos, el de Singh y colaboradores (2008), quienes destacan el potencial efecto antioxidante del aceite y la oleorresina de jengibre debido a su contenido fenólico y al efecto sinérgico entre

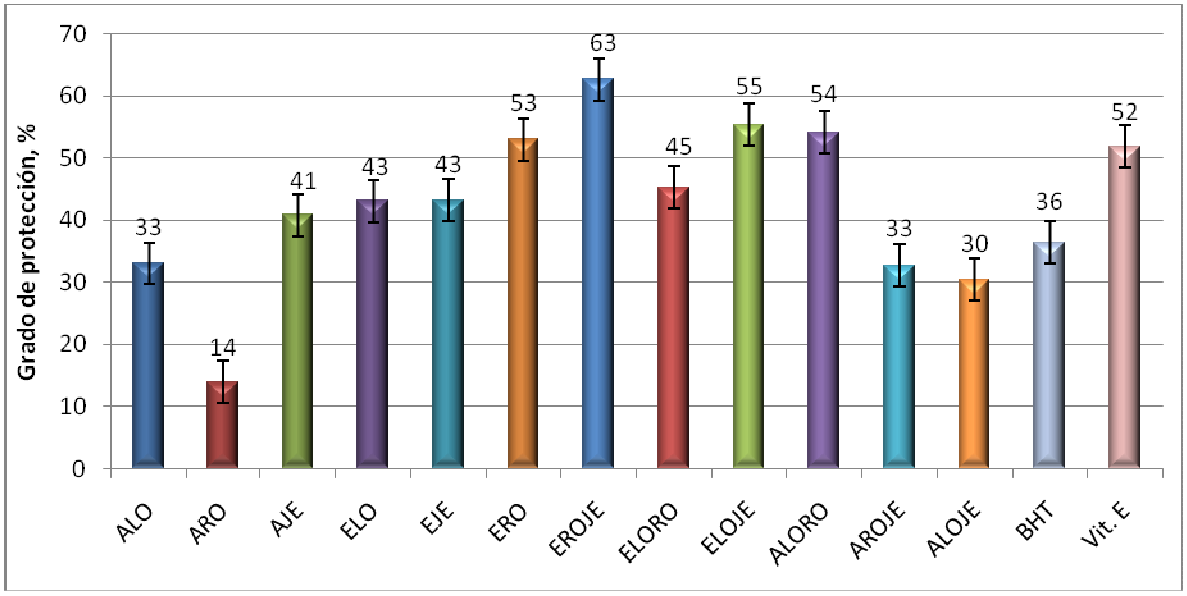
sus componentes. Por otra parte, el AE de romero mostró menor efecto protector ofrece (14%), incluso, más bajo que el del antioxidante de referencia BHT (36%), posiblemente, porque sus compuestos mayoritarios no son compuestos fenólicos sino compuestos carbonílicos tipo cetona, para los cuales no se ha evidenciado su acción como agentes inhibidores del proceso de oxidación.

También, se resalta que el extracto que mayor efecto protector ofreció fue el de romero (53%); difirieron de él, en poca cantidad, los extractos de orégano de monte y jengibre, que mostraron un buen efecto de protección (43%), comparado con el del BHT. Puede deberse esto a que el extracto de romero tiene mayor presencia de compuestos fenólicos, lo cual permite un grado mayor de inhibición de la oxidaciónde lípidos y, por lo tanto, muestra un grado de protección más alto, que los otros dos extractos, el BHT e incluso la vitamina E (52%).

Tabla 13. Áreas cromatográficas, desviación estándar (S), coeficiente de variación (%CV) y grado de protección (%GP), del derivado hidrazónico de la pentaflúorfenilhidrazona en los AE, extractos, mezclas de aceites, mezclas de extractos, BHT y vitamina E en aceite de girasol y empleando μ-ECD en el sistema de detección.

Muestra		1	2	$\bar{X}$	S	%CV	%GP
BLANCO	**AG**	1,90E+06	2,40E+06	2,2E+06	2,50E+05	11,6	0
ACEITES	**ALO**	1,42E+06	1,46E+06	1,4E+06	1,97E+04	1,4	33
	ARO	1,94E+06	1,75E+06	1,9E+06	9,39E+04	5,1	14
	AJE	1,15E+06	1,39E+06	1,3E+06	1,17E+05	9,2	**41**
EXTRACTOS	**ELO**	1,03E+06	1,42E+06	1,2E+06	1,97E+05	16,1	43
	EJE	1,23E+06	1,21E+06	1,2E+06	6,25E+03	0,5	43
	ERO	9,96E+05	1,03E+06	1,0E+06	1,46E+04	1,4	**53**
MEZCLAS DE EXTRACTOS	**EROJE**	8,10E+05	7,93E+05	8,0E+05	8,69E+03	1,1	**63**
	ELORO	1,04E+06	1,31E+06	1,2E+06	1,35E+05	11,5	45
	ELOJE	8,67E+05	1,05E+06	9,6E+05	9,15E+04	9,5	55
MEZCLAS DE AE	**ALORO**	9,85E+05	9,86E+05	9,9E+05	2,50E+01	0,0	**54**
	AROJE	1,48E+06	1,41E+06	1,5E+06	3,50E+04	2,4	33
	ALOJE	1,53E+06	1,46E+06	1,5E+06	3,91E+04	2,6	30
REFERENCIA	**BHT**	1,61E+06	1,12E+06	1,8E+06	2,47E+05	18,1	**36**
	Vit. E	9,98E+05	1,07E+06	1,0E+06	3,59E+04	3,5	**52**

Figura 28. Grado de protección de los aceites, extractos, mezclas de aceites, mezclas de extractos, BHT y vitamina E en aceite de girasol. A: Aceite, E: Extracto, LO: *Lippia origanoides* H.B.K.; RO: *Rosmarinus officinalis* L.; JE: *Zingiber officinale*; LORO: Mezcla de *L. origanoides* H.B.K. y *R. officinalis* L.; LOJE: Mezcla de *L. origanoides* H.B.K. y *Z. officinale;* JERO: Mezcla de *Z. officinale* y *R. officinalis* L.



3.3.1 Actividad antioxidante *in-vitro* de los AE, extractos, mezclas de AE y mezclas de extractos de orégano de monte (quimiotipo carvacrol), romero y jengibre en los polvos sometidos a radiación UV.

Al evaluar los antioxidantes naturales en los polvos compactos, se observaron diferencias notables con respecto a los resultados obtenidos con el aceite de girasol, lógicamente, esto se debe, a que son matrices totalmente diferentes. El AG, por su parte, es una matriz más sencilla y compuesta en su mayoría por ácido linoléico, lo que implica una mayor formación del hexanal cuando se induce la oxidación y, por lo tanto, se acentúa más el efecto protector de los antioxidantes introducidos a esa matriz.

El AE de orégano de monte, en los polvos compactos, a diferencia del aceite de girasol, presenta un grado de protección significativo, lo cual es bastante importante y conduce a un avance en la investigación sobre su actividad antioxidante en productos cosméticos, ya que superó a los antioxidantes sintéticos actualmente utilizados como el BHT.

La mezcla de los extractos ELOJE proporcionó una muy buena capacidad antioxidante, aunque, en este caso, no fue mayor que la de la vitamina E en el aceite de girasol; por lo tanto, constituye una muy buena alternativa para reemplazar el uso de BHT en los polvos compactos. Las áreas cromatográficas obtenidas para los componentes de esta mezcla fueron altamente reproducibles y superaron notablemente las áreas del hexanal formado en esta matriz sólida que contiene el BHT. Con respecto a esto, la vitamina E ha de considerarse. Es el antioxidante por excelencia, ofrece un gran efecto protector en los polvos compactos y en los productos cosméticos en general. De igual manera, como previamente se mencionó en la **Sección 1.4.1 (Figura 1**), el estudio estadístico de la demanda de los principales agentes químicos empleados en los cosmecéuticos realizado por *The Freedonia Group Inc*, permite establecer que los AE y los extractos analizados, con seguridad darán inicio a una nueva familia de productos anitoxidantes de tipo natural que conducirán a la proteccción de los productos de uso cosmético y, asimismo, colaborarán conjuntamente a través de su acción para prevenir el envejecimiento prematuro de la piel.

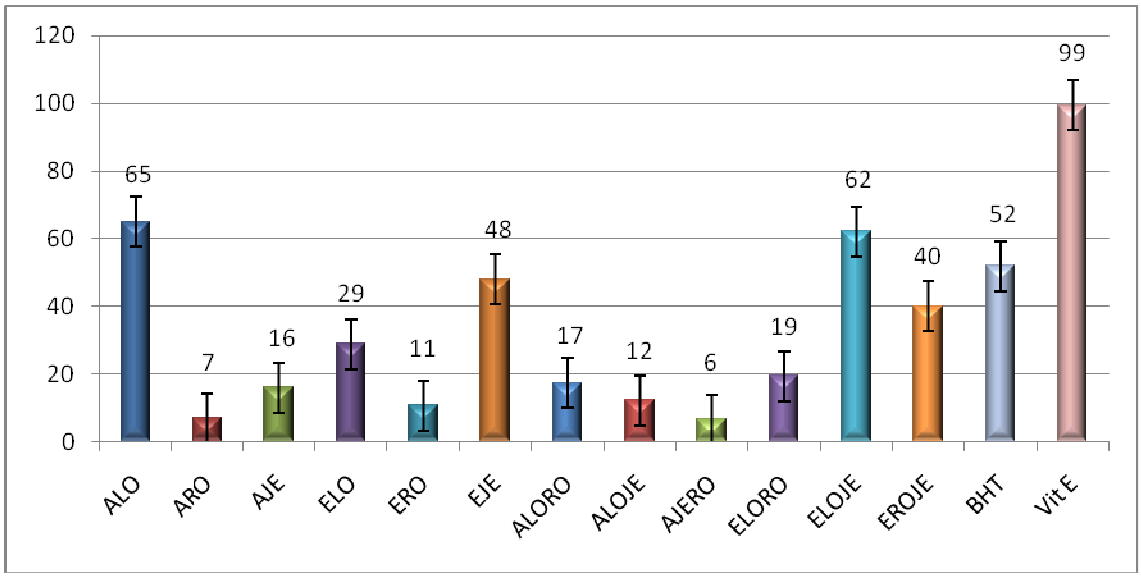
Por otra parte, los polvos compactos poseen más componentes y, a su vez, contienen cantidad menor de ácido linoléico (0,16%), para ser oxidado. En la **Tabla 14** y en la **Figura 29**, se registra la reproducibilidad de las áreas cromatográficas obtenidas para el hexanal, como derivado hidrazónico, y el gráfico de barras con los resultados obtenidos de la peroxidación lipídica inducida por radiación UV en los polvos compactos.

Solo tres productos presentaron grados de protección significativos. Sin embargo, dos de éstos, superan la capacidad antioxidante del BHT (52%). El AE de orégano de monte (ALO), con un 65% de grado de protección, y la mezcla de extractos de orégano de monte y jengibre (ELOJE), con un 62%, respectivamente (Véase **Anexo E**). No obstante, el extracto de jengibre (EJE) con un 48% de grado de protección, fue el tercer agente antioxidante de origen natural más representativo en esta investigación.

Tabla 14. Áreas cromatográficas, desviación estándar (S), coeficiente de variación (%CV) y grado de protección (%GP), del derivado hidrazónico de la pentaflúorfenilhidrazona en los AE, extractos, mezclas de aceites, mezclas de extractos, BHT y vitamina E en polvos compactos y empleando μ-ECD en el sistema de detección.

Muestra	1	2	$\bar{X}$	S	%CV	%GP
BLANCO	3,62E+05	5,66E+05	4,6E+05	1,02E+05	22,0	**0**
ALO	1,46E+05	1,80E+05	1,6E+05	1,41E+04	8,7	**65**
ARO	3,38E+05	5,25E+05	4,3E+05	7,63E+04	17,7	7
AJE	4,67E+05	3,12E+05	3,9E+05	6,33E+04	16,2	16
ELO	3,99E+05	2,61E+05	3,3E+05	5,66E+04	17,2	29
ERO	4,80E+05	3,49E+05	4,2E+05	5,33E+04	12,9	11
EJE	1,91E+05	2,92E+05	2,4E+05	4,14E+04	17,2	**48**
ALORO	4,53E+05	3,14E+05	3,8E+05	5,68E+04	14,8	**17**
ALOJE	4,35E+05	3,79E+05	4,1E+05	2,29E+04	5,6	12
AJERO	4,39E+05	4,29E+05	4,3E+05	4,34E+03	1,0	6
ELORO	3,97E+05	3,50E+05	3,7E+05	1,91E+04	5,1	19
ELOJE	2,04E+05	1,47E+05	1,8E+05	2,30E+04	13,1	**62**
EROJE	2,18E+05	3,38E+05	2,8E+05	4,91E+04	17,7	40
BHT	2,80E+05	1,66E+05	2,2E+05	4,64E+04	20,8	**52**
Vit. E	3,21E+03	3,16E+03	3,2E+03	1,89E+01	0,6	**99**

Figura 29. Grado de protección de los aceites, extractos, mezclas de aceites, mezclas de extractos, BHT y vitamina E en polvos. A: Aceite, E: Extracto, LO: *L. origanoides;* RO: *R. officinalis;* JE: *Z. officinale*; LORO: Mezcla de *L. origanoides* y *R. officinalis;* LOJE: Mezcla de *L. origanoides* y *Z. officinale;* JERO: Mezcla de *Z. officinale* y *R. officinalis.*



De esta manera, se logró implementar la metodología en el Laboratorio de Cromatografía, que permite cuantificar el derivado hidrazónico del hexanal, como producto final de la degradación oxidativa del ácido linoléico formado por acción de la radiación UV de la matriz, y del sistema lipídico modelo.

3.4 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS EN EL EXTRACTO OBTENIDO DE LOS POLVOS COMPACTOS

3.4.1. Rendimiento de la extracción *Soxhlet*. El rendimiento de la extracción se calculó siguiendo la **Ecuación 6**, que relaciona 37.68 g de polvos y 1.48 g del extracto obtenido; con base en estos datos, se obtuvo un rendimiento de extracción para la fracción lipídica del 3.93%.

3.4.2. Determinación del contenido de ésteres metílicos.

El aislamiento de compuestos carbonílicos en matrices grasosas es difícil de realizar debido a su alta reactividad, volatilidad alta, baja concentración y su fácil polimerización. Con el fin de determinar el contenido de ácidos grasos presentes en la fracción orgánica (grasa), aislada por la extracción Soxhlet, se procedió a realizar separación y un análisis cualitativo de los FAME. El resultado evidenció la presencia de ocho ácidos grasos, a saber: linoléico, capróico, pentadecanóico, *cis*-10-heptadecenóico, esteárico, araquídico, eicosenóico y heneicosanóico, (Véase **Anexo D**).

4. CONCLUSIONES

- Se implementó una metodología por cromatografía de gases, que permitió cuantificar el hexanal como derivado hidrazónico, producto final de la oxidación de una matriz modelo (aceite de girasol) y una muestra de polvos compactos, *in-line*, empleando la técnica de su derivación directa sobre la fibra SPME, con pentaflúorfenilhidracina (PFPH).

- Se determinó el grado de protección de aceite de girasol y polvos compactos, usando los extractos, aceites y mezclas aislados de romero, jengibre y orégano de monte, contra la peroxidación lipídica inducida por radiación UV. Se evaluó el sistema lipídico modelo empleado, usando antioxidantes de referencia, vitamina E y BHT.

- Para el sistema lipídico modelo, se determinó el grado de protección contra la peroxidación lipídica a una concentración de 0.5% de tres aceites esenciales y sus respectivos extractos, aislados de romero, jengibre y orégano de monte. Se pudo determinar que la mezcla de los AE de orégano de monte y romero mostró la mayor capacidad antioxidante reportada en cuanto al porcentaje de su grado de protección, con un 54%; así como también, la mezcla de extractos de romero y jengibre, con un porcentaje de grado de protección del 62% en el sistema lipídico modelo, superó el grado de protección de los antioxidantes de referencia BHT (36%) y vitamina E (52%).

- Se obtuvo un alto grado de protección por parte del AE de orégano de monte (65%) y para la mezcla de extractos de orégano de monte y jengibre (62%), que fue mayor que el obtenido para el antioxidante sintético BHT (52%) en los polvos compactos. Lo anterior permite, utilizar y proponer tanto al AE de *L. origanoides* H.B.K., como a la mezcla de estos extractos (ELOJE) como potenciales antioxidantes naturales en matrices cosméticas.

- En todos los ensayos, se logró cuantificar, con una buena reproducibilidad, el grado de protección de aceites, extractos y sus mezclas, cuantificando con el detector de captura de electrones el hexanal en forma de su derivado hidrazónico.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar otro tipo de ensayos de actividad antioxidante en los polvos compactos, tales como la degración oxidativa mediante iones Fe (II), degradación térmica, determinación del contenido fenólico, $DPPH^{\bullet}$ y $ABTS^{+\bullet}$, entre otros. Con el fin de comparar los resultados obtenidos en el presente trabajo y determinar cuál de estos ensayos proporciona los mejores grados de protección usando las especies vegetales estudiadas u otras más, que se pueden cultivar en la región de Santander.

- Validar este método en *polvos sueltos,* teniendo como referencia los resultados obtenidos del grado de protección que presentaron los AE y extractos frente a la peroxidación lipídica inducida por radiación UV en los polvos compactos *in-line*.

- Comparar la AA de las mezclas entre extractos y AE, dado que en esta investigación sólo se evaluaron mezclas del mismo tipo y dieron resultados favorables en cuanto a la inhibición de la peroxidación lipídica y la preservación del producto mismo.

- Evaluar la metodología establecida en otras matrices de uso cosmético y comparar los resultados con los obtenidos en esta investigación, de esta manera, será posible, a futuro, establecer una base de datos para el Laboratorio de Cromatografía del grupo de investigación CIBIMOL, la cual servirá de referencia para nuevos estudios.

BIBLIOGRAFÍA

ADAMS, R. Identification of essential oil components by gas chromatography /quadrupole mass spectroscopy. *Allured Publishing Corporation*, Carol Stream, Illinois, **2004**, 456.

AHMED, S., Antioxidant properties of water extracts for the iraqi plants *Phoenix dactylifera, Loranthus europeas, Zingiber officinale,* and *Citrus aurantifolia*. *Modern Applied Science*. **2009**, 3, 3-5.

AKOH, C., MIN, D., (Ed) Food Lipids Chemistry, Nutrition, and Biotechnology, Chapter 15: Antioxidants. Second Edition. Marcel Deeker Inc*.,* New York, **2002**, 507-528.

ARCILA-LOZANO, C.; C., LOARCA-PINA, G.; LECONA-URIBE, S. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. **2004**, 54, 100-111.

BABOVIC, N.; DJILAS, S.; JADRANIN, M.; VAJS, V.; IVANOVIC, J.; PETROVIC, S.; ZIZOVIC, I. Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant fractions from selected lamiaceae herbs and their antioxidant capacity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.***2010**, 11, 98-107.

BANDONI, A (Ed). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata., La Plata, Argentina. **2000**, 29-43, 94-96, 149-171, 197-232.

BARATTA, T.M.; DORMAN, H.J.; DEANS, S.; FIGUEIREDO, C.; BARROSO, J.; RUBERTO, G. Antimicrobial and antioxidant properties of some comercial essential oils. *Flavour Fragrance Journal*. **1998**, 13, 235-244.

BIOCOMERCIO SOSTENIBLE. Estudio de Mercado Nacional de aceites esenciales. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt, Bogotá, Colombia. **2003**, 109-111.

BRACCO, U., Cosmetic compositions containing fatty acid triglyceride mixtures, United States Patent Number 5.445.822, Aug. 29, **1995**.

CASTAÑEDA, M., Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de 10 plantas aromáticas colombianas. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias. Universidad Industrial de Santander. **2007**.

CELIS, C. Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia origanoides* H.B.K. y *Phyla (Lippia) dulcis*, especies de la familia *Verbenaceae.* Tesis de Grado. Facultad de Ciencias. Universidad Industrial de Santander. **2007**.

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**.

CHEN Q.; SHI, H.; HO, C-T. Effects of rosemary extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxygenase activity. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **1992**, 69, 10-12.

CODINA, A. Cosmética para las agresiones ambientales urbanas. Ámbito Farmacéutico. *Revista Dermografía*. **2002**, 21, 3-5.

CONTRERAS, N.; MARTÍNEZ, J.R.; STASHENKO, E. Determinación de la actividad antioxidante *in vitro* de los aceites volátiles de cuatro plantas de uso tradicional mediante la medición de la peroxidación lipídica de aceite. *Scientia et Technica*. **2006**, 30, 415- 419.

DEON, M. Historia de la cosmética natural. (Buenos Aires, Argentina). Revista crecimiento interior. **2006**, 94, 2. Disponible en internet: http://www.deon.com.ar/94cosmetica.html. *Fecha de consulta*: marzo 10 de 2009.

Dinámica del Comercio Exterior, Colombia-Venezuela-Ecuador. 2004-2007. DANE, (Bogotá, D.C). **2008**, 2. *Fecha de consulta*: marzo 4 de 2008.

DOMÍNGUEZ, J.; MUÑÓZ, D. Dermatitis de contacto por cosméticos. Capítulo 11. **2009**, 257-270.

DOS SANTOS, F. LOPES, A., CITO, A. Composition and Biological Activity of Essencial Oils from *Lippia origanoides* H.B.K., *Journal Essential. Oil Research*. **2004**, 16, 504-506.

ERKAN, N.; AYRANCI, G.; AYRANCI, E. Antioxidant activities of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L..) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry.***2008**, 110, 76-86.

ESQUIVEL, A.; VARGAS, P. Uso de aceites esenciales extraídos por medio de fluidos supercriticos para la elaboración de alimentos funcionales. *Tecnología en Marcha.***2007**, 20-4; 41-50.

FERHAT, M.; MEKLATI, B.Y.; SMADJA, J.; CHEMAT, F. An improved microwave Clevenger apparatus for destilation of essential oils from orange peel, *Journal of Chromatography A*. **2006**, 1112, 121-126.

FERREIRA, M. Desarrollo y validación de un método para el análisis cuantitativo de compuestos carbonílicos, productos finales de degradación oxidativa de lípidos. Tesis de grado. Facultad de Ciencias. Universidad Industrial de Santander. **1997**.

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

FUNDACION EXPORTAR. Análisis de la tendencia del Mercado internacional de aceites esenciales. Secretaria de Comercio y Relaciones Económicas Internacionales. (Argentina), **2002**.

HAMMER, K., CARSON C. y RILEY. T. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*. **1999**, 86, 985–990.

HONEYMAN, J., Alergia a cosméticos, *Piel-lLatinoamericana.***2007,** 182. Disponible en internet: Fecha de consulta: septiembre 10 de 2010. http://piel-l.org/blog/wp-content/uploads/2007/12/182/cosmeticos-inmunologia-latino-americana.pdf.

HOSHIKA, Y.; MUTO, G. Sensitive Gas Chromatographic Determination of Lower Aliphatic Carboniyl Compounds as their Pentafluorophenylhidrazones, *Journalof Chromatography A*, **1978**, 152, 224-227.

IBAÑEZ, E., OCA, A., DE MURGA, G., LOPEZ, S., TABERA, J., REGLERO, G. Supercritical Fluid Extraction and fractionation of DIfferent Preprocessed Rosemary Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.***1999**, 47, 1400-1404.

IVANOVIC, J., DILAS, S., JADRANIN, M., VAJS, V., BABOVIC, N., PETROVIC, S., ZIZOVIC, I. Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from rosemary and sage, *Journal of the Serbian Chemical Society*. **2009**, 74, 717-732.

KAPOOR, I.P.S., SINGH, B., SINGH, G., ISIDOROV, V, SZCZEPANIAK, L. Chemistry, antifungal and antioxidant activities of cardamom (Amomum subulatum) essential oil and oleoresins. *InternationalJournal of Essential Oil Therapeutics* 2. **2008**, 1, 29-40.

KHAIAT, A. Botanical extracts in Cosmeceuticals - Drugs vs. Cosmetics. Eisner P. Maibach HI (eds.), Marcel Dekker, (New York), **2000**, 97-106.

KOLAKOWSKA, A., ZDZISŁAW E. Lipid Oxidation in Food Systems, *Chemical and functional properties of food lipids. CRC Press,* **2003**.

KURECHI, T.; KATO, T. Studies on Antioxidants: XI. Oxidation Products of Concomitantly Used Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene, *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **1980**, 57, 220-223.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research.***2007**, 46, 244-282.

LALL, R.; PROCTOR, A.; JAIN, V. A Rapid, Micro FAME Preparation Method for Vegetable Oil, Fatty Acid Analysis by Gas Chromatography. *Journal of American Oil Chemistry Society*. **2009**, 86, 309–314.

LEE, M.; LIN C-Y.; LI, Z-G.; TSAI, T-F. Simultaneous analysis of antioxidants and presenvatives in cosmetics by supercritical fluid extraction combined with liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.*, **2006**, 1120, 244-251.

LEYVA, M. A.; FERRADA, P. J.; MARTINEZ, J. R.; STASHENKO, E. Rendimiento y composición química del aceite esencial de *Zingiber officinale* en función del diámetro de partícula. *Scientia et Technica.***2007**, 33, 225-226.

LUPO, M., Antioxidants and vitamins in Cosmetics. *Clinics in Dermatology*. **2001**, 19, 467-473.

LUCCHESI, M.; CHEMAT, F.; SMADJA, J. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *Journal of Chromatography A*. **2004**, 1043, 323-327.

MARTINEZ, A. Aceites Esenciales. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Medellín **2003**.

MARTINI, M.; CHIVOT, M.; PEYREFITTE, G. Dermocosmética y estética. Cosmétología. Masson S.A., Barcelona, España., **1997**, 3, 47-76.

MÉNDEZ, R., SERRANO, J., CHATAING, B., JIMENEZ, D., MORA, D., ROJAS, L., USUBILLAGA, A., O'CALLAGHAN, J. Estudio Comparativo de la Actividad biológica del aceite esencial *Protium heptaphyllum (Aubl.)* Marchy y el aceite esencial de *Lippia origanoides* H.B.K.*,* sobre tres especies de *Nocardia sp*. Salud y desarrollo Social, Caracas, **2007**, 2, 49-52.

MINOTTI, G.; AUST, S. Redox cycling of iron and lipid peroxidation, *Lipids*, **1992**, 27, 219-225.

MOURE, A.; CRUZ, J.; FRANCO, D.; DOMINGUEZ, J.; SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H., NÚÑEZ, M., PARAJÓ, J., *Natural antioxidants from residual sources.* Review, *Food Chemistry.* **2001**. 72, 145-171.

NAKATANI, N., Phenolic antioxidants from herbs and spices, Mini-review, *BioFactors***2000**, 13, 141-146.

NOGALA-KALUCKA, M.; KORCZAK, J.; DRATWIA, M.; LAMPART-SZCZAPA, E.; SIGER, A.; BUXHOWSKI, M. Changes in antioxidant activity and free radical scavenging potential of Rosemary extract and tocoferons in isolated rapeseed oil triacylglycerols durin accelerated test. *Food Chemistry*, **2005**, 93, 227-235.

OBOH, G., AKINYEMIA, A., ADEMILUYI, A. Antioxidant and inhibitory effect of red ginger (*Zingiber offcinale* var. Rubra) and White ginger (*Zingiber offcinale* Roscoe) on Fe^{2+}. induced lipid peroxidation in rat brain in vitro. *Experimental and Toxicologic Pathology.* **2010**, 10,1016.

OFFORD, E. Rosemary, *Nestle Research Center, Taylor and Francis Group,* **2004**.

OLIVEIRA, D.; LEITAO, G.; BIZZO, H. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K., *Food Chemistry.***2007**, 101: 236-240.

PACKER, L., TRABER, M., KRAEMER, K., FREI, B., (Eds). The antioxidant vitamins C and E. Chapter 9: Vitamin E: An Introduction. *American Oil Chemists Society.* **2002**, 133-142.

PUERTAS, M. Desarrollo de un método analítico para la determinación de compuestos carbonílicos volátiles y la evaluación *in-vítro* de algunos productos

naturales y sintéticos, Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. Universidad Industrial de Santander. **2002**.

PRAKASH, O., et al. Interactions of herbal extract combinations against free radical scavenging activity. *Pharmaceutical Biology*. **2009**, 47,729-733.

PRIOR, R.; CAO, G. In vivo total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods. *Free Radical biology & Medicine*. **1999**, 27, 1173-1181.

PUENGPHIAN, C.; SIRICHOTE, A. 6-gingerol content and bioactive properties of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe*)* extracts from supercritical CO_2 extraction. *Asian Journal of Food and AgroIndustry.* **2008**, 1, 29-36.

REMADEVI, R, SUNDENDRAN, E., RAVINDRAN, P. N., Properties and medicinal uses of ginger. In: Ginger: the genus Zingiber (Eds), Ravindran P N and Nirmal Babu K, Medicinal and aromatic plants-industrial profiles, CRC Press, Washington, **2005**, 41, 489-508.

REYES, J.; PATIÑO, G.; MARTÍNEZ, J.R.; STASHENKO, E. Caracterización de los metabolitos secundarios de dos especies de *ocium* (Fam. *Labiatae*), en función del método de extracción. *Scientia et Technica*. **2007**, 33: 121-123.

ROATTA, C. Nuevo antioxidante de romero para conservar cosméticos, alimentos y bebidas. NOTICyT No. 9. Domingo, 30 julio 2006. Disponible en internet: http://www.universia.net.co - Universia Colombia. *Fecha de consulta:* mayo 3 de 2010.

RODRÍGUEZ, O.; MORALES, A.; PIZARRO, G.; ZERLOTTI, A.; ROSA, P. Evaluation of the antioxidant potential of plants extracts obtained by supercritical fluid extraction. *Quim. Nova*. **2008**, 31, 1699-1705.

RUÍZ, C. Estudio de los metabolitos secundarios volátiles de *Lippia origanoides* H.B.K., en tres estados fenológicos. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias. Universidad Industrial de Santander. **2008**.

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

SCHNEIDER, S. Definición de Cosmecéuticos Vs. Nutricosméticos. Julio 28 de 2009. Disponible en internet: http://cosmeceutica.blogspot.com /2009_07_01_archive.html. Fecha de consulta: septiembre 16 de 2010.

SIES H. Oxidative Stress. *Elsevier Science & Technology Books.* London, Academic Press*.* **1985**,1-8.

SEBRANEK, J. G.; SEWALT, V.; ROBBINS, K.; HOUSER, T., Comparison of natural Rosemary extract abd BHA/BHT fot relative antioxidant effectiveness in pork sausage. *Meat Science*. **2005**, 69, 289-296.

SILVA, D.; MEIRELES, M.; BRAT, P.; MAGALHÃES, P.M.; MENUT, C. Chemical composition and biological activity of natural extracts obtained from a Brazilian aromatic plant *(Aloysia gratissima*) by supercritical CO_2 and hydrodistillation. International *Journal of Essential Oil Therapeutics*. **2007**, 4, 172-178.

SINGH, G.; KAPOOR, I.P.S.; SINGH, P.; HELAUNI, C.; LAMPASONA, M.; CATALAN, C. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. *Food and Chemical Toxicology*. **2008**, 46, 3295–3302.

SINGH, G., KIRAN, S., MARIMUTHU, P., DE LAMPASONA, M., DE HELUANI, C., CATALÁN, C. Chemistry biocidal and antioxidant activities of essential oil and oleoresins from *Piper cubeba* (seed). International *Journal of Essential Oil Therapeutics.***2008**, 2, 50-59.

SINGH, G.; MAURYA, S.; CATALAN, C.; DE LAMPASONA, M. Studies on essential oils, Part 42: chemical, antifungal, antioxidant and sprout suppressant studies on ginger essential oil and its oleoresin. *Flavour and Fragrance Journal.***2005**, 20,1-6.

STASHENKO, E. Estudio prospectivo de aceites esenciales Colombianos de interés industrial. Conferencia. Segundo seminario internacional de plantas medicinales y aromáticas y foro sobre mercado. Palmira. Universidad Nacional de Colombia. Septiembre.16 y 17 de **2006**.

STASHENKO, E.; FERREIRA M.C.; SEQUEDA L.G.; MARTÍNEZ J.R.; WONG J.W. Comparison of extraction methods and GC-ECD and GC-MSD-SIM techniques for the determination of volatile carbonyl compounds. *Journal of Chromatography A*. **1997**, 779: 360.

STASHENKO, E.; ACOSTA R.; MARTINEZ, J.R. High-resolution gas chromatographic analysis of the secondary metabolites abtained by subcritical-fluid extraction from Colombian rue (Ruta graveolens L.). *Journal of Biochemical and Biophysic Methods*. **2000**, 24, 379-300.

STASHENKO, E.; PUERTAS, M.A.; SALGAR W.; DELGADO, W.; MARTÍNEZ, J.R. Solid-phase microextraction with on-fibre derivatisation applied to the analysis of volatile carbonyl compounds. *Journal of Chromatography A*. **2000**, 886, 175-181.

STASHENKO, E.; PUERTAS, M.A.; MARTÍNEZ, J.R. SPME determination of volatile aldehydes for evaluation of in-vitro antioxidant activity. *Journal ofAnalytical and Bioanalytical Chemistry*. **2002**, 373, 70-74.

STASHENKO, E.; JARAMILLO, B.E; y MARTÍNEZ, J.R. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia *Verbenaceae*. *Revista Academia Colombiana de Ciencias*. **2003**, 27, 579-597.

STASHENKO, E.; JARAMILLO, B.E; y MARTÍNEZ, J.R. 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. *Journal of Chromatography A*. **2004**, 1025, 93-103.

SUHAJ, M., HORVÁTHOVÁ, J., Changes in antioxidant activity induced by irradiation of clove *(Syzygium aromaticum)* and ginger (*Zingiber officinale). Journal of Food and Nutrition Research.* **2007**, 46, 112-122.

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**.

TAMURA, H., YAMAGAMI, A., Antioxidative Activity of Monoacylated Anthocyanins Isolted from Muscat Bailey A Grape. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.***1994**, 42, 1612-1615.

TERPINIC, P., BEZJAK, M., ABRAMOVIC, H., A kinetic model evaluation of the antioxidant activity of several Rosemary extracts. *Food ChemIstry.,***2009**, 115, 740-744.

THIELE, J., DREHER, F., PACKER, L., Antioxidant Defense Systems in Skin, Marcel Dekker, Inc.New York.**2000,** 145-188.

TSAI, T-F., LEE, M-R., Determinations of antioxidants and preservatives in cosmetics by SPME Combines with GC-MS. *Chromatographia*.**2008**, 67, 425-431.

VÁSQUEZ, O., ALVA, A., MARREROS, J., Extracción y caracterización del aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinale*). *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria*. **2001**, 1, 38-42.

VERNIN, G., PARKANYI, C., Chemistry of Ginger. Spices, Herbs and edible fungi, *CRC Press*. New York. **2005**,87-180.

WANG, W., WU, N., ZU, Y., FU, Y., Antioxidative activity of Rosmarinus officinalis L. essential oil compared to its main components. *Food Chemistry***2008**, 108, 1019-1022.

WILKISON, J.B., MOORE, R.J., Cosmetología de Harry. Editorial DÍaz Do Santos. Madrid, España. **1990**, 319-334.

YASUHARA, A., SHIBAMOTO. T., Determination of Volatile Aliphatics, Aldehyde in the Headspace of Heated Food Oils by Derivatization with 2-aminoethanetiol, *J. Chromatography A.,* **1991**, 547, 291-298.

ANEXOS

Anexo A. Principales resultados encontrados sobre la actividad científica en el campo del estudio de la actividad antioxidante y uso en cosméticos, en las bases de datos Scopus y Web of Science.. *Fecha debúsqueda: Febrero 20 y abril 16 de 2010.*

Scopus			
Ecuación de búsqueda	***Zingiber officinale* AND Antioxidant activity**	***Rosmarinus officinalis* L. AND Antioxidant activity**	***Lippia origanoides* H.B.K.**
No. Total de Artículos	**28**	**280**	**13**
3 años con mayor cantidad de publicaciones	2006 (5),	2009 (30)	2010 (1)
	2005 (5),	2008 (32)	2009 (4)
	2003 (5)	2007 (36)	2008 (2)
3 Autores con mayor número de publicaciones	Amit, A. (3),	Reglero, G. (8)	Stashenko, E.E. (3)
	Bagchi, D. (3),	Ibanez, E. (7)	Martinez, J.R. (2)
	Bagchi, M. (3)	Ho, C.T. (7)	Monroy, J. (1)
3 revistas con mayor número de publicaciones	*Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition (3)*	*Food Chemistry (33)*	*Interciencia (3)*
	Annals of the New York Academy of Sciences (2)	*Journal of Agricultural and Food Chemistry (28)*	*Acta Biologica Colombiana (1)*
	Toxicology Mechanisms and Methods (2)	*Journal of Food Science (9)*	*Acta Horticulturae (1)*
3 Áreas de mayor investigación	*Agricultural and Biological Sciences (15)*	*Agricultural and Biological Sciences (178)*	*Agricultural and Biological Sciences (5)*
	Pharmacology, Toxicology and Pharmaceutics (11)	*Chemistry (84)*	*Chemistry (3)*
	Medicine (9)	*Biochemistry, Genetics and Molecular Biology (52)*	*Multidisciplinary (3)*
No. Total de patentes	**173**	**326**	**21**
Oficinas con	*US Patent Office (113)*	*US Patent Office (189)*	*US Patent Office (13)*

patentes	*World Intellectual Property Organization (WIPO) (53)*	*(WIPO) (106)*	*(WIPO) (5)*
Isi web of knowledge (Web of science)			
Ecuación de búsqueda	***Zingiber officinale AND Antioxidant activity***	***Rosmarinus officinalis* L. AND Antioxidant activity**	***Lippia origanoides* H.B.K. AND Antioxidant activity**
No. Total de Artículos	**42**	**148**	**3**
3 años con mayor cantidad de publicaciones	2007 (8),	2007 (26)	2010 (1)
	2009 (7),	2008 (24)	2009 (1)
	2010 (3)	2010 (10)	2008 (1)
3 Autores con mayor número de publicaciones	Ajith, TA (3)	Reglero, G. (10)	Stashenko, E.E. (2)
	Aswathy, MS (2)	Ibanez, E. (10)	Martinez, J.R. (2)
	De lampasona, MP (2)	Senorans, FJ (9)	da Silva NA. (1)
3 Áreas de mayor investigación	*Food science & technology (18)*	*Food science & technology (86)*	*Chemistry, medicinal (2)*
	Pharmacology & pharmacy (12)	*Chemistry, applied (55)*	*Food science & technology (2)*
	Chemistry, medicinal (7)	*Nutrition & dietetics (33)*	*Chemistry, analytical (1)*

En la siguiente tabla se observa el reporte cienciométrico empleando la base de datos *Scopus* de las tres especies vegetales bajo estudio en productos cosméticos.

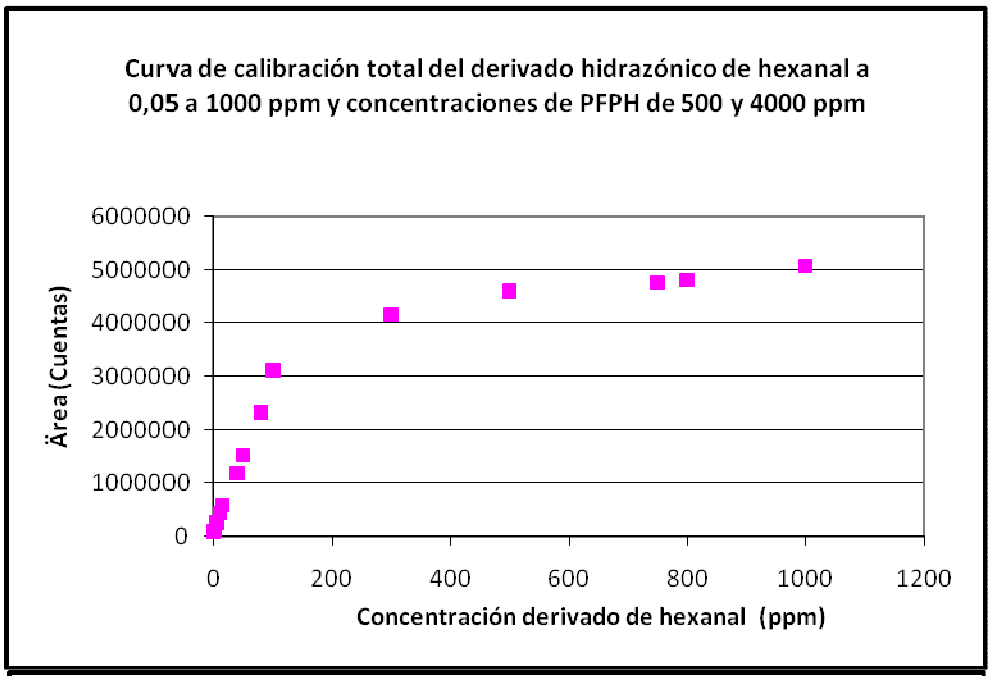
Búsqueda realizada en la base de datos Scopus relacionada con cosméticos			
Ecuación de búsqueda	***Zingiber officinale* AND Antioxidant AND cosmetic***	***Rosmarinus officinalis* L. AND Antioxidant AND cosmetic***	***Lippia origanoides* H.B.K. AND Antioxidant AND cosmetic***
No. Total de Artículos	**2**	**14**	**0**
3 años con mayor cantidad de publicaciones	2008 (1),	2008 (1)	-
	2006 (1),	2006 (4)	-
		2005 (1)	-
3 Autores con mayor número de publicaciones	Yanishlieva, M.V (1)	Catalano, C. (2)	-
	Krishnaswamy, K. (1)	Scapagnini, G. (2)	-
		Dinotta, F. (2)	-
3 Áreas de mayor investigación	*Agricultural and Biological Sciences (1)*	*Agricultural and Biological Sciences (4)*	-
	Chemistry (1)	*Medicine (4)*	-
	Medicine (1)	*Biochemistry, Genetics and Molecular Biology (3)*	-

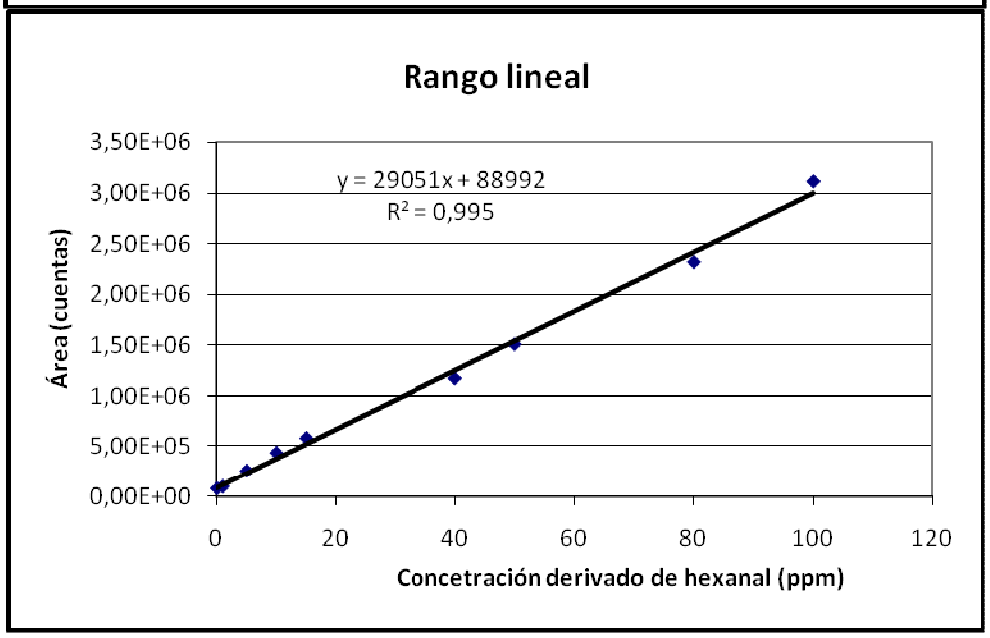
Anexo B. Composición química de los polvos compactos "in-line" suministrados por la empresa cosmética, Laboratorios M&N.

BASE DE POLVO COMPACTO

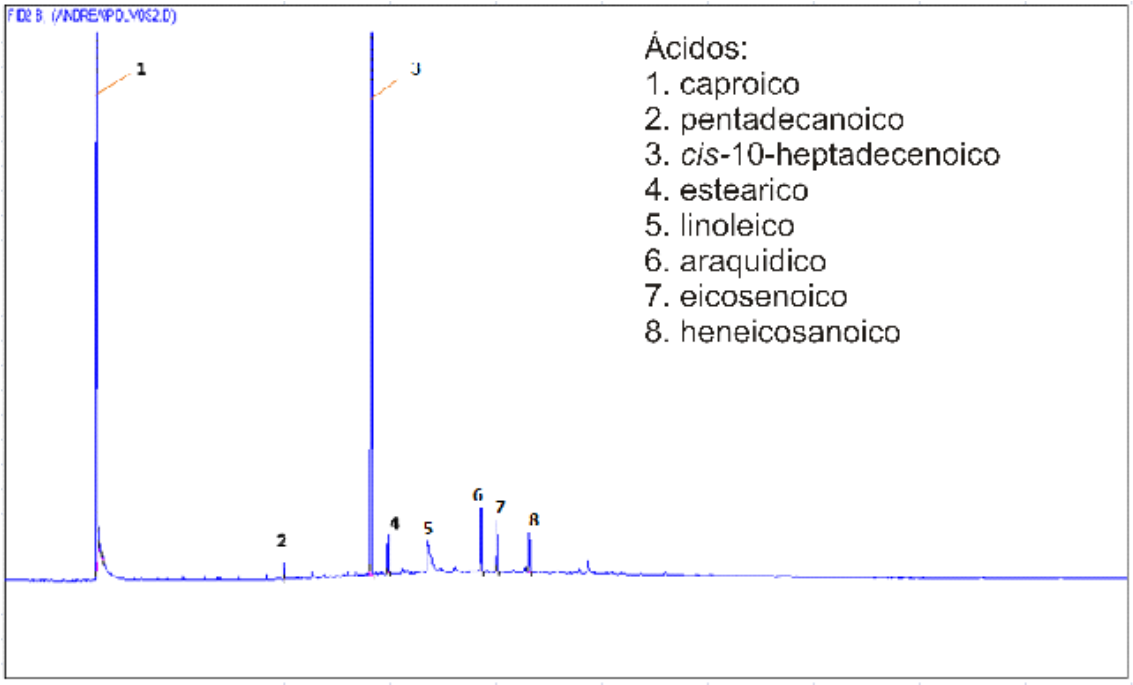
1	Talco USP	Talc	C.s.p. 100%
2	ALMIDON DE MAIZ	Zea Mays (Corn) Starch	c.s.
3	Dry Flo PC	Aluminum Starch Octenylsuccinate	c.s.
4	ORYZA SATIVA STARCH	Oryza Sativa (Rice) Starch	10
5	Caolin Coloidal USP	Kaolin	c.s.
6	ESTEARATO DE MAGNESIO	Magnesium Stearate	c.s.
7	Dióxido de Titanio Pantalla Solar	Titanium Dioxide (and) Alumina (and) Simethicone	2
8	Aceite Mineral	Mineral Oil	c.s.
9	Palmitato de Isopropilo	Isopropyl Palmitate	c.s.
10	Lanolina	Lanolin	c.s.
11	Acido Borico	Boric Acid	c.s.
12	Acetulan	Cetyl Acetate (and) Acetylated Lanolin Alcohol	c.s.
13	LANOGENE (LANTROL-LIPOLAN R) - FLUILAN	Lanolin Oil	c.s.
14	VITAMINA F	Linoleic Acid (and) Linolenic Acid	0,16
15	Propil Parabeno	Propylparaben	0,14
16	Metil Parabeno	Methylparaben	0,1
17	Octilmetoxicinamato	Ethylhexyl Methoxycinnamate	0,04
18	VITAMINA E	Tocopheryl Acetate	0,008
19	OXIDO DE HIERRO ROJO (ROUGE) C338075	CI 77491	c.s.
20	OXIDO DE HIERRO CAFÉ	CI 77491 / CI 77492 / CI 77499	c.s.
21	OXIDO DE HIERRO AMARILLO	CI 77492	c.s.
22	OXIDO DE HIERRO NEGRO	CI 77499	c.s.
23	Dioxido de titanio anatase	CI 77891	c.s.
24	MICA 1001	Mica (and) Titanium Dioxide	c.s.

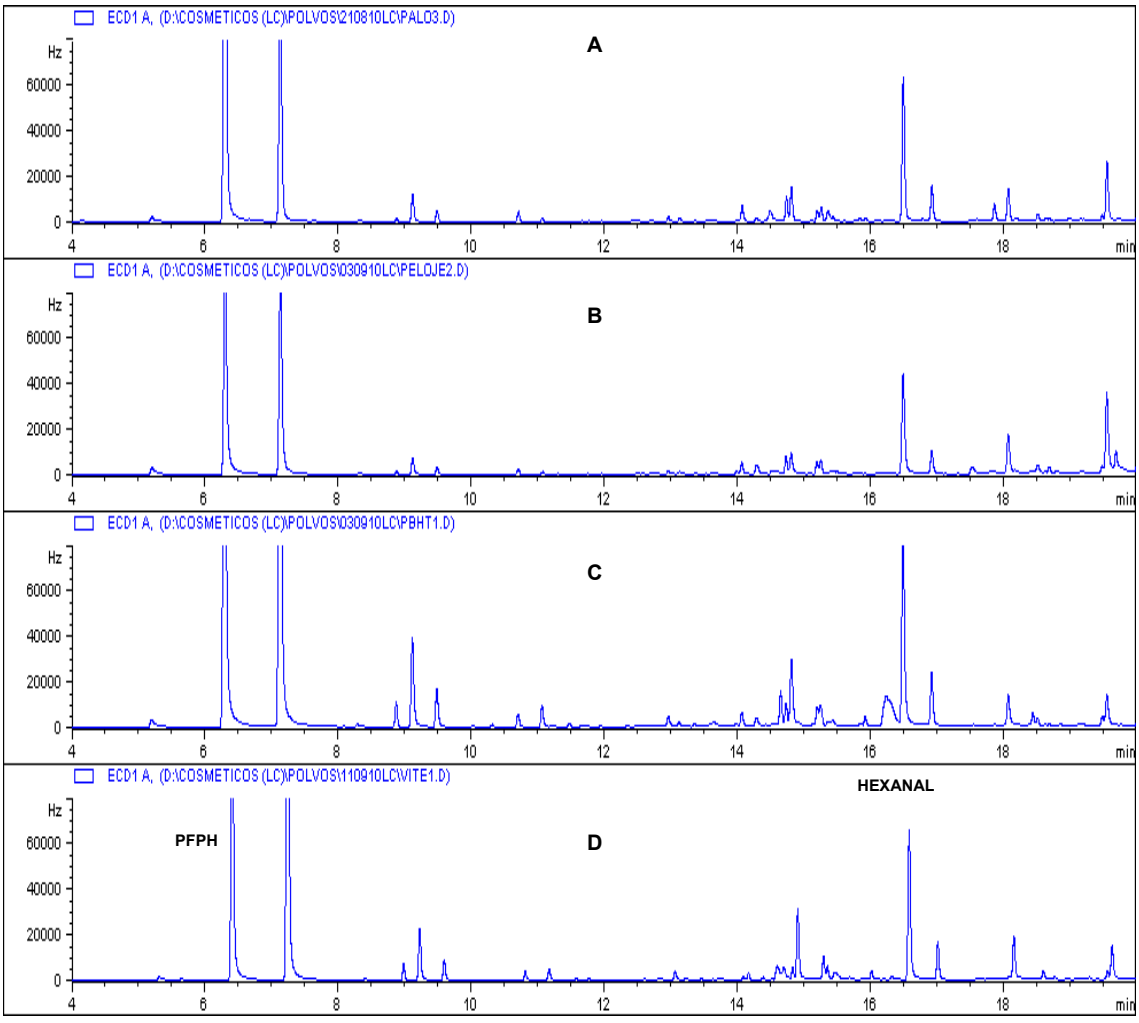
ANEXO C. Grafico de la curva de calibración del hexanal a diferentes concentraciones en rango bajo y rango alto y gráfico del rango dinámico lineal de trabajo de 0,5 a 100 ppm.





ANEXO D. Perfil cromatográfico de los ésteres metílicos identificados con el patrón de referencia usado por el método FAME.



Perfil cromatográfico del extracto *Soxhlet* de la muestra de polvos compactos. Columna DB-23 [50%-cianopropil-poli(metilsiloxano), 60 m x 0.25 mm x 0.25 µm]. La inyección se realiza en modo *split* (50:1) (V_{iny}: 1 µL).

ANEXO E. Perfiles cromatográficos del derivado hexanal-PFPH de las muestras promisorias de AE, extractos y patrones de referencia sometidos a PL en polvos compactos. A: AE de *L. origanoides.* B: Mezcla extractos de *L. origanoides.* y *Z. officinale*. C: Patron de referencia, BHT. D: Patron de referencia, vitamina E.