

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE
(ANTIRRADICALARIA) DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS DE
ORÉGANO DE MONTE (*Lippia origanoides*) Y PRONTO ALIVIO (*Lippia alba*)
EN UN DESODORANTE EN GEL**

HÉCTOR JOAQUÍN OROZCO MONROY

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

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE
(ANTIRRADICALARIA) DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS DE
ORÉGANO DE MONTE (*Lippia origanoides*) Y PRONTO ALIVIO (*Lippia alba*)
EN UN DESODORANTE EN GEL**

Autor:

HÉCTOR JOAQUÍN OROZCO MONROY

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL
TÍTULO DE QUÍMICO**

Directores

ELENA E. STASHENKO, Química, Ph.D.

JAIRO RENÉ MARTÍNEZ, Químico, Ph.D.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2011

DEDICATORIA

A tres de las razones más importantes de mi vida,

con quienes sueño un futuro.

Héctor Orozco, Pilar Monroy y Linda Orozco, mis papás y mi hermana.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres que fueron un constante apoyo, quienes con motivación y empeño estuvieron en los momentos más aciagos y, que, ante las circunstancias más desafiantes y emocionantes de la vida, han estado a mi lado.

A la Dra. Elena E. Stashenko, a quién aprecio como persona y profesional, GRACIAS, porque me enseñó más, de lo que pude haber aprendido en la carrera, ya que me orientó por los caminos del cuestionamiento, de la reflexión y la disciplina; de la ciencia y la literatura.

Al Dr. Jairo R. Martínez, quien me guió por los caminos de la estadística, y que con su ayuda me colaboró en las partes más dudosas del manejo de los datos del proyecto.

Al Laboratorio de Cromatografía, adscrito al Centro de Investigación de Biomoléculas, CIBIMOL, que suministró el soporte financiero para la realización del proyecto y a los Laboratorios M&N por la capacitación, la base cosmética y toda la ayuda extra prestada.

A los estudiantes de doctorado William Salgar y Deyanira Caballero, por su ayuda y su disposición a transmitir sus saberes de la forma más desinteresada.

Al profesor Vladimir Kouznetsov, que siempre me motiva a avanzar por los senderos de la química de los productos naturales y el perfeccionamiento del saber. Y finalmente a “Alejita” por haberme acompañado y comprendido de manera sorprendente en estos 3 años, en momentos fundamentales, a Jorge Gaitan, Jhon B., Andrés V., Lenguerke y Martha M, por su incondicional amistad.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN

1	ANTECEDENTES	25
1.1	CONTEXTO GENERAL	25
1.1.1	Publicaciones de artículos	27
1.1.2	Publicaciones de patentes	29
1.2	MARCO TEÓRICO	33
1.2.1	Definición de productos cosméticos	33
1.2.2	Definición de desodorante	33
1.2.3	Composición típica de los desodorantes	33
1.2.4	Microorganismos en productos naturales	34
1.2.5	Antioxidantes	35
1.2.6	Actividad antibacteriana y antioxidante de plantas	40
1.2.7	Plantas con propiedades antibacterianas y antioxidantes	41
1.2.8	Quimiotipos.	41
1.2.9	<i>Lippia alba.</i>	42
1.2.10	<i>Lippia origanoides.</i>	44
1.2.11	Técnicas de extracción.	45
2	PARTE EXPERIMENTAL	48
2.1	REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS MENORES	48
2.1.1	Reactivos y solventes.	48
2.1.2	Materiales.	48
2.1.3	Material de vidrio.	48
2.1.4	Gases especiales	48
2.1.5	Equipos menores e instrumentos analíticos.	48
2.2	RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	50
2.3	PROCEDIMIENTOS DE DESTILACIÓN Y EXTRACCION	51
2.3.1	Obtención de los aceites esenciales por el método MWHD.	51
2.3.2	Obtención de extractos por el método SFE (CO₂).	52
2.4	ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	54

2.4.1	Preparación de muestras para el análisis por GC-MS.	54
2.4.2	Análisis de las muestras por GC-MS.	54
2.4.3	Cromatografía de gases en columnas con fase estacionaria apolar.	54
2.4.4	Cromatografía de gases en columnas con fase estacionaria polar.	54
2.4.5	Identificación de componentes.	54
2.5	CURVA DE CALIBRACIÓN DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS.	55
2.5.1	Selección de recubrimiento de la fibra para SPME.	56
2.5.2	Selección de disolventes.	56
2.5.3	Preparación de la hidrazona	56
2.5.4	Estudio de repetitividad, niveles mínimos de cuantificación y detección.	57
2.6	PROCEDIMIENTO PARA LA OXIDACIÓN DE LA BASE COSMÉTICA	58
2.6.1	Blanco.	58
2.6.2	Muestra con BHT, vitamina E, AE o extracto (A _a).	59
2.6.3	Derivatización del hexanal sobre la fibra y extracción simultánea por HS-SPME.	60
2.6.4	Determinación de la actividad antioxidante.	61
3	ANÁLISIS DE RESULTADOS	64
3.1	PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN	64
3.2	ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	64
3.2.1	Análisis de la composición química de los aceites esenciales.	64
3.2.2	Análisis de la composición química de los extractos SFE-CO ₂	65
3.2.3	Selección del recubrimiento de la fibra y determinación de tiempos de equilibrio.	68
3.2.4	Determinación del solvente.	68
3.2.5	Curva de calibración	69
3.2.6	Determinación de las figuras de mérito.	72
3.3	OXIDACIÓN DE LA BASE COSMÉTICA INDUCIDA POR	

	IONES Fe²⁺	74
3.3.1	Pruebas previas	74
3.3.2	Implementación de la metodología en las muestras de desodorante	73
4	CONCLUSIONES	83
5	RECOMENDACIONES	85
6	BIBLIOGRAFÍA	86
7	ANEXOS	93

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Análisis cuantitativo de número de artículos, por año, usando la Base de datos *Scopus*. Número de artículos: 389. Periodo de observación: 1997-2010. Fecha de consulta: 5/06/2010. Ecuación de búsqueda: *TITLE ABS KEY (essential oil in cosmetics, AE)* y *TITLE-ABS-KEY (plant extract in cosmetics, E)*. **28**
- Figura 2.** Búsqueda por áreas. Análisis cuantitativo. Base de Datos: *Scopus*. Número de artículos: 389. Periodo de observación 1997-2010. Fecha de consulta: 4/06/2010. Ecuación de búsqueda *TITLE ABS KEY (essential oil in deodorants)* y *TITLE-ABS-KEY (plant extract in deodorants)*. **28**
- Figura 3.** Búsqueda de patentes. Análisis cuantitativo. Base de Datos: *Scopus*. Número de patentes: 1822. Periodo de observación: 1997-2010. Fecha de consulta: 4/06/2010. Ecuaciones de búsqueda: *TITLE ABS KEY (Lippia origanoides in deodorants)*, *TITLE-ABS-KEY (Lippia alba in cosmetics)*, *TITLE ABS KEY (Lippia alba in deodorants)*, *TITLE ABS KEY (antibacterial deodorant)*, *TITLE ABS KEY (antibacterial deodorant essential oil)*. **29**
- Figura 4.** Análisis cuantitativo. Búsqueda de patentes. Base de Datos *Scopus*. Número de patentes: 89. Periodo de observación: 1997-2010. Fecha de consulta: 4/06/2010. Ecuaciones de búsqueda: *TITLE ABS KEY (Carvone antioxidant deodorant)*, *TITLE ABS KEY (Carvacrol antioxidant deodorant)*, *TITLE ABS KEY (Thyme antioxidant deodorant)*. **30**

Figura 5. Reacción de oxidación del ácido linoleico.	38
Figura 6. Esquema de la escisión β - del 13-hidroperóxido. Formación del hexanal.	38
Figura 7. Esquema de derivatización de aldehídos con pentaflúorfenilhidracina.	40
Figura 8. Planta de <i>Lippia alba</i> (Familia <i>Verbenaceae</i>).	42
Figura 9. Planta de <i>Lippia origanoides</i> (Familia <i>Verbenaceae</i>).	44
Figura 10. Fórmulas estructurales de: A. Timol y B. Carvacrol	45
Figura 11. Equipo de extracción con fluido supercrítico SFE 2000 (Thar Technologies, Pittsburgh, PA, EE.UU.).	52
Figura 12. Perfil cromatográfico típico del extracto de <i>L. origanoides</i> , quimiotipo timol, obtenido por GC-MS (EI, 70 eV) en la columna con fase estacionaria apolar DB-5 (60 m).	66
Figura 13. Perfil cromatográfico típico del extracto de <i>L. alba</i> , quimiotipo “carvona”, obtenido por GC-MS (EI, 70eV) en la columna con fase estacionaria apolar DB-5 (60m).	67
Figura 14. Comparación de las áreas cromatográficas (en cuentas) de la PFPH empleando 3 diferentes disolventes. Tiempo de exposición 10 min.	69
Figura 15. Intervalo de concentraciones de 100ppb a 4 ppm de la curva de calibración del hexanal, obtenida por GC- μ -ECD.	70

- Figura 16.** Intervalo de concentraciones de 4-300 ppm de la curva de calibración del hexanal, obtenida por GC- μ -ECD. 71
- Figura 17.** Intervalo de concentraciones de 2,5-25 ppm de la curva de calibración del hexanal, obtenida por GC- μ -ECD. 71
- Figura 18.** Cromatograma típico obtenido mediante GC- μ -ECD del derivado PFPH del hexanal (100 ppm) en la columna con fase estacionaria apolar HP-5 (30 m). 72
- Figura 19.** Perfil cromatográfico de la hidrazona (PFPH) del hexanal, generado en el aceite de girasol, oxidado por el reactivo tipo Fenton, sin la adición de *buffer*, obtenido por GC- μ -ECD, en la columna con fase estacionaria apolar HP-5 (30 m). 74
- Figura 20.** Cromatograma de la hidrazona (PFPH) del hexanal, generado en el aceite de girasol, oxidado por el reactivo tipo Fenton, con la adición de *buffer*; obtenido por GC- μ -ECD en la columna con fase estacionaria apolar HP-5 (30 m). 75
- Figura 21. A.** Muestra del desodorante oxidado en la presencia del reactivo Fenton, sin adición de aceites esenciales. **B.** Muestra del desodorante con adición de LOC: LAC, en proporción de 2:1. GC- μ -ECD en la columna con fase estacionaria apolar HP-5 (30 m). 78
- Figura 22. A.** Muestra de desodorante oxidado en presencia del reactivo Fenton, sin adición de aceites esenciales. **B.** Muestra de desodorante oxidado en presencia del reactivo Fenton, con adición de la mezcla de extractos de LAC: LOT, en proporción de 1:1. GC- μ -ECD en la columna con fase estacionaria apolar HP-5 (30 m). 80

- Figura 23.** Cuadro comparativo de la actividad antioxidante de aceites esenciales y extractos adicionados a la base cosmética del desodorante de manera individual y en mezclas binarias. **81**
- Figura 24.** Análisis cuantitativo. Base de Datos: *Scopus*. Período de observación: de 2001 -2007. Fecha de consulta: 27/06/2.008. Ecuación de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY (plant extract in cosmetics)*. **95**
- Figura 25.** Análisis cuantitativo. Base de datos: *Scopus*. Período de observación: de 2001 -2007. Fecha de consulta: 27/06/2.008. Ecuación de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY (essential oil in cosmetics)* **96**
- Figura 26.** Análisis cuantitativo. Base de Datos: *Scopus*. búsqueda por área. Periodo de observación: 1999-2010 Fecha de consulta: 4/06/2.010. Ecuaciones de búsqueda: *TITLE ABS KEY (essential oil in cosmetics)* y *TITLE-ABS-KEY (plant extract in cosmetics)*. **96**
- Figura 27.** Análisis cuantitativo. Base de Datos: *Scopus*. búsqueda: por área. Período de observación: 1999-2010 Fecha de consulta: 4/06/2.010. Ecuaciones de búsqueda: *TITLE ABS KEY (essential oil in deodorants)* y *TITLE-ABS-KEY (plant extract in deodorants)*. **97**
- Figura 28.** Perfil cromatográfico típico del aceite esencial de *Lippia origanoides*, quimiotipo “timol”. GC-MS en la columna con fase estacionaria apolar HP-5 (30 m). **106**

Figura 29. Perfil cromatográfico típico del aceite esencial de *Lippia origanoides*, quimiotipo “Carvacrol”. GC-MS. Columna con fase estacionaria apolar HP-5 (30 m).

107

Figura 30. Perfil cromatográfico típico del aceite esencial de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”. Mediante GC-MS. Columna apolar con fase estacionaria HP-5 (30 m).

110

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Palabras-clave para búsqueda de artículos y patentes. Periodo de observación: 1997 -2010. Fecha de consulta: 6/06/2010.	26
Tabla 2. Base de datos <i>Scifinder scholar</i> . Periodo de observación: de 1990 - 2.010. Fecha de consulta: 01/06/2.010. Ecuación de búsqueda: <i>TITLE-ABS-KEY (antibacterial deodorant) AND (essentials oils)</i>	32
Tabla 3. Formulación de desodorante en gel tipo <i>roll-on</i> .	34
Tabla 4. Compuestos volátiles generados durante la degradación de ácidos grasos insaturados.	39
Tabla 5. Quimiotipos de <i>Lippia alba</i> y su lugar de origen.	42
Tabla 6. Números de <i>voucher</i> COL de las especies estudiadas	51
Tabla 7. Cantidades adicionadas de AE, extractos, BHT y vitamina E en las bases cosméticas.	59
Tabla 8. Condiciones establecidas para la extracción con fluido supercrítico, para las especies bajo estudio.	62
Tabla 9. Rendimientos de aceites esenciales obtenidos por MWHD y extractos aislados por SFE-CO ₂ .	63
Tabla 10. Cantidad relativa (%) de los principales componentes de los aceites esenciales de <i>L. alba</i> y <i>L. organoides</i> .	62

Tabla 11. Cantidad relativa (%) de compuestos, clasificados por familias, en los aceites esenciales de <i>L. alba</i> y <i>L. origanoides</i> .	65
Tabla 12. Cantidad relativa (%) de los principales componentes del extracto obtenido por SFE-CO ₂ de <i>L. origanoides</i> , quimiotipo “timol”.	67
Tabla 13. Cantidad relativa (%) de los principales componentes del extracto obtenido por SFE-CO ₂ de <i>L. alba</i> , quimiotipo “carvona”.	68
Tabla 14. Valores de área (cuentas) y concentración (ppm) para la curva de calibración del hexanal.	70
Tabla 15. Valores estadísticos encontrados en la implementación de la metodología para determinar el hexanal, empleando GC-μ-ECD.	73
Tabla 16. Determinación de la actividad antioxidante (antirradicalaria) de los aceites esenciales y las mezclas de las especies vegetales estudiadas.	76
Tabla 17. Determinación de la actividad antioxidante (antirradicalaria) de la base cosmética con los extractos SFE-CO ₂ de las especies evaluadas.	79
Tabla 18. Análisis cuantitativo. Base de Datos: <i>Scopus</i> , Período de observación: de 2001 -2008. Fecha de consulta: 27/06/2.008. Ecuación de búsqueda: <i>TITLE-ABS-KEY (deodorant dermatitis plant extract)</i>	95
Tabla 19. Cantidad relativa (%) e identificación de los principales componentes del aceite esencial de <i>Lippia origanoides</i> , aislados por MWHD.	104

Tabla 20. Cantidad relativa (%) e identificación de los principales componentes del aceite esencial de <i>Lippia organoides</i> , aislados por MWHD.	107
Tabla 21. Cantidad relativa (%) e identificación de los principales componentes del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> , aislado por MWHD.	109
Tabla 22. Cantidades adicionadas (mg/g) de aceites esenciales de manera individual y en mezclas, al desodorante en gel.	111
Tabla 23. Cantidades adicionadas (mg/g) de extracto de manera individual y en mezclas binarias al desodorante en gel.	111

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Datos adicionales de la búsqueda cuantitativa.	94
ANEXO B. Ficha cosmética de la vitamina F	98
ANEXO C. Cromatogramas de aceites esenciales y sus extractos y cantidades adicionadas a la base cosmética.	103

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AAO	Actividad antioxidante
AE	Aceite esencial
ALH	Ácido linoleico
AP	Antioxidantes preventivos
ARC	Antioxidantes de ruptura de cadena
BHT	2,6-di- <i>ter</i> -Butil- <i>p</i> -hidroxitolueno
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales
CIBIMOL	Centro de Investigación en Biomoléculas
CV	Coeficiente de variación
CTFA	<i>Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association</i> (Asociación de productos de tocador, cosméticos y fragancias)
D.I.	Diámetro interno
f.e.	Fase estacionaria
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administración de alimentos y medicamentos)
FID	<i>Flame Ionisation Detector</i> (Detector de ionización en llama)
GC-μ-ECD	Cromatografía de gases con detector de micro-captura de electrones

HS-SPME	Microextracción en fase sólida en modo <i>Headspace</i>
INCI	<i>International Nomenclature of Cosmetic Ingredient</i> (Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos)
LAC	<i>Lippia alba</i> , quimiotipo “carvona”
LOC	<i>Lippia origanoides</i> , quimiotipo “carvacrol”
LOT	<i>Lippia origanoides</i> , quimiotipo “timol”
m/z	Relación masa-carga
MWHD	Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas
NMC	Nivel mínimo de cuantificación
NMD	Nivel mínimo de detección
NPD	<i>Nitrogen-Phosphorous Detector</i> (Detector de nitrógeno-fosforo)
PDMS/DVB	Poli(dimetilsiloxano)/divinilbenceno
PFPH	Pentaflúorfenilhidracina
PL	Peroxidación lipídica
SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i> (Extracción con fluido supercrítico)
SPME	<i>Solid-Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida)
WIPO	<i>World Intellectual Property Organization</i> (Organización Mundial de la Propiedad Intelectual)

RESUMEN

TÍTULO: ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE (ANTIRRADICALARIA) DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS DE ORÉGANO DE MONTE (*Lippia origanoides*) Y PRONTO ALIVIO (*Lippia alba*) EN UN DESODORANTE EN GEL*

Autor: Héctor Joaquín Orozco Monroy**

Palabras clave: *Quimiotipos Lippia origanoides, Lippia alba, actividad antioxidante (antirradicalaria) y, Peroxidación lipídica.*

En el presente trabajo grado se dosificaron los aceites esenciales (AE) y extractos de *Lippia alba*, quimiotipo "cavona" y *Lippia origanoides*, quimiotipos "timol" y "carvacrol", de manera individual, y en mezclas binarias AE:AE y, extracto:extracto, a un cosmético desodorante en gel (CD), tipo roll-on; con el fin de encontrar sustitutos naturales de antioxidantes sintéticos comerciales. Para esto se evaluó su actividad antioxidante (AAO), de modo indirecto monitoreando el hexanal como producto del deterioro oxidativo del ácido linoleico presente en el desodorante; para lo cual se empleó la microextracción en fase sólida en modo *head-space* (HS-SPME), y la cromatografía de gases con detector de micro-captura de electrones (GC- μ -ECD) para la medición del derivado hidrazónico obtenido por derivación del hexanal con pentafluórphenilhidracina (PFPH) y se comparó con 2,[6]-Di-ter-butyl-*p*-cresol (BHT) y la vitamina E como sustancias AAO de referencia.

Los resultados obtenidos mostraron que los AE y extractos adicionados de manera individual de ambos quimiotipos de *L. origanoides*, exhibieron una AAO (84-87%) mayor que la del BHT (75%) y cercana a la de la vitamina E (87%). Las mezclas binarias (AE:AE y extracto:extracto) presentaron un efecto aditivo en su AAO (87-92%), que superó la de los antioxidantes de referencia. Esto los convierte interesantes ingredientes cosméticos, que posteriormente podrían registrarse en el *Handbook of International Nomenclature of Cosmetic Ingredients* (INCI), como agentes anti-radicalarios con actividad *in vitro* demostrada, que le proporcionaron al desodorante en gel un efecto como preservante, al retardar el proceso de degradación oxidativa de los ácidos grasos presentes.

* Proyecto de grado.

** Facultad de Ciencias. Escuela de química. Directora: Elena E. Stashenko y Jairo René Martínez

ABSTRACT

TITLE: COMPARATIVE STUDY OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS AND EXTRACTS OF “OREGANO DE MONTE” (*Lippia organoides*) AND “PRONTO ALIVIO” (*Lippia alba*) IN A DEODORANT GEL *

Author: Héctor Joaquín Orozco Monroy**

Keywords: *Chemotypes of Lippia organoides, Lippia alba, antioxidant activity (antiradical) and lipid peroxidation.*

Essential oils and extracts from *Lippia alba*, "carvone" chemotype and *Lippia organoides*, chemotypes "thymol" and "carvacrol, were used individually and in binary mixtures (oil:oil and extract:extract), in a roll-on cosmetic deodorant gel, in the search for natural substitutes for commercial synthetic antioxidants. For this, the antioxidant activity was evaluated by monitoring hexanal as a product of oxidative degradation of linoleic acid present in the cosmetic base. Hexanal was determined as its pentafluorophenylhydrazone after on-fiber derivatization during headspace sampling with solid phase microextraction, followed by gas chromatographic analysis with micro-electron capture detector. The inhibition of hexanal formation was compared with those of 2 [6]-di-tert-butyl-*p*-cresol (BHT) and vitamin E, as antioxidant reference substances.

The results showed that essential oil and extracts individually added of both chemotypes of *L. organoides* exhibited antioxidant activity (84-87%) higher than that of BHT (75%) and close to that of vitamin E (87%). Binary mixtures of these species showed an additive effect on the antioxidant activity (87-92%), surpassing that of reference antioxidants. This makes them interesting cosmetic ingredients, which subsequently could be recorded in the Handbook of International Nomenclature of Cosmetic Ingredients (INCI), anti-free radical agent with demonstrated in vitro activity, which provided the gel deodorant a preservative effect, by delaying oxidative degradation of fatty acids present.

* College thesis

** Science Faculty. School of Chemistry. Director Elena E. Stashenko and Jairo René Martínez

INTRODUCCIÓN

Investigaciones del Ministerio de Comercio, Industria y Turismo, la Cámara de la Industria Cosmética y de Aseo de la ANDI y Proexport, con el apoyo financiero del Programa de Apoyo a la Competitividad de la Corporación Andina de Fomento (CAF), han concluido que los productos naturales presentan una demanda creciente en los mercados internacionales y, por ende, presentan un gran interés para el desarrollo de la industria de ingredientes naturales en Colombia.

El Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR), el Laboratorio M&N y el Centro de Investigación en Biomoléculas (CIBIMOL-CENIVAM), en su programa de fortalecimiento y aumento de la competitividad de la cadena productiva nacional de aceites esenciales y productos derivados y, como uno de sus objetivos, tiene la obtención de derivados naturales promisorios, poseedores de un valor agregado mayor, que el de los aceites esenciales (AE) y extractos, para lograr con ello incrementar la rentabilidad de la cadena productiva y encontrar aplicaciones para estas sustancias como fuentes de características innovadoras en productos de uso cosmético, que es un sector de alta demanda.

El involucramiento de actores del sector productivo y comercial —sector cosmético—, en la ejecución del programa permitirá una pronta materialización de los impactos esperados, lo que generará alternativas económicas a los productores agrícolas quienes hacen parte de este proyecto. Por eso, vale la pena incursionar en este mercado y dar pie para una investigación de este tipo, puesto que se tienen los cultivos de plantas aromáticas, la mano de obra, los equipos de extracción instalados, los laboratorios nacionales que pueden usar la materia prima producida, por ejemplo, aceites esenciales y el *know-how* para llevar a cabo este propósito.

Se conoce que los antioxidantes sintéticos empleados en algunos cosméticos pueden generar contraindicaciones como dermatitis, reacciones sistémicas locales y globales, fotosensibilización o desembocar en un cáncer, durante su uso

prolongado; por lo tanto, es necesario encontrar sustitutos de éstos, preferiblemente de fuentes naturales, con propiedades antioxidantes y antibacterianas, como son los extractos y aceites esenciales obtenidos de plantas aromáticas y medicinales.

Para lograr ello, en este proyecto fue necesario implementar una metodología analítica para determinar las condiciones de extracción y destilación de las especies vegetales de *Lippia origanoides* (oregano de monte), quimiotipos “timol” y “carvacrol” y *Lippia alba* (pronto alivio), quimiotipo “carvona”, dosificar los aceites y extractos de estas especies, tanto en forma individual como en mezclas binarias 1:1 y 2:1 (antibacteriano + antioxidante), en un desodorante en gel tipo *roll-on*, cuya base fue suministrada por el Laboratorio M&N (Bogotá, Colombia).

Para determinar si los aceites esenciales y extractos obtenidos ofrecían un efecto antioxidante, se evaluó su actividad antioxidante usando un sistema lipídico modelo (base desodorante), en el cual la degradación oxidativa acelerada se generó en presencia de iones Fe^{+2} . Se realizó la hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD) para obtener los aceites esenciales y la extracción con fluido supercrítico (SFE-CO₂), para aislar los extractos de las plantas bajo estudio. Luego, se efectuaron mezclas binarias de aceites y extractos para aplicarlas en el desodorante (gel tipo *roll-on*) y se analizó su actividad antioxidante.

Los resultados obtenidos mostraron que es posible obtener ingredientes naturales que pueden competir con los ingredientes sintéticos comerciales, ya que los primeros exhibieron actividad antioxidante superior a la de los compuestos sintéticos tradicionalmente empleados en productos finales.

1 ANTECEDENTES

1.1 CONTEXTO GENERAL

Con el objetivo de analizar el estado actual de las investigaciones acerca de los productos cosméticos, entre ellos, sobre los desodorantes y desodorantes antitranspirantes, que en su composición tuviesen aceites esenciales (AE) o extractos, se realizó un estudio de la producción científica existente utilizando dos bases de datos *Scifinder Scholar* y *Scopus*.

Los resultados de esta búsqueda cuantitativa mostraron el uso creciente a nivel mundial de los AE y extractos empleados con fines cosméticos. El número de artículos y patentes sobre el tema ha venido en aumento desde 1997 hasta el presente. Este proyecto puede tener importancia comercial, puesto que el 25% de estas investigaciones y aplicaciones lo ocupa el campo de los desodorantes.

La búsqueda de artículos es más relevante para los casos de dermatitis, alergias y afecciones causadas por AE y extractos de plantas en cosméticos, por esto, se realizó un estudio de patentes, que sí mostró resultados interesantes.

Las palabras-clave empleadas para la búsqueda de artículos y patentes en el presente trabajo se presentan en la **Tabla 1**.

La exploración en bases de datos dio como resultado un número de 389 artículos (31%) y 895 patentes (69%) del total de las investigaciones encontradas, para un periodo de observación desde 1997 hasta el 2010 (julio de 2010). Ello pone de manifiesto el interés demostrado por diferentes grupos de investigación para conocer las contraindicaciones que éstos pudieran generar, así como la información para empresas que buscan desarrollar nuevos productos cosméticos empleando ingredientes naturales, ya que es un campo de gran interés —debido a la tendencia actual hacia lo natural—, para la industria cosmética, que genera ingresos altos.

Tabla 1. Palabras-clave para búsqueda de artículos y patentes. Periodo de observación: 1997 -2010. Fecha de consulta: 6/06/2010.

BÚSQUEDA DE ARTÍCULOS		BÚSQUEDA DE PATENTES	
Palabras-clave	N° Artículos	Palabras-clave	N° Patentes
<i>Plant extract in cosmetics</i>	200	<i>Antibacterial deodorant</i>	445
<i>Essential oil in cosmetics</i>	109	<i>Deodorant dermatitis</i>	213
		<i>Antibacterial deodorant essential oil</i>	127
<i>Antibacterial deodorant AND essentials oils</i>	53	<i>Thyme antioxidant deodorant</i>	53
		<i>Carvacrol antioxidant deodorant</i>	21
<i>Plant extract in deodorants</i>	27	<i>Essential oil in deodorants</i>	16
		<i>Carvone antioxidant deodorant</i>	15
<i>Essential oil in deodorants</i>	16	<i>Lippia alba in deodorants</i>	4
		<i>Lippia origanoides in deodorants</i>	1
TOTAL	389	TOTAL	895

Fuente: Base de Datos. *Scopus* (Elsevier, B.V., 2010)

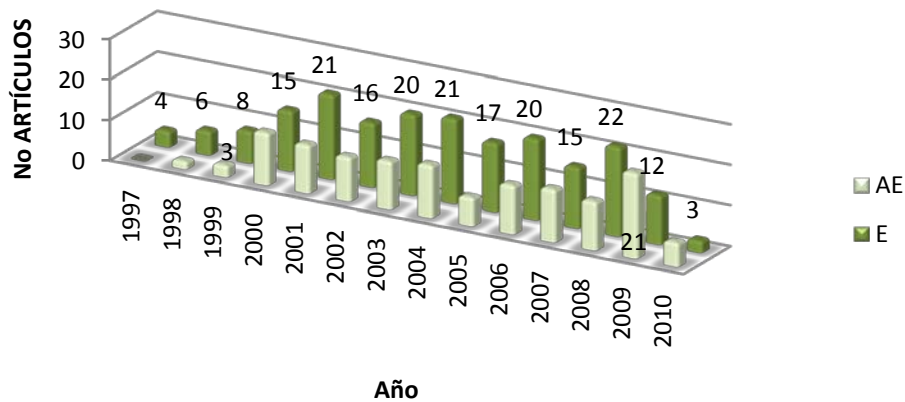
En el análisis de artículos las ecuaciones de búsqueda (49%-*plant extract in cosmetics*; 27%-*essential oil in cosmetics*) tratan sobre publicaciones que investigan el uso de extractos o aceites provenientes de plantas, como potenciales agentes antibacterianos o antioxidantes puros y de las posibles contraindicaciones que algunos generan; pero no aparece ningún artículo que mencione la aplicación de éstos en algún producto cosmético.

En las patentes encontradas no aparece mencionada la dosis tóxica dérmica, ni la cantidad de cada ingrediente adicionado al producto, ya que estos datos que obtienen los investigadores, son el secreto industrial o la información restringida que hace único y novedoso a su producto o descubrimiento; razón por la cual se protegen los resultados, registrando la invención en alguna oficina de patentes del mundo. Cabe anotar, que sí se mencionan las plantas empleadas de las cuales se obtuvieron los extractos o los AE.

Los resultados de las búsquedas de invenciones resaltan el interés de empresas e investigadores por los desodorantes antibacterianos (50%-*antibacterial deodorant*), para aquellos que generan su efecto bactericida a partir de ingredientes obtenidos de plantas. También, se observa tendencia hacia los estudios de los problemas dermatológicos que éstos pueden producir en los consumidores (24% -*deodorant dermatitis*), seguido de las investigaciones que emplean AE en desodorantes y, finalmente, 2% que usan timol, carvacrol o carvona; metabolitos secundarios mayoritarios de las plantas escogidas para el presente estudio, que, según estos resultados, cumplen funciones como antioxidantes y antibacterianos en los desodorantes, aunque se obtuvieron de diferentes fuentes vegetales a las empleadas en el presente proyecto.

1.1.1 Publicaciones de artículos. La búsqueda encontró resultados relevantes, para los casos de dermatitis o alergias que pueden causar extractos de plantas destinados a productos cosméticos y, de esta manera, permitió una mejor orientación sobre si un ingrediente natural puede o no presentar contraindicaciones en los productos; estas publicaciones se enfocan en aceites o extractos empleados en el comercio mundial desde hace años. En cuanto a la búsqueda de artículos sobre desodorantes antibacterianos, que apliquen AE, la pesquisa no arrojó resultados satisfactorios; por ello, fue importante hacer la búsqueda de patentes relacionadas con el tema del proyecto.

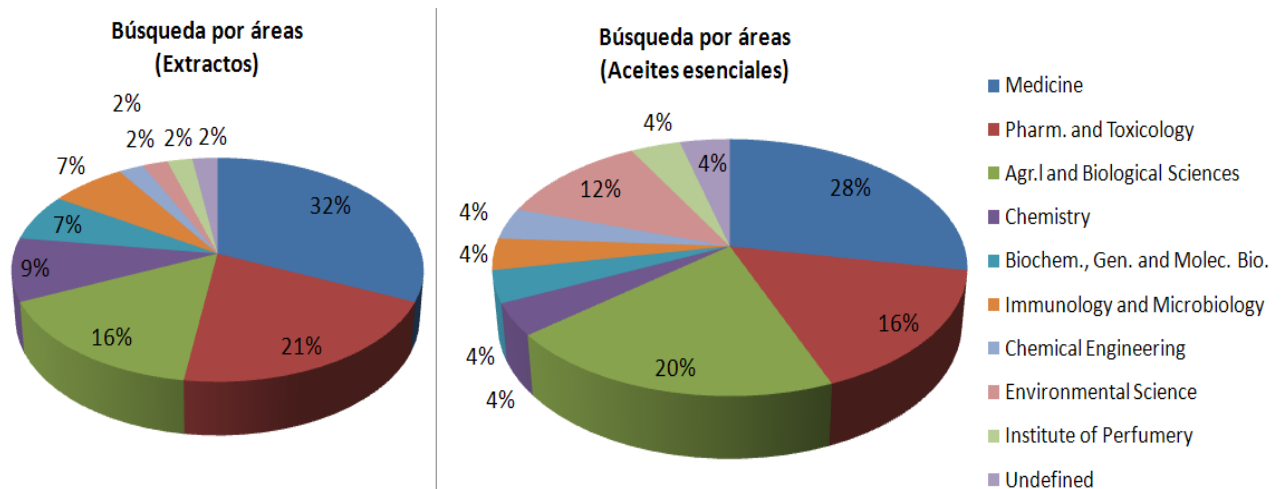
En la **Figura 1** se observa que, desde hace 10 años viene aumentando la investigación sobre el empleo de los AE y extractos naturales en cosméticos. Para los extractos, existe un interés mayor por aplicarlos en este campo, debido a sus propiedades antibacteriales, antifúngicas, antioxidantes, organolépticas, entre otras. Ésta constituye un área de desarrollo relativamente reciente en la industria cosmética.



Fuente: Base de Datos. *Scopus* (Elsevier, B.V., 2010)

Figura 1. Análisis cientométrico de número de artículos, por año, usando la Base de datos *Scopus*. Número de artículos: 389. Periodo de observación: 1997-2010. Fecha de consulta: 5/06/2.010. Ecuación de búsqueda: *TITLE ABS KEY (essential oil in cosmetics, AE)* y *TITLE-ABS-KEY (plant extract in cosmetics, E)*.

Las áreas con mayor número de artículos tienen son farmacología, toxicología, química y medicina (Véase **Figura 4**). Se observa claramente el interés por conocer las propiedades tanto terapéuticas, como, tóxicas de extractos y aceites, así como sus efectos en productos cosméticos.

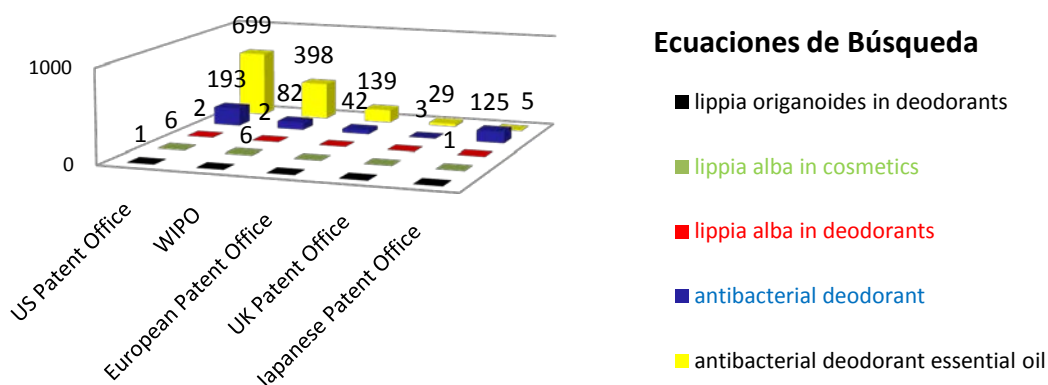


Fuente: Base de Datos. *Scopus* (Elsevier, B.V., 2010).

Figura 2. Búsqueda por áreas. Análisis cientométrico. Base de Datos: *Scopus*. Número de artículos: 389. Periodo de observación 1997-2010. Fecha de consulta: 4/06/2.010. Ecuación de búsqueda *TITLE ABS KEY (essential oil in deodorants)* y *TITLE-ABS-KEY (plant extract in deodorants)*.

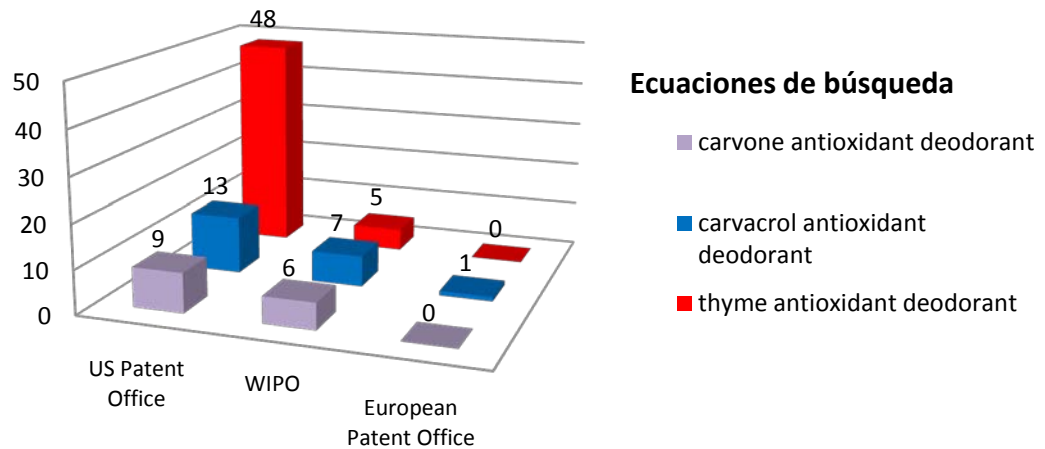
1.1.2 Publicaciones de patentes. Éstas son más extensas y revelan que el campo de los desodorantes naturales tiene una demanda grande, ya que la mayoría de investigaciones encontradas pertenecen a empresas grandes, muchas de éstas, industrias japonesas. Las innovaciones se enfocan, en una competencia por producir un desodorante natural más eficaz, por procedimientos de mezclas de AE y extractos, similares a los empleados en el proyecto.

El mayor número de patentes se encuentra en la Oficina de Patentes de los Estados Unidos, seguida de la *World Intellectual Property Organization* (WIPO) y finalmente, la Oficina Europea de Patentes (Véase **Figura 3**). Sin embargo, se observa, que el empleo de extractos o de AE de *Lippia organoides* y *Lippia alba* no ha sido extenso, pero sí hay una cantidad relevante de patentes que se refieren al uso de sus componentes mayoritarios (**Figura 4**). Esto se refleja en un número de registros de inventos superior al de la **Figura 3**. Se observa que el timol es el antioxidante de preferencia para cosméticos.



Fuente: Base de Datos. *Scopus* (Elsevier, B.V., 2010)

Figura 3. Búsqueda de patentes. Análisis cuantitativo. Base de Datos: *Scopus*. Número de patentes: 1822. Periodo de observación: 1997-2010. Fecha de consulta: 4/06/2010. Ecuaciones de búsqueda: *TITLE ABS KEY (Lippia organoides in deodorants)*, *TITLE-ABS-KEY (Lippia alba in cosmetics)*, *TITLE ABS KEY (Lippia alba in deodorants)*, *TITLE ABS KEY (antibacterial deodorant)*, *TITLE ABS KEY (antibacterial deodorant essential oil)*.



Fuente: Base de Datos. *Scopus* (Elsevier, B.V., 2010)

Figura 4. Análisis cuantitativo. Búsqueda de patentes. Base de Datos: *Scopus*. Número de patentes: 89. Periodo de observación: 1997-2010. Fecha de consulta: 4/06/2010. Ecuaciones de búsqueda: *TITLE ABS KEY (Carvone antioxidant deodorant)*, *TITLE ABS KEY (Carvacrol antioxidant deodorant)*, *TITLE ABS KEY (Thyme antioxidant deodorant)*.

A continuación, se presentan 3 registros de invenciones donde se emplean extractos de plantas y AE, aplicados en productos cosméticos, que ya se encuentran en el comercio.

ANTIPERSPIRANT COMPOSITIONS AND METHODS FOR REDUCING PERSPIRATION IN HUMANS SPYROS, A., DISLICH, C., LOUREIRO, F., SIMONI, M., FRANCISCHINI DE CARVALHO, P., SAWANDA, T., A new method for inhibiting or reducing perspiration and preventing body unpleasant odors is provided. Alternative antiperspirant actives capable of activating TRPM8 channels are topically applied, leading to inhibition or reduction of sweat production. **Patent record available from the World Intellectual Property Organization (WIPO) 2010 2010017609 (A3)**

DEODORANT COMPOSITION HIRAMOTO, T., TAKEUCHI, R., It is intended to provide a novel deodorant composition which is excellent in the deodorizing effect, is capable of affording a deodorant composition by a convenient method, and shows no decrease in the deodorizing performance even after a long period of **Patent record available from the US Patent Office 2009**

Deodorant compositions containing six essential oil components and antibacterial agents and deodorization of laboratory using them. NISHIDA, Y; ARAI, M.. (Daiichi Kogyo Seiyaku Co., Ltd., Japan). Jpn. Kokai Tokkyo Koho (2006), 11pp. **CODEN: JKXXAF JP 2006223646 A 20060831**

Patent written in Japanese. Application: JP 2005-42452 20050218. Priority: .
CAN 145:277036 AN 2006:894537 CAPLUS.

1.1.2.1 Búsqueda de patentes en *Scifinder scholar*. En este buscador, el número de patentes encontrados fue menor (alrededor de 200) en comparación con la Base de Datos *Scopus*. Pero, se observa el interés de empresas multinacionales en desarrollar de este tipo de productos (Véase **Tabla 2**).

Los países con mayor número de patentes en el campo de aplicación de productos naturales en desodorantes son Corea del Sur y Japón, con 68 y 70 registros, respectivamente; le sigue, la República Popular de China, con 46. La empresa con mayor número de patentes sobre la aplicación de extractos de plantas en desodorantes es Lion Corp (Japón), con 12 patentes.

Se observa, que existe una alta demanda por desodorantes que incorporen ingredientes naturales y, por tal motivo, muchas empresas invierten su tiempo en investigación y desarrollo. Actualmente, las industrias japonesas (Véase **Tabla 2**) están investigando intensamente en este campo, al igual que Brasil. La anterior búsqueda cuantitativa muestra que en el mundo existe un gran interés por este tipo de productos con ingredientes naturales, así como crece constantemente la demanda de los consumidores que prefieren productos naturales en los artículos de higiene personal y aseo.

En la **Tabla 2** se muestran las empresas y los diferentes países que han desarrollado nuevas formulaciones cosméticas con base en ingredientes naturales provenientes de plantas, cada una con su respectivo número de patente, el año en que se registró, los inventores y alguna información sobre la adición de un AE o extractos, con fines antioxidantes y antibacterianos.

Tabla 2. Base de Datos: *Scifinder scholar*. Periodo de observación: 1990 - 2010. Fecha de consulta: 01/06/2.010. Ecuación de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY (antibacterial deodorant) AND (essentials oils)*.

País	Año	Número Patente	Nombre	Inventores
Brasil	2009	2008:667642	<i>Analysis of uses of essential oils and terpenics/terpenoids compounds by pharmaceutical industry through USPTO granted patents</i>	Silva-Santos, A.; Antunes, A. M. S.; Bizzo, H. R.; d'Avila, L. A.; Souza-Santos, L. C.; Souza, R. C
Japón	2009	JP2006223646	<i>Deodorant compositions containing six essential oil components and antibacterial agents and deodorization of laboratory using them</i>	Nishida, Yoshihisa; Arai, Michiko. (Daiichi Kogyo Seiyaku Co., Ltd.)
EE.UU.	2006	US 20030206973	All natural gentle deodorant and antiperspirant	Gale Carolyn.
Japón	2003	JP2000063262	<i>Antibacterial cosmetics containing tea extracts, thyme extracts, and tea tree oils</i>	Kadota, Akemi. (Osaka Yakuin Kenkyusho K. K.)
Japón	2000	JP 11246337 US 420104 A	<i>Deodorant compound manufactured from an extract of rosemary</i>	Shiseido Co Ltd
Francia	1998	FR 2767061 WO 9907396	<i>Natural products containing propolis and essential oils for use in cosmetics and pharmaceuticals</i>	Morice, Andre Pierre. (Fr.). Fr. Demande

Fuente: Base de Datos. *Scopus* (Elsevier, B.V., 2010).

Se puede concluir, que el producto a obtener en esta investigación es potencialmente patentable y como en Latinoamérica sólo Brasil ha hecho estudios similares, el Centro de Investigación CIBIMOL-CENIVAM, junto con el Laboratorio M&N, pueden ser pioneros en este campo.

1.2 MARCO TEÓRICO

1.2.1 Definición de productos cosméticos. *Cosmetic Toiletry Fragrance Association* (CTFA), define cosméticos como artículos que untados, frotados, introducidos o esparcidos en el cuerpo humano, tienen como finalidad la limpieza, embellecimiento, promover atractivo o alterar apariencia; no incluyendo aquí los jabones [1].

1.2.2 Definición de desodorante. Son sustancias que aplicadas al cuerpo, más frecuentemente en las axilas, reducen o eliminan el olor corporal causado por el metabolismo de bacterias, que se nutren de los desechos del sudor. Estos desodorantes pueden ser antibacterianos, antitranspirantes o una mezcla de ambos; la diferencia radica en que un desodorante sólo genera un efecto bactericida, mientras que un antitranspirante, impide la secreción de sales minerales y exudados; un desodorante antitranspirante no solo ejerce un efecto bactericida, sino que también impide la sudoración. La *Food and Drugs Administration* (FDA) de los Estados Unidos los regula como fármacos sin prescripción médica y los define como un cosmético que actúa para inhibir el crecimiento de bacterias causantes de olores, hasta por 24 horas y sin peligros [2].

1.2.3 Composición típica de los desodorantes. En la **Tabla 3** se muestra la nomenclatura comercial y la *International Nomenclature of Cosmetic Ingredient* (INCI), establecida por la CTFA, para un típico desodorante antitranspirante en gel tipo *roll-on*, suministrado por el Laboratorio M&N (Bogotá). En la tercera columna se observa la acción que ejerce cada uno de los ingredientes; siendo los principios activos en la formulación, el clorhidróxido de aluminio, que actúa como antitranspirante, el triclosán, como antibacteriano y la vitamina F, que se usó como un marcador para la posterior determinación de los aldehídos generados durante el proceso de oxidación inducida. El resto de los componentes hacen parte de la composición base que originan la consistencia característica tipo gel [2].

Tabla 3. Formulación de desodorante en gel tipo *roll-on**.

NOMBRE COMERCIAL	NOMBRE INCI	ACCIÓN	%
Agua desionizada	<i>Water (Aqua)</i>	Vehículo	61,05
Clorhidróxido de aluminio	<i>Aluminum Chlorohydrate</i>	Antitranspirante	16,00
Arlacel 165 (lipomulse 165)	<i>Glyceryl Stearate (and) PEG-100 Stearate</i>	Emulsionante	6,00
Propilenglicol USP	<i>Propylene Glycol</i>	Humectante	5,00
Vitamina F	<i>Linoleic Acid (and) Linolenic Acid</i>		4,00
Silicona 344	<i>Cyclomethicone</i>	Gelificante	3,00
Alcohol cetílico	<i>Cetyl Alcohol</i>	Estabilizante	2,00
Emulgin B1	<i>Ceteareth-12</i>	Emulsionante	1,47
Emulgade 1000	<i>Cetearyl Alcohol (and) Ceteareth-</i>	Emulsionante	0,53
Cremophor Rh-40	<i>PEG-40 Hydrogenated Castor Oil</i>	Emulgente A/O	0,50
Irgasán DP-300	<i>Triclosan</i>	Antibacteriano	0,25
Alantoína	<i>Allantoin</i>	Reepitelizante	0,20

*Formulación suministrada por el Laboratorio M&N (Bogotá, Colombia).

1.2.4 Microorganismos en productos naturales. Los microorganismos contaminantes potenciales de los cosméticos pertenecen al grupo de las bacterias. Dentro del grupo de las bacterias figuran: *Bacillus sp.*, *Pseudomona sp.*, especialmente, la *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.*, *Propionibacterium acnés*, *P. granulosum* y *P. avidem*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* [1].

Los microorganismos pueden producir los siguientes efectos en los cosméticos:

- a. Tóxicos: Presencia de toxinas, productos catabólicos que actúan sobre ácidos grasos; presencia de proteínas extrañas que producen reacciones alérgicas o irritación primaria [1].
- b. Degradación de conservadores: Los microorganismos pueden ocasionar decoloración del producto, rancidez, cambios, separación de la fase de una emulsión, aparición de manchas en la superficie, entre otras [1].

1.2.5 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”. De igual modo, desde el punto de vista biológico, se define como “aquel compuesto que protege a los sistemas vivos de los agentes que causan deterioro oxidativo” [3].

1.2.5.1 Evaluación de la actividad antioxidante (AAO). Los métodos que permiten evaluar la capacidad antioxidante de una gran variedad de sustancias, se pueden clasificar en dos grandes grupos: I. Aquellos que determinan la capacidad de inhibir la oxidación lipídica y II. Los que miden la habilidad para secuestrar radicales [4-10].

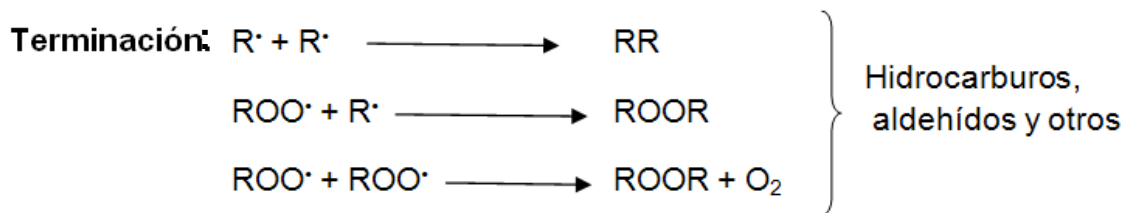
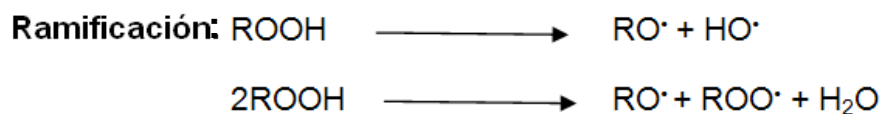
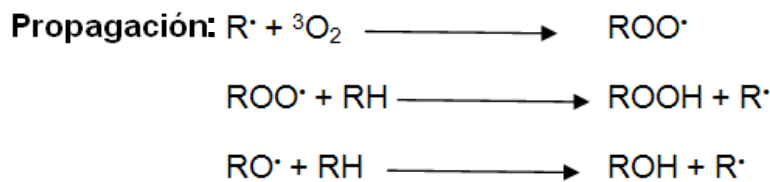
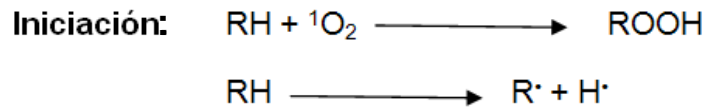
En el primer grupo, se usan sistemas modelo, los cuales son diseñados para el estudio de la AAO; en este caso, el sistema modelo *in-vitro* se emplea para el estudio de esta actividad en el proceso de peroxidación lipídica; se somete a una rápida oxidación que puede ser inducida, por ejemplo, por la radiación ultravioleta, metales de transición como el hierro, ya que en sus estados de oxidación II y III el metal puede participar en las reacciones de transferencia de electrones, *i.e.*, reacción tipo Fenton [4-10].

Por otro lado, el objetivo de los métodos que determinan la capacidad atrapadora de radicales es imitar los mecanismos que suceden en la oxidación de lípidos, midiendo la reducción de radicales estables o radicales generados por diferentes medios, por ejemplo, ensayos como de decolorización del catión-radical 2,2-azino-bis(ácido 3-etilbencen-tiazolona-6-sulfónico) (ABTS) y del radical α - α -difeníl- β -picrilhidrazilo (DPPH \cdot) [11, 12].

1.2.5.2 Peroxidación lipídica (PL). también conocida como autoxidación de lípidos, es una reacción de propagación en cadena que está acompañada de la generación de hidroperóxidos lipídicos y una gran variedad de productos secundarios como epóxidos, hidrocarburos y compuestos carbonílicos, entre otros.

Se conoce que la peroxidación lipídica transcurre a través de la producción de radicales y se lleva a cabo en varias etapas [4-9], a saber:

Iniciación, propagación, ramificación y terminación [4]:



Donde RH – ácido graso susceptible de oxidación

R[•] - radical;

RO[•] - radical alcoxilo;

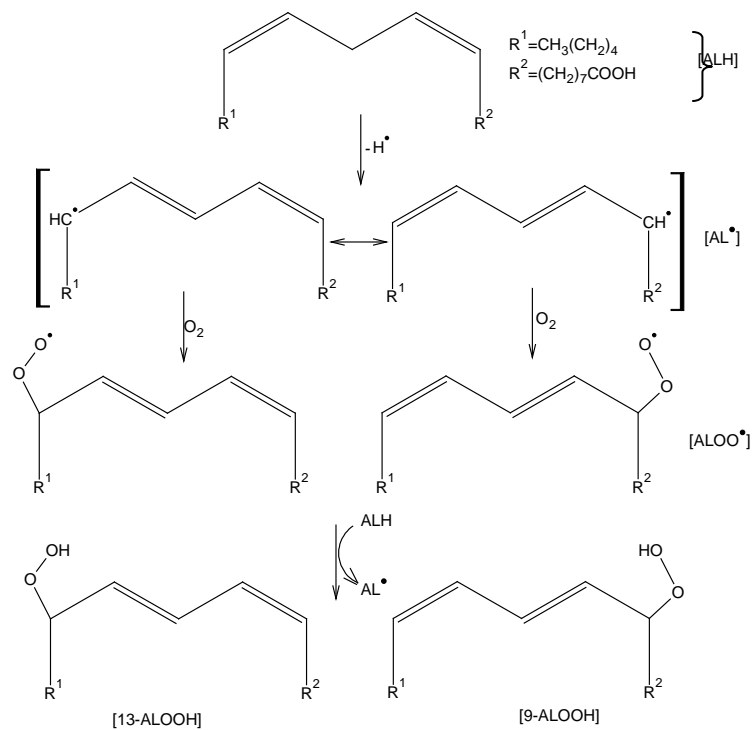
ROO[•] - radical peroxilo;

ROOH – hidroperóxido.

En la industria cosmética el proceso oxidativo tiene gran importancia, puesto que los productos son degradados por el oxígeno, causando cambios en su color,

textura y propiedades organolépticas, debido también a su rancidez [9]. Uno de los ácidos grasos más propensos a la oxidación es el ácido linoleico (ALH), presente en la mayoría de alimentos que se consumen a diario, especialmente, en la grasa del pollo y aceites comestibles. En la industria cosmética éste se suministra, en forma de vitamina F, en productos con el fin de combatir la piel seca, desigual y agrietada, pelo seco y seborrea; ya que deja la piel suave y el pelo flexible y sedoso. También es útil para tener una piel sana y como preventivo (Véase **Anexo 2**). El ALH posee enlaces dobles en las posiciones 9 y 12, que debilitan el enlace C-H metilénico (76 kcal/mol de energía de enlace), con respecto a un hidrógeno en una cadena saturada (96,3 kcal/mol de energía de enlace) y facilitan la abstracción del hidrógeno del grupo metilénico del C₁₁, para formar el respectivo radical (AL[•]), estabilizado por deslocalización del electrón a través de los cinco átomos de carbono (**Figura 5**) [4].

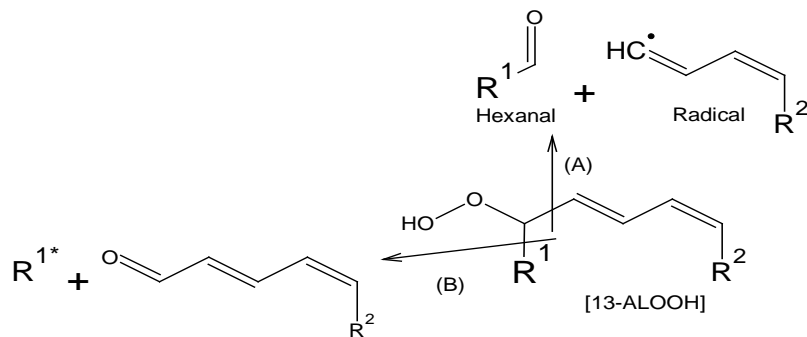
La distribución electrónica en el AL[•] permite la formación de los híbridos de resonancia conjugados. En presencia de oxígeno triplete (³O₂) se forman los correspondientes radicales peroxi 9- y 13-ALOO[•], los cuales reaccionan con el ácido graso ALH para propagar la reacción y generar los 9- y 13-hidroperóxidos, respectivamente. Los hidroperóxidos formados se descomponen para dar compuestos de bajo peso molecular. El hexanal es el producto secundario más abundante formado a partir de la oxidación del ALH, posiblemente, por la vía de escisión β- del 13-hidroperóxido con la formación de un radical de corta vida y el grupo carbonilo [4].



Fuente: BELITZ H. D., and GROSCH W., *Food Chemistry*.

Figura 5. Reacción de oxidación del ácido linoleico [13].

La **Figura 6** muestra las dos posibilidades (A y B) de la escisión de los hidroperóxidos [4]. Sin embargo, el hexanal no es el único compuesto carbonílico formado. En esta reacción se forman los compuestos carbonílicos, productos de la reacción de oxidación inducida con Fe^{+2} de los ácidos oleico, linoleico y linolénico (**Tabla 4**) [4].



Fuente: BELITZ H. D., and GROSCH W., *Food Chemistry*.

Figura 6. Esquema de la escisión β - del 13-hidroperóxido. Formación del hexanal [13].

Tabla 4. Compuestos volátiles generados durante la degradación de ácidos grasos insaturados [13].

Ácido oleico	($\mu\text{g/g}$) ^a	Ácido linoleico	($\mu\text{g/g}$) ^a	Ácido linolénico	($\mu\text{g/g}$) ^a
Heptanal	50	Pentanal	55	1-Penten-3-ona	30
Octanal	320	Hexanal	5100	3- <i>trans</i> -Butenal	10
Nonanal	370	Heptanal	50	2- <i>trans</i> -Pentenal	35
Decanal	80	2- <i>trans</i> -Heptenal	450	2- <i>cis</i> -Pentenal	453
2- <i>trans</i> -Decenal	70	Octanal	45	2- <i>trans</i> -Hexenal	10
2- <i>trans</i> -Undecenal	85	1-Octen-3-ona	2	3- <i>trans</i> -Hexenal	15
—	—	2- <i>cis</i> -Octenal	990	3- <i>cis</i> -Hexenal	90
—	—	2- <i>trans</i> -Octenal	420	2- <i>trans</i> -Heptenal	5
—	—	3- <i>cis</i> -Nonenal	30	2- <i>trans</i> -4- <i>cis</i> -Heptadienal	320
—	—	3- <i>trans</i> -Nonenal	30	2- <i>trans</i> -4- <i>trans</i> -Heptadienal	70
—	—	2- <i>trans</i> -Nonenal	30	2- <i>cis</i> -5- <i>cis</i> -Octadienal	20
—	—	2- <i>cis</i> -Decenal	20	3,5-Octadien-2-ona	30
—	—	2- <i>trans</i> -4- <i>trans</i> -Nonadienal	30	2- <i>trans</i> -6- <i>cis</i> -Nonadienal	10
—	—	2- <i>trans</i> -4- <i>cis</i> -Decadienal	250	2,4,7-Decatrienal	85
—	—	<i>trans</i> -4,5-Epoxy-2- <i>trans</i> -decanal	150		

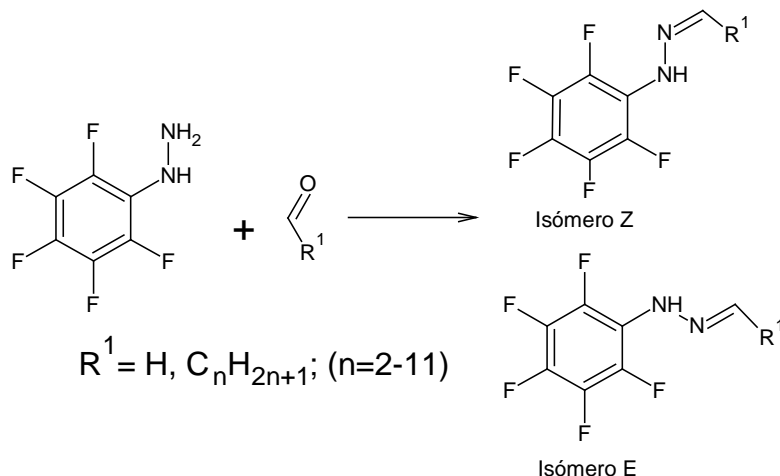
^a 1 g de ácido graso es oxidado a 20°, por 0,5 mol de oxígeno/mol de ácido graso [13].

1.2.5.3 Evaluación de la actividad antioxidante y la peroxidación

lipídica. Para el estudio de AAO en muestras cosméticas se monitorean los productos finales o secundarios de la peroxidación lipídica; para esto, se emplean diferentes técnicas. La más usada para este caso es la determinación de compuestos carbonílicos, productos de la reacción, como aldehídos, cetonas, α -hidroxialdehídos y ácidos carboxílicos. En el presente trabajo, se cuantificó el hexanal, producto final de la degradación oxidativa de la base cosmética, que contenía el ácido linoleico de la vitamina F.

El hexanal no se puede cuantificar empleando detectores cromatográficos convencionales, como es el caso del detector de ionización en llama (*Flame Ionization Detector*, FID), porque se obtiene una respuesta (señal) poco sensible;

además, la inestabilidad térmica, la alta volatilidad y la solubilidad parcial en agua de las moléculas carbonílicas hacen difícil su análisis directo por cromatografía de gases (GC). Por ello, se emplea una metodología basada en la derivación del hexanal con pentaflúorfenilhidracina (PFPH). Se cuantifican las respectivas pentaflúorfenilhidrazonas, que se forman sobre el recubrimiento de la fibra de microextracción en fase sólida (SPME). Es un derivado térmicamente estable y de volatilidad y polaridad más bajas que el hexanal, además, al aumentar la “especificidad” de la molécula, introduciendo en esta los cinco átomos de flúor, se incrementa notoriamente la respuesta del detector selectivo de micro-captura de electrones (μ -ECD) o del detector selectivo de nitrógeno fosforo (NPD) [5, 8, 14]. En la **Figura 7** se muestra la reacción de derivación de un aldehído con la PFPH, que permite obtener una mezcla de hidrazonas isoméricas. Esta metodología fue previamente estandarizada en el laboratorio de cromatografía por Stashenko y colaboradores [15-18].



Fuente: JARAMILLO, B., Tesis Doctoral UIS. 2004.

Figura 7. Esquema de derivatización de aldehídos con pentaflúorfenilhidracina [14].

1.2.6 Actividad antibacteriana y antioxidante de plantas. Las diferentes propiedades biológicas de las plantas y AE o extractos están directamente relacionadas con su composición química. Así, algunos sesquiterpenos exhiben

actividad citotóxica y mutagénica y son menos efectivos para inhibir el crecimiento de los microorganismos que sus análogos oxigenados [19]. Por su parte, los fenoles son microbicidas o inhibidores del crecimiento, efecto que depende de su estructura química; razón por la cual los aceites esenciales con elevado contenido de fenoles presentan actividad antimicrobiana alta [20].

Los antioxidantes obtenidos de plantas se consideran de origen natural, la mayoría son compuestos fenólicos, por ejemplo, tocoferoles, flavonoides o ácidos fenólicos [5, 8, 14].

1.2.7 Plantas con propiedades antibacterianas y antioxidantes. Orégano de monte (*Lippia origanoides*), quimiotipos “timol” y “carvacrol”, y pronto alivio (*Lippia alba*), quimiotipo “carvona”, se emplearon en este proyecto; ya que los estudios realizados en el CIBIMOL-CENIVAM y en otros centros de investigación a nivel mundial, muestran que los metabolitos secundarios de estas dos plantas (tres, teniendo en cuenta los quimiotipos) son de baja toxicidad, poseen propiedades antioxidantes y antibacterianas [21-23], razones por las cuales se emplean en proyectos agroindustriales con asociaciones de productores en municipios de Sucre y Socorro del Departamento de Santander.

El orégano de monte es ideal como antibacteriano y antioxidante [23, 24] y el pronto alivio en la medicina tradicional es conocido por sus propiedades antisépticas y es considerado como un buen agente antibacteriano [21, 23].

1.2.8 Quimiotipos. Los quimiotipos son variaciones químicas naturales que suceden en el metabolismo secundario de las plantas, inducidas por factores ambientales (e.g., tipo de suelo, altitud, exposición al sol, lluvia, época de colecta, variaciones estaciones, insectos) [25], que someten al individuo o a un grupo a una condición de estrés, lo que hace que su metabolismo produzca algunos metabolitos secundarios en mayor cantidad que otros. Esto no siempre puede ser cierto en su totalidad y las variaciones observadas puedan estar influenciadas también por factores genéticos. Hay plantas que pueden presentar diferencias muy marcadas en la composición de su aceite con respecto a un compuesto en

particular. Por ejemplo, el contenido de carvacrol en *Lippia origanoides* puede variar del 0,1 al 60% [25]. Otras pueden cambiar su apariencia, diferenciando de esta manera sus quimiotipos, como *Lantana camara*, la cual presenta una variación en el color de sus flores amarillo-naranja y rosado-violeta, así como en la composición de su AE [26].

1.2.9 *Lippia alba*. Esta planta (**Figura 10**) es un subarbusto de la familia *Verbenaceae*, también conocido como *Lantana alba*, *Lippia geminata*, *Lantana citrata* o *Lippia geniculata*, entre otros. Popularmente, se conoce como “Pronto alivio”, “curalotodo”, “falsa melisa”, “anís de España”, “orégano de cerro”, “salvia morada”, “poleo”, “salvia americana”, etc. Esta especie es nativa de América y se usa en medicina tradicional como estomacal, antiespasmódica, digestiva, estimulante, analgésico, béquico, antihemorroidal, expectorante, sedante, desinfectante, diaforética, abortiva, emenagoga y para el tratamiento de resfriados, diarrea, artritis, corazón, presión, sinusitis, espasmos, bronquitis y cólicos. También se utiliza en culinaria [27-34].



Fuente: El autor.

Figura 8. Planta de *Lippia alba* (Familia *Verbenaceae*).

En un estudio realizado en 2006, se clasificaron los quimiotipos de *Lippia alba*, cultivados en diferentes partes del mundo; éstos se agruparon de acuerdo con la

ruta biosintética de sus metabolitos secundarios, identificándose 7 quimiotipos para esta especie (**Tabla 5**) [35]. El aceite esencial presenta actividad antimicrobiana contra *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Neurospora crassa*, *Deschleria oryzae* y *Fusarium moniliforme*, tóxica solo en altas dosis, presenta actividad analgésica, antiedematogénica y anticonvulsionante [36,37]. El quimiotipo rico en carvona presenta actividad AO, actividades antifúngica y antibacterial contra *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* [38] y presenta una toxicidad baja con un valor de IC50 de 23 µg/mL.

Tabla 5. Quimiotipos de *Lippia alba* y su lugar de origen [35].

Quimiotipos	Componentes mayoritarios	País de origen
I	Citral; linalol	Argentina, Guadalupe, India, Brasil, Guatemala, Curazao, Uruguay.
II	Tagetenona	Argentina, Guatemala
III	Carvona, limoneno	Brasil, Cuba, Colombia
IV	β-Mirceno	Argentina, India
V	γ-Terpineno	Brasil
VI	Alcanfor; 1,8-cineol	Uruguay
VII	Estragol	EE.UU.

1.2.9.1 Actividad antioxidante. En publicaciones realizadas por Ramos en 2003 [37] y Stashenko y colaboradores [39], se describen los procedimientos y resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial y Del extracto etanólico de *Lippia alba*, respectivamente. El primer trabajo, empleó métodos de atrapamiento de radicales [37] (DPPH· y ABTS+·) e inhibición de la peroxidación lipídica y determinó que la actividad del AE fue equivalente a la actividad de la vitamina E en concentraciones mayores o iguales a las concentraciones de esta última (el % de disminución del hexanal formado durante la peroxidación lipídica del ácido linoleico fue de 73.6 y 62.4 % para el AE

de *Lippia alba* y la vitamina E, respectivamente). El segundo trabajo [39], reporta ensayos de atrapamiento de radicales (DPPH· y OH·) y peroxidación lipídica.

1.2.10 *Lippia organoides*. Es un arbusto aromático de la familia *Verbenaceae*, nativo de América Central y norte de Suramérica, especialmente en la región Amazónica (Véase **Figura 9**). Los nombres botánicos (sinónimos) de esta planta son *L. berterii*, *L. schomburgkiana*, *L. organoides* o *Lantana ciliaris*. Esta planta se conoce popularmente como “Salvia de Marajó”, “Orégano”, “Orégano de burro”, “Poleo”, “Orégano cimarrón”, “Orégano de cerro”, “Orégano ancho”. Se usa en culinaria y como planta medicinal. En la medicina popular se aplica para el tratamiento de cólicos, resfriados, asma, tos, infecciones pulmonares, indigestión, diarrea, náusea, fiebre; también, como estomáquica, antiespasmódica, emenagoga, expectorante y antiséptica [29, 40, 41].



Fuente: El autor.

Figura 9. Planta de *Lippia organoides* (Familia *Verbenaceae*).

La actividad biológica. El AE tiene actividad antimicrobiana contra los siguientes hongos y bacterias: *Candida albicans*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*, *Trychophytum rubrum*, *Fonsecaes pedrosi*,

En el Laboratorio de Cromatografía de la UIS se han realizado numerosos trabajos, usando esta técnica y optimizando las variables de extracción, para un mejor rendimiento, como lo describen Stashenko y colaboradores [39] y Tsarkova [46]. En estas investigaciones, el balón con el material vegetal, se introduce al horno microondas comercial. El material vegetal y el agua se calientan en el matraz; El montaje permite aislar el aceite, evaporarlo y luego condensarlo en una trampa tipo Dean-Stark. El tiempo de extracción es de aproximadamente 40 min, que es mucho menor que las 3 ó 4 horas necesarias para la hidrodestilación convencional.

1.2.11.2 Extracción con fluido supercrítico (CO₂). En la actualidad, la extracción con fluido supercrítico es cada vez más usada para la obtención de esencias y extractos de las plantas [47]. Esta técnica ha ganado aceptación porque es considerada segura para la salud de las personas, ya que los extractos obtenidos han sido reconocidos por su calidad de olor y sabor sobre extractos aislados por otras técnicas, aunque la SFE sea costosa; estas características son las que se tienen en cuenta en el momento de elegirla [47]. Además, es un método funcional ya que variando las condiciones de temperatura y presión se pueden obtener selectivamente diferentes clases de extractos, *i.e.*, con diferente composición. El uso de ciertas sustancias, a presiones y temperaturas cercanas a las críticas, se basa en que éstas podrían ser consideradas como solventes adecuados (“supersolventes”), para la extracción de metabolitos volátiles y semivolátiles de las plantas [48-51].

1.2.11.3 Microextracción en fase sólida (SPME). Una alternativa para analizar los compuestos carbonílicos volátiles, es el uso de la microextracción en fase sólida (SPME). Es una técnica de extracción y concentración de los analitos en diferentes matrices, que permite minimizar la manipulación de la muestra sin requerir disolventes orgánicos. La técnica es rápida, polifuncional y soluciona

algunos problemas encontrados en los métodos tradicionales, como la formación de emulsiones, el elevado consumo de disolventes o efectos de memoria [52].

SPME se realiza sobre una fibra de sílice fundida que está recubierta con un sorbente, en la mayoría de los casos, de tipo polimérico en el cual se adsorben los analitos. Luego, ocurre la desorción de éstos mediante temperatura (GC) o un disolvente orgánico (HPLC). El proceso comienza cuando la fibra (el recubrimiento polimérico) entra en contacto con la muestra y se inicia la partición de los analitos entre la matriz de la muestra y el recubrimiento [53].

El muestreo se considera completo cuando la concentración de analito ha alcanzado el equilibrio de distribución, entre la muestra y la fibra. El recubrimiento funciona como una trampa de analitos, lo que resulta en una acumulación de masa de analitos sobre la fibra. El pequeño tamaño de la fibra y su geometría cilíndrica permiten incorporarla en una jeringa (aguja), de esta forma, se facilita su manipulación y desorción de analitos atrapados [54].

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS MENORES

2.1.1 Reactivos y solventes. Agua, grado analítico, y metanol, grado analítico, se compraron a *Merck* (Darmstadt, Alemania); base cosmética de desodorante en gel tipo *roll-on* fue suministrada por el Laboratorio M&N (Bogotá); hexanal (97%), sulfato de hierro, dodecil sulfato de sodio, *Tris* [2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol] y cloruro de potasio se compraron a *Merck* (Darmstadt, Alemania); 2,6-di(*ter*-butil-*p*-cresol) (BHT), vitamina E (99%), pentaflúorfenilhidracina (PFPH) (97%), ácido linoleico (99%), se compraron a *Aldrich Chemical Co. Inc.*, (Milwaukee, WI. EE.UU.).

2.1.2 Materiales. Se usaron *septa*, férrulas, *liners* (*Agilent Technologies*, Palo Alto, CA, EE.UU.), jeringas de 10 µL (*Hamilton Co.*, Reno, EE.UU.) y 5 µL (*Hewlett-Packard*, Palo Alto, CA, EE.UU.). Los tubos cónicos de poli(propileno) de 1.5 mL, micropipeteadores de 2-20 y 25-250 µL, puntas ~~plásticas~~ para las micropipetas, dispensadores para solventes y las pipetas Pasteur desechables se compraron a *BRAND GMBH Co.* (Wertheim, Alemania).

2.1.3 Material de vidrio: Se emplearon frascos ámbar para SPME de 2, 5 y 10 mL, pipetas volumétricas y aforadas de 0.5, 1, 2, 5 y 10 mL, balones aforados de 1, 2, 5, 10 y 25, 50 mL, vasos de precipitados de 50 y 100 mL (*Schott*, Hofteim, Alemania).

2.1.4 Gases especiales: Para cromatografía de gases se usaron He (99,995%), N₂ (99,995%), H₂ (99,995%) y aire (99,995%) (Grupo Linde Colombia).

2.1.5 Equipos menores e instrumentos analíticos.

- Plancha de calentamiento con agitación magnética (*Thermolyne, Nouva II stirring hot plate*, Dubuque, IA, EE.UU.).

- Plancha de calentamiento con agitación magnética, *Schott Geräte GMBH* modelo *MR106S* (Hofteim, Alemania), *minishaker IKA, JKMS*, (Hofteim, Alemania).
- Balanza analítica digital *Mettler-Toledo* AG285 \pm 0.00001 g (Greifensee, Suiza).
- Balanza de precisión BA310S *Sartorius Basic* \pm 0.005 g (Göttingen, Alemania).
- Baño circulatorio de refrigeración *FISHER* (Pittsburgh, PA, EE.UU.).
- Sistema de extracción con fluido supercrítico, Extractor SFE 2000 (*Thar technologies*, PA, Pittsburgh EE.UU.).
- Fibra para microextracción en fase sólida de [poli-(dimetilsiloxano)/divinilbenceno, 65 μ m, (*Supelco Inc.*, Bellefonte, EE.UU).
- Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, EE.UU.), HP 6890 *Plus*, con programación electrónica de presión, dotado con microdetector de captura de electrones (μ -ECD, 63Ni, 280°C), inyector automático HP 7683 *Series*, puerto de inyección *split/splitless* (250°C, relación *split* 1:10) y sistema de datos HP *ChemStation* HP Rev. A.06.03 [509]. Se empleó una columna HP-5, 30 m x 0.2 mm D.I. x 0.33 μ m d.f., con f.e. de 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano). La programación de temperatura del horno fue de 100°C por 5 min hasta 250°C por 5 min @ 10°C/min. Se utilizó helio (99.995 %), como gas de arrastre con una velocidad de 1 mL/min (70°C), y mezcla de argón-metano (9:1), como gas auxiliar;
- Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard, HP 5890A *Series II* acoplado a un detector selectivo de masas HP 5972, sistema de ionización por impacto de electrones (70 eV), analizador másico cuadrupolar, sistema de datos con dos bibliotecas de espectros de masas NBS75K (75.000 espectros) y WILEY 138 (138.000 espectros), equipado con un inyector automático HP 6890 *Series*, puerto de inyección *split/splitless* (relación *split* 1:30, 250°C), las temperaturas de la cámara de ionización y la línea de *transferencia* se mantuvieron a 180 y 285°C, respectivamente. Se usó una columna HP-

5MS, 60 m x 0.25 mm D.I. x 0.33 μm d.f., con f.e. de 5%–fenil-poli(dimetilsiloxano); la programación de temperatura fue de 100 °C por 5 min @ 2.5°C/min hasta 280°C por 10 min. Los espectros de masas y las corrientes iónicas reconstruidas se obtuvieron en un rango de masas de m/z 40 – 450.

- Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890N Network Series GC* (Palo Alto, CA, EE.UU.), acoplado a un detector selectivo de masas *AT 5975 Inert XL*, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250°C, relación *split*, 50:1), e inyector automático *Agilent Technologies 7863B*. se usó una columna de sílice fundida *DB-WAX (J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.)*, con fase estacionaria entrecruzada e inmovilizada de poli(etilenglicol) de 60 m x 0,25 mm, D.I. x 25 μm , d_f ; con la programación de temperatura de 45°C por 5 min hasta 159°C por 3 min @ 3°C/min, y hasta 220°C por 3 min. Los espectros de masas y las corrientes iónicas reconstruidas se obtuvieron en un rango de masas de m/z 40 – 450.

2.2 RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

La recolección y el secado del material vegetal se realizó en las parcelas experimentales del Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM (UIS, campus principal, Bucaramanga), siguiendo la metodología descrita por Celis [23] para *Lippia origanoides*, quimiotipo “carvona”, por Ruíz [24] para *Lippia origanoides*, quimiotipo “timol”, y por Gómez [55], para la *Lippia alba*, quimiotipo “carvona”; los pliegos testigo de estas especies, ya identificadas, están depositados como muestra permanente en el Herbario Nacional de Colombia, con los números de *voucher*, registrados en la **Tabla 6**. Las plantas se cosechaban cada 6 meses.

El secado del material vegetal se realizó en una estufa *Indumegas* (Bucaramanga, Colombia), a una temperatura de 50°C durante 3 horas, según las condiciones establecidas por Gómez [55] en su trabajo. Para obtener mayor rendimiento, de

ambas plantas, de la destilación y la extracción con fluido supercrítico, para cada proceso, se empleó todo el material vegetal cosechado (hojas y tallos).

Tabla 6. Números de *voucher* COL de las especies estudiadas [23, 24].

ESPECIE	FAMILIA	No COL
<i>Lippia alba</i> , quimiotipo “carvona”	Verbenaceae	512078
<i>Lippia origanoides</i> Kunth, quimiotipo “carvacrol”	Verbenaceae	512075
<i>Lippia origanoides</i> H.B.K, quimiotipo “timol”	Verbenaceae	519799

La metodología empleada para la destilación de los aceites esenciales y obtención de los extractos se describe en los dos numerales siguientes. El correspondiente proceso de identificación, caracterización y cuantificación de los metabolitos secundarios presentes en los aceites y extractos de *L. alba* y *L. origanoides* se explica detalladamente en el **Numeral 2.4**. El procedimiento llevado a cabo para la obtención de la curva de calibración del hexanal haciendo su derivación previa a su respectiva hidrazona, aparece en el **Numeral 2.5.1**. En el **Numeral 2.6** se muestran las pruebas de actividad antioxidante para la base cosmética realizando las reacciones de peroxidación.

2.3 PROCEDIMIENTOS DE DESTILACIÓN Y EXTRACCIÓN

2.3.1 Obtención de los aceites esenciales por el método MWHD. Las hojas limpias, secas y pesadas (ca. 200 g, balanza analítica METTLER-TOLEDO AG 285; Greifensee, Suiza), se sometieron al proceso de destilación en un equipo tipo Clevenger con reservorio de destilación *Dean-Stark* adaptado a un sistema de calentamiento por radiación de microondas, en un horno convencional *LG Intelowave*, modelo MS-1242ZK (Seúl, Corea), con potencia de salida 1200 W y frecuencia de radiación 2,5 GHz [39]. Se adicionaron 300 mL de agua destilada. El tiempo total de la extracción fue de 40 min, divididos en 4 turnos (4x10 min), a intervalos entre ellos de 1 min. La potencia del horno (720 W) se fijó al 60% de la potencia total del equipo.

Los AE obtenidos se secaron con Na₂SO₄ anhidro (J.T. Baker, Philisburg, NJ, EE.UU.), para evitar su daño por humedad. Los AE aislados se pesaron en una balanza METTLER-TOLEDO AG 285 (Greifensee, Suiza), los pesos se promediaron y el rendimiento de esencia se calculó con base en el peso inicial de material vegetal.

2.3.2 Obtención de extractos por el método SFE (CO₂). Para este tipo de extracción se utilizó un equipo extractor SFE 2000 (Thar Technologies, Pittsburgh, PA, EE.UU.). Se usó la metodología descrita por Mara [56]. Se introdujo el material vegetal (600 g) en el cilindro de extracción. El sistema se selló y se presurizó. Se realizaron extracciones a 3 diferentes valores de presión, que fueron 300, 400 y 500 bares, a 45°C y con un flujo de CO₂ de 20 g/min. Ello, con el fin de encontrar las condiciones de mayor rendimiento de extracción para estas especies. Este proceso tuvo una duración de 1 h; una vez alcanzado este tiempo, se despresurizó el sistema y se retiró el extracto.

Los siguientes fueron los tres pasos principales para la extracción con fluido supercrítico: (1) extracción, (2) expansión y (3) separación; los correspondientes componentes del equipo fueron: (1) un extractor de alta presión, (2) válvula de reducción de la presión y (3) un colector-separador de baja presión. Otros aditamentos son bombas de alta presión, intercambiadores de calor, medidores de densidad y flujo, válvulas manuales, etc. El material vegetal a extraer – generalmente sólido-, se depositó en el extractor de alta presión, a través de éste se hizo pasar el fluido supercrítico a las presiones establecidas. Luego, el extracto llegó a la válvula de reducción de presión en donde se alcanzaron los 50 bar, posteriormente, el extracto se llevó al separador en donde el CO₂ se dirigió a un venteo o a un sistema de reciclado para su posterior utilización, y finalmente, el extracto quedó depositado en el colector [57]. Las partes de un equipo SFE se muestran en la **Figura 11**.



Fuente: El autor.

Figura 11. Equipo de extracción con fluido supercrítico SFE 2000 (Thar Technologies, Pittsburgh, PA, EE.UU.). Principales unidades de un equipo para la extracción con fluido supercrítico: **1**-Cilindro de CO₂, **2**-Intercambiador de calor I, **3**-Flujómetro, **4**-Baño de refrigeración, **5**-Bomba, **6**-Reservorio de solvente, **7**-Bomba para co-solvente, **8**-Intercambiador de calor II, **9**-Portamuestra, **10**-Chaquetas de calentamiento, **11**-Sensor de temperatura, **12**-Válvula automática de regulación de la presión, **13**-Separador, **14**-Manómetros.

2.4 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

2.4.1 Preparación de muestras para el análisis por GC-MS. Para los AE, se adicionaron 50 μL del AE puro, 1 μL de patrón interno (*n*-tetradecano) y se aforó a 1 mL en diclorometano. Para los extractos obtenidos por SFE, se disolvieron 4 mg de cada extracto en 2 mL de diclorometano, estas disoluciones se filtraron y los filtrados se concentraron con una corriente de nitrógeno (Grupo Linde, Colombia) hasta un volumen de 0,5 mL, luego se adicionó 1 μL de patrón interno de *n*-tetradecano y se aforó a 1 mL con diclorometano.

2.4.2 Análisis de las muestras por GC-MS. El análisis de las muestras de AE y extractos de *L. origanoides* y *L. alba* se llevó a cabo por cromatografía de gases capilar en dos columnas con fases estacionarias polar y apolar, acoplados a detectores selectivos de masas. Lo anterior con el fin de identificar los componentes en extractos y aceites esenciales obtenidos a través de sus índices de retención y espectros de masas.

2.4.3 Cromatografía de gases en la columna con fase estacionaria apolar. Una vez preparadas, las muestras se sometieron a un análisis por cromatografía de gases, en un equipo *Agilent Technologies 6890 Plus* (Palo Alto, CA, EE.UU.), (Véase el **Numeral 2.1.5**).

2.4.4 Cromatografía de gases en columnas con fase estacionaria polar. Igualmente, todas las muestras se analizaron por cromatografía de gases en un equipo *Agilent Technologies 6890N Network Series GC* (Palo Alto, CA, EE.UU.), (Véase **Numeral 2.1.5**).

2.4.5 Identificación de componentes. Se calcularon los índices de retención lineales, I_R , teniendo en cuenta los t_R de una serie homóloga de sustancias de referencia, *i.e.*, hidrocarburos lineales desde C_{10} hasta C_{25} , corridos en cada uno de los cromatógrafos bajo los mismos parámetros operacionales utilizados para los AE y extractos. Para su determinación se utilizó la **Ecuación 1** [58], modificado para la escala lineal.

$$I_R = 100n + 100 * \left[\frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right] \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde $n < N$:

n = Número de átomos de carbono del n -hidrocarburo que eluye antes del compuesto de interés;

t_{Rx} = Tiempo de retención del compuesto de interés (min);

t_{Rn} = Tiempo de retención del n -hidrocarburo que eluye antes del compuesto de interés (min);

t_{RN} = Tiempo de retención del n -hidrocarburo que eluye después del compuesto de interés (min).

Los I_R calculados para las fases estacionarias polar y apolar se compararon con los I_R reportados en la literatura [59].

2.4.5.1 Cuantificación del hexanal. El análisis del derivado PFPH-hexanal se realizó en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, EE.UU.), HP 6890 *Plus*, dotado con un microdetector de captura de electrones (μ -ECD, ^{63}Ni). Las temperaturas del inyector y detector permanecieron constantes (250°C), la programación de temperatura de la columna, flujo de gas de arrastre aparecen citados en el **Numeral 2.1.5**.

La identificación del derivado hidrazónico PFPH-hexanal se realizó por comparación entre los cromatogramas de las muestras peroxidadas y el patrón PFPH-hexanal, tal como se describe en los trabajos de investigación realizados por Stashenko y colaboradores [16].

2.5 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS.

El efecto protector de los aceites y extractos se determinó midiendo la cantidad del hexanal generado durante la degradación oxidativa del ácido linoleico que, en la base cosmética, venía presente como vitamina F (ácido linoleico + ácido

linolénico). Esta medición se llevó a cabo con y sin los AE o extractos. Para realizarla fue necesario previamente hacer una curva de calibración con patrón del hexanal, calcular las figuras analíticas de mérito e implementar esta metodología para la base cosmética.

Los aceites esenciales y extractos de pronto alivio (*L. alba*, quimiotipo “carvona”) y orégano de monte (*L. origanoides*, quimiotipos “timol” y “carvacrol”) se mezclaron en relaciones 1:1 y 2:1 (Véase **Tabla 7**). El BHT y la vitamina E se adicionaron a dos muestras en cantidades recomendadas por la FDA.

2.5.1 Selección de recubrimiento de la fibra para SPME. Con base en los resultados de trabajos de investigación realizados por Stashenko y colaboradores [15-17] sobre peroxidación lipídica empleando la técnica de micro-extracción en fase sólida, se escogió una fibra de PDMS/DVB. El tiempo de saturación con agente derivatizante fue 10 min, en el espacio de cabeza de una disolución de agente derivatizante pentaflúorfenilhidracina (PFPH, 500 ppm) y el tiempo de exposición de la fibra saturada al espacio de cabeza de la muestra, para derivatizar hexanal a su respectiva hidrazona, fue de 40 min.

2.5.2 Selección de disolventes. Se prepararon tres disoluciones de PFPH de 25 ppm, en metanol, hexano y agua; se tomaron 2 mL de cada una, se depositaron en un vial de 4 mL. El frasco se selló y se expuso a la fibra en el espacio de cabeza durante 10 min, y luego la fibra se desorbió en el puerto de inyección a 260°C; esto con el fin de determinar con qué solvente se obtenía mayor cantidad de PFPH adsorbido en la fibra.

2.5.3 Preparación de la hidrazona. La hidrazona del hexanal se preparó a partir de una disolución acuosa de PFPH (500 ppm), de la cual se tomaron 2 mL que se depositaron en un vial de 4 mL. La mezcla se dejó 5 min en agitación, a 750 rpm.

Luego, la fibra de PDMS/DVB se expuso al espacio de cabeza del vial durante 10 min, mientras la mezcla se agitaba a una velocidad de 750 rpm, para garantizar

tanto la homogeneización de la disolución como también para lograr el equilibrio a un tiempo más corto.

Después de saturar la fibra con el agente derivatizante, ésta se expuso al espacio de cabeza de cada uno de los viales con las respectivas disoluciones estándar del hexanal. Las concentraciones del hexanal fueron: 0.01, 0.07, 0.5, 1, 2, 4, 25, 50, 80, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 350 y 400 ppm. Después de este periodo de exposición de la fibra a cada una de las disoluciones se procedió a la cuantificación del derivado hidrazónico por GC-ECD, así como se describe en el **Numeral 2.4.5.1.**

2.5.4 Estudio de repetitividad, niveles mínimos de cuantificación y detección.

2.5.4.1 Determinación de la repetitividad de áreas. La repetibilidad del método cromatográfico se evaluó en términos del coeficiente de variación (CV, %, **Ecuación 2**) [60]. De los patrones del hexanal tomados se escogió el patrón de 25 ppm, ya que de los puntos de la curva de calibración evaluados, éste era de la mayor pendiente. Entonces, se procedió a realizar un quintuplicado de esta concentración con el fin de determinar el coeficiente de variación en la medición de áreas, según las ecuaciones 2-4:

$$CV, \% = \frac{\bar{X}}{S} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2 \dots X_n}{n} \quad \text{Ecuación 3}$$

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{n-1}^n (X_i - \bar{X})^2} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

\bar{X} = Promedio de los datos

s = Desviación estándar

2.5.4.2 Determinación de los niveles mínimos de detección (NMD) y de cuantificación (NMC). Se disminuyó la concentración del hexanal a derivatizar, hasta llegar a la señal analítica mínima discernible, con una relación señal/ruido (S/N) de 3:1.

Con tres veces la desviación estándar del valor de la señal del blanco se estableció la menor cantidad de muestra que pudo ser detectada y diferenciada de un blanco (Véase **Ecuación 5**).

$$\text{NMD} = \frac{kS_B}{m} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde S_B es la desviación estándar del blanco, m la pendiente y k es un valor que se elige de acuerdo con el nivel de confianza que se desee, generalmente 3.

A partir de los datos obtenidos del NMD, se calculó este parámetro por medio de la ecuación:

$$\text{NMC} = \frac{kS_B}{m} \quad \text{Ecuación 6}$$

El nivel mínimo de cuantificación se definió para un valor de $k=10$ [60].

2.5.4.3 Evaluación del rango dinámico lineal (RDL). El RDL y la sensibilidad del método se calcularon empleando la curva de calibración realizada en el intervalo de concentraciones de 0,5 a 25 ppm. El RDL se determinó evaluando el rango de concentraciones en que la respuesta del detector es lineal, y se reportó como el coeficiente de correlación de la curva de calibración. La sensibilidad se reportó como la pendiente de la curva a un nivel de confianza del 95%.

2.6 PROCEDIMIENTO PARA LA OXIDACIÓN DE LA BASE COSMÉTICA

2.6.1 Blanco. En un vial de 10 mL para SPME se adicionaron 1 mL de base cosmética, 1 mL de *buffer* Trizma [trizma 0,25 mM, KCl 0,75 mM y dodecil sulfato de sodio (SDS) 2 g/L, pH 7,4]; esta mezcla se homogeneizó en un equipo

Ultraturrax (5000-25000 rpm, Staufen, Alemania) durante 1 min. La disolución final se dejó en incubación a 37 ± 1 °C durante 12 horas. Al final de la incubación, la mezcla fue enfriada por 10 min en un baño de agua/hielo; a la emulsión simultáneamente fueron agregados 100 μ L de la disolución de BHT (antioxidante) en metanol (2% p/v = 84,7 mM), según se describe en el trabajo [27].

2.6.2 Muestra con BHT, vitamina E, AE o extracto (A_a). Esta reacción consistió en prevenir la oxidación de la muestra de desodorante. En un vial de 10 mL para SPME se adicionaron la base cosmética (1 mL), *buffer* Trizma (1 mL) [trizma 0,25 mM, KCl 0,75 mM y dodecil sulfato de sodio (SDS) 2 g/L, pH 7,4], una solución acuosa (0,5 mL) de sulfato de hierro (0,56 g/L) y 2 mg de BHT. La mezcla se homogeneizó de la misma manera como se realizó en el **Numeral 2.6.1**.

En la **Tabla 7** se muestra las cantidades de AE y extractos agregados tanto de manera individual, como en mezclas binarias AE-AE y E-E, en relación 1:1 y 2:1.

Tabla 7. Cantidades adicionadas de AE, extractos, BHT y vitamina E en las bases cosméticas, en mg/g.

PLANTA	EXTRACTOS,	
	mg/g	AE, mg/g
<i>L. origanoides</i> , timol (LOT)	1	1
<i>L. origanoides</i> , carvacrol (LOC)	1	1
<i>L. alba</i> , carvona (LAC)	1	1
LAC y LOT	1:1	1:1
LOC y LAC	1:1	1:1
LOT y LOC	1:1	1:1
LAC y LOT	2:1	2:1
LOC y LAC	2:1	2:1
LOT y LOC	2:1	2:1
BHT	0,5	0,5
Vitamina E	5	5

En la **Tabla 7** se muestra la relación AE:AE y Extracto:Extracto adicionados a la base cosmética, los dos puntos que aparecen separando los números, indican la relación en cantidades añadidas en mg/g de AE y extracto, es decir, que una

mezcla de LAC y LOT 2:1, significa que en proporciones hay 2 mg/g del AE o extracto de *L. alba*, carvona (LAC) y 1 mg/g de AE o extracto de *L. origanoides*, timol (LOT).

2.6.3 Derivatización del hexanal sobre la fibra y su extracción simultánea por HS-SPME. Este procedimiento se realizó en la fase vapor de la base cosmética de desodorante en gel, de acuerdo con la metodología descrita por Stashenko y colaboradores [27]. La única diferencia consistió en que se cambió la matriz del ácido linolénico y la disolución tampón por la base cosmética en gel.

Primero, se saturó la fibra [poli-(dimetilsiloxano)/divinilbenceno, PDMS/DVB 65 μm] con agente derivatizante, PFPH, exponiéndola a los vapores de una disolución acuosa de PFPH (500 ppm, 2 mL), durante 10 min a temperatura ambiente (25°C) y con agitación (750 rpm). De inmediato, la fibra saturada se colocó por 40 min a la misma temperatura en el espacio de cabeza de una de las muestras (base cosmética + *buffer* Trizma + FeSO_4 + BHT) sometida a peroxidación, según los procedimientos descritos en las secciones anteriores. Una vez derivados sobre la fibra los compuestos carbonílicos, se desorbieron térmicamente en el puerto de inyección del cromatografo de gases equipado con el detector $\mu\text{-ECD}$, durante 5 min a 250°C [15-18].

2.6.4 Determinación de la actividad antioxidante. El hexanal, producto final principal de la degradación oxidativa del ácido linolénico y marcador del avance del proceso de peroxidación [8], fue medido en fase vapor, usando la fibra SPME (PDMS/DVB, 65 μm), previamente saturada con PFPH a temperatura ambiente durante 40 min; la extracción-derivación directa del hexanal sobre la fibra sucedió así como se describe en los trabajos de Stashenko y colaboradores [27]. El efecto protector de aceites esenciales y extractos se calculó, según la Ecuación 7:

Grado de protección:

$$AA\% = \frac{[A_o - A_a]}{A_o} \times 100\% \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde:

A_0 : Área del pico cromatográfico del hexanal de la base cosmética (blanco).

A_a : Área del pico del hexanal en el sistema lipídico (base cosmética) con BHT, vitamina E, AE o extracto añadido.

3 ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN

En la **Tabla 8**, se muestran las extracciones por SFE-CO₂, de *L. alba*, quimiotipo “carvona”. Las extracciones se realizaron inicialmente a 4 diferentes presiones, con el fin de obtener un mínimo de 10 g de extracto (Véase **Tabla 8**). Luego de encontrar la presión a la cual se obtuvo la mayor cantidad de extracto de *L. alba*, se procedió a hacer la extracción para la obtención de los extractos de *L. origanoides*, quimiotipo “timol” y *L. origanoides*, quimiotipo “carvacrol”; para esto, se partió desde las condiciones de mayor rendimiento para la *L. alba* (400 bar) y se realizaron dos extracciones a 100 bares por debajo y 100 bares por encima de la presión establecida (**Tabla 8**). Se obtuvieron para ambos quimiotipos de *L. origanoides* rendimientos mayores que los de sus AE.

Tabla 8. Condiciones establecidas para la extracción con fluido supercrítico, para las especies bajo estudio.

ESPECIE	Extracto	Rendimiento, %	Presión, Bar	Temperatura, °C	Flujo g/min	Tiempo, Horas
<i>L. alba</i> , “carvona”	1	0,0	81	45	10	2
	2	0,1	116	45	20	2
	3	0,8	300	45	20	2
	4	1,2	400	45	20	1
<i>L. origanoides</i> , “carvacrol”	1	3,2	300	45	30	1
	2	2,8	400	50	30	1
	3	3,6	500	50	30	1
<i>L. origanoides</i> , “timol”	1	4,3	300	45	30	1
	2	3,5	400	50	30	1
	3	4,1	500	50	30	1

Fuente: El autor.

En la **Tabla 8** las partes sombreadas en gris, corresponden a los rendimientos más altos de los extractos obtenidos por SFE-CO₂.

Para la extracción, inicialmente, se siguió la metodología descrita por Mara [57], pero, los rendimientos de las especies estudiadas no eran suficientes para poder obtener una cantidad necesaria del extracto que se pudiera pesar, puesto que el equipo no permitía alcanzar flujos de CO₂ bajos a las condiciones de presión y temperaturas establecidas en el artículo, en donde se obtenía un extracto rico en volátiles (*essential extract*); por ello, progresivamente se fue aumentando la presión, manteniéndose la temperatura y el flujo constantes; esto se observa en la **Tabla 9**, que, conforme se pasa del extracto 1 al extracto 3, el rendimiento de *L. alba*, quimiotipo “carvona”, incrementa y, como consecuencia, se obtiene una cantidad de extracto suficiente para pesarlo.

En la **Tabla 9** se muestran los rendimientos de las plantas cosechadas en el Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM; cada una de sus destilaciones se realizó por triplicado (Véase **Tabla 9**). Las condiciones empleadas para la destilación siguieron la metodología descrita por Stashenko y colaboradores [39].

Los rendimientos para los AE obtenidos, se hallaron dividiendo los pesos de los AE sobre el peso del material vegetal usado, de cada una de las plantas; para los extractos, éstos se calcularon dividiendo el peso del extracto sobre el material previamente secado.

Tabla 9. Rendimientos de aceites esenciales obtenidos por MWHD y extractos aislados por SFE-CO₂.

ESPECIE	Rendimiento, %			
	AE (n=3)	Extracto 1	Extracto 2	Extracto 3
LA, “carvona”	2,21±0,09	0,1	0,8	1,2
LO, “carvacrol”	2,6±0,5	3,2	2,8	3,6
LO, “timol”	1,7±0,22	4,3	3,5	4,1

Fuente: El autor.

3.2 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

3.2.1 Análisis de la composición química de los aceites esenciales. Los AE fueron analizados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, GC-MS, usando parámetros operacionales descritos en la **Sección 2.4** de la Parte Experimental. En la **Tabla 10** aparecen la cantidad relativa e identificación de los principales componentes de los aceites esenciales de *L. origanoides*, quimiotipos “timol” y “carvacrol” y de *L. alba*, quimiotipo “carvona”.

Tabla 10. Cantidad relativa (%) e identificación de los principales componentes de los aceites esenciales de *L. alba* y *L. origanoides*.

Compuesto	I _R		Cantidad relativa,%		
	DB-5	DB-WAX	<i>L. origanoides</i>		<i>L. alba</i>
			“Timol”	“Carvacrol”	“Carvona”
α-Tuyeno	925	1023	0,6	2,2	-
β-Mirceno	990	1152	2,8	3,2	0,6
α-Terpineno	1029	1164	1,9	3,8	-
p-Cimeno	1025	1269	8,8	18	-
Limoneno	1031	1196	0,5	0,6	24,5
γ-Terpineno	1060	1240	7,0	17,3	-
cis-p-Menta-2,8-dien-1-ol	1142	1873	-	-	0,9
Metil timil éter	1226	1589	3,8	2,8	-
Carvona	1260	1753	-	-	30,8
Isopiperitenona	1279	1856	-	-	1,6
Timol	1293	2182	47,4	4,1	0,1
Carvacrol	1304	2210	2,9	26,6	-
Eugenol	1359	2180	1,6	0,2	2,5
Acetato de carvacrilo	1370	1882	-	1,9	0,2
β-Bourboneno	1396	1528	-	-	5,0
Acetato de timilo	1350	1866	8,2	-	-
Eugenol	1359	2180	1,6	-	2,5
trans-β-Cariofileno	1428	1597	4,7	20,4	-
trans-β-Farneseno	1457	1669	-	-	1,9
α-Humuleno	1464	1674	1,4	14,8	-
γ-Gurjuneno	1476	1739	-	-	1,3
Biciclosesquifelandreno	1498	1727	-	-	20,8
Biciclogermacreno	1510	1705	-	-	1,5

Fuente: El autor.

Para los dos quimiotipos de *L. origanoides* y para la *L. alba* se observa, que poseen un contenido de sesquiterpenos oxigenados bajo (Véase **Tabla 11**), característica que lo hace un buen aceite para la industria cosmética, puesto que muchos de los problemas dermatológicos que generan productos cosméticos es por causa de este tipo de moléculas [55].

Tabla 11. Cantidad relativa (%) de compuestos, clasificados por familias, en los aceites esenciales de *L. alba* y *L. origanoides*.

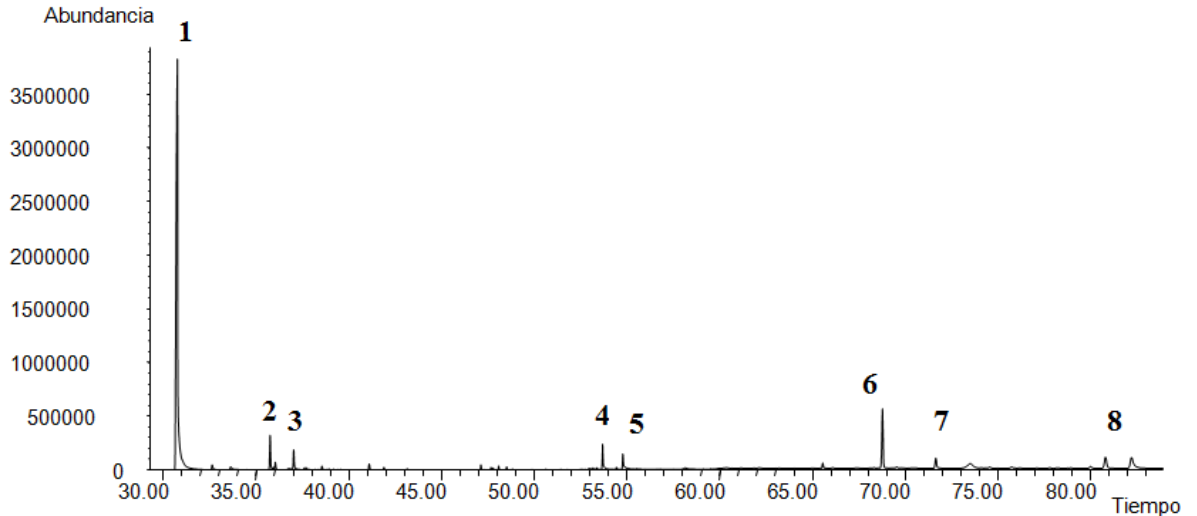
Familia de compuestos	Siglas	Cantidad relativa, %		
		<i>L. origanoides</i> “Timol”	“Carvacrol”	<i>L. alba</i> “carvona”
Hidrocarburos monoterpénicos	HM	11,2	39,8	34,5
Monoterpenos oxigenados	MO	1,4	3,7	44,3
Hidrocarburos sesquiterpénicos	HS	7,6	3,4	19,4
Sesquiterpenos oxigenados	SO	0,3	0,6	1,1
Fenilpropanos	FP	79,0	51,5	-
Otros compuestos oxigenados	CO	0,7	1	0,8

Fuente: El autor.

3.2.2 Análisis de la composición química de los extractos SFE-CO₂

3.2.2.1 Extracto de *L. origanoides*, quimiotipo “timol”. El análisis cromatográfico de los extractos obtenidos por SFE con CO₂, se llevó a cabo con la misma metodología que se usó para los aceites esenciales. Los resultados obtenidos en la columna apolar hacen una aproximación al perfil composicional de los extractos.

En la **Figura 12** aparece el perfil cromatográfico típico del extracto obtenido por SFE-CO₂ de hojas, tallos e inflorescencias de *L. origanoides*, quimiotipo “carvona”. En la **Tabla 12** se registran los componentes mayoritarios aislados e identificados por GC-MS, según el orden de elución en la columna DB-5, junto con sus índices de retención y cantidades relativas (%) para cada uno de los experimentos.



Fuente: El autor.

Figura 12. Perfil cromatográfico típico del extracto de *L. origanoides*, quimiotipo timol, obtenido por GC-MS (EI, 70 eV) en la columna con fase estacionaria apolar DB-5 (60 m).

La **Tabla 12** y la **Figura 12**, muestran que fue posible identificar cuatro compuestos, con base en sus índices de retención experimentales comparados con los reportados en la literatura [59], de los cuales, el componente mayoritario fue el timol, que proporciona el olor característico al extracto obtenido. En cuanto al color marrón del extracto, éste puede deberse a sustancias tipo fenólico y pigmentos, además pueden estar presentes ácidos grasos o terpenoides de más de 15 ó 20 átomos de carbono, lo que evidencia también la textura grasosa del extracto. Por ello, será necesario en trabajos posteriores, emplear otros métodos instrumentales que permitan identificar este tipo de moléculas presentes en el extracto, por ejemplo, la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), método, con el cual no se contaba en el momento de realizar este trabajo.

Tabla 12. Cantidad relativa (%) e identificación de los principales componentes del extracto obtenido por SFE-CO₂ de *L. origanoides*, quimiotipo “timol”.

N° Pico*	Compuesto	I _R	Cantidad relativa, %
		Columna apolar	
1	Timol	1293	69,1
2	Acetato de timilo	1350	3,0
3	Eugenol	1359	0,7
4	<i>trans</i> -β-Cariofileno	1428	1,6
5	Difenil hidrofurano	ND	2,2
6	Tetracoseno, C ₂₄	ND	7,1
7	Vitamina E	ND	1,4
8	Hidrocarburo lineal de treinta C, C ₃₀	ND	2,5

ND- No determinado.

* **Figura 12.**

Fuente: El autor.

3.2.2.2 Extracto de *L. alba*, quimiotipo “carvona”. El análisis cromatográfico de los extractos de esta planta, obtenidos por SFE con CO₂, se llevó a cabo con la misma metodología que se usó para los aceites esenciales. Los resultados obtenidos en la columna de fase estacionaria apolar (DB-5, 60m), permiten obtener el perfil composicional del extracto.

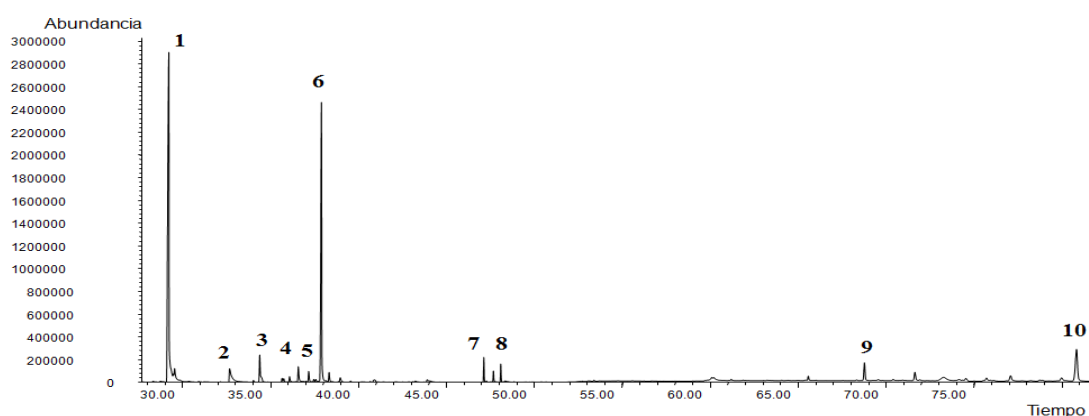


Figura 13. Perfil cromatográfico típico del extracto de *L. alba*, quimiotipo “carvona”, obtenido por GC-MS (EI, 70eV) en la columna con fase estacionaria apolar DB-5 (60m).

Se identificaron seis componentes de los 10 detectados, con base en sus espectros de masas e índices de retención experimentales comparados con los reportados en la literatura [59]. Los componentes mayoritarios fueron la carvona y el bicicosesquifelandreno un sesquiterpeno (Véase **Tabla 13**).

Tabla 13. Cantidad relativa (%) e identificación de los principales componentes del extracto obtenido por SFE-CO₂ de *L. alba*, quimiotipo “carvona”.

Nº Pico*	Compuesto	I _R	Cantidad relativa, %
		Columna apolar	
1	Carvona	1260	37,1
2	Piperitenona	1267	2,1
3	β-Bourboneno	1396	2,4
4	<i>trans</i> -β-Farneseno	1457	1,2
5	<i>allo</i> -Aromadendreno	1459	0,7
6	Biciclosesquifelandreno	1498	20,7
7	ND	ND	1,2
8	3,7,11,15-tetrametil-fitol	ND	0,9
9	Triacontano	ND	1,8
10	Tetracontano	ND	1,6

ND- No determinado

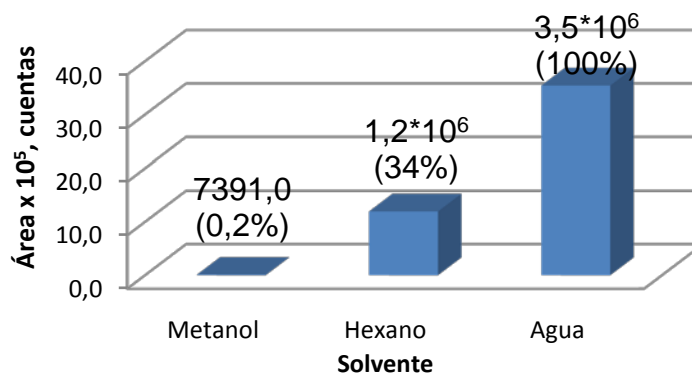
* **Figura 13.**

3.2.3 Selección del recubrimiento de la fibra y determinación de tiempos de equilibrio. La fibra con el recubrimiento de PDMS/DVB se escogió debido a su alta capacidad de atrapamiento del agente derivatizante e hidrazona derivatizada; el tiempo de saturación escogido para la fibra fue de 40 min., según estudios realizados por Puertas [8] y Stashenko y colaboradores [16].

La concentración de PFPH empleada fue de 500 ppm, porque a mayor concentración de agente derivatizante, menor tiempo se deja la fibra en el espacio de cabeza, por tanto, se logra su saturación en un menor tiempo debido a la mayor cantidad de moléculas en la fase vapor [17].

3.2.4 Determinación del solvente. Se procedió a hacer selección del disolvente para la disolución de la PFPH; en trabajos de diferentes autores [8, 14] empleaban

metanol, hexano o agua. Como muestra la **Figura 14**, el mejor solvente para el presente análisis fue el agua, puesto que la fibra en el espacio de cabeza de la disolución acuosa, adsorbe una cantidad de PFPH de hasta 3 veces mayor que cuando se usa el hexano, cuando se emplea el mismo tiempo de exposición de la fibra al disolvente (10 min), El agua genera también una menor interferencia, mientras que el metanol y el hexano retienen a la PFPH, o tienen mayor afinidad por la fibra, presentando como resultado una menor área cromatográfica de 7391 y $1,2 \cdot 10^6$ cuentas de PFPH, respectivamente, comparado con el de agua, $3,5 \cdot 10^6$ cuentas (**Figura 14**).



Fuente: El autor.

Figura 14. Comparación de las áreas cromatográficas (en cuentas) de la PFPH empleando 3 diferentes disolventes. Tiempo de exposición 10 min.

En la **Figura 14** se observa que el metanol sólo permite que pase al espacio de cabeza el 0.2% de PFPH, mientras que en el hexano el 34% pasa a la fase vapor.

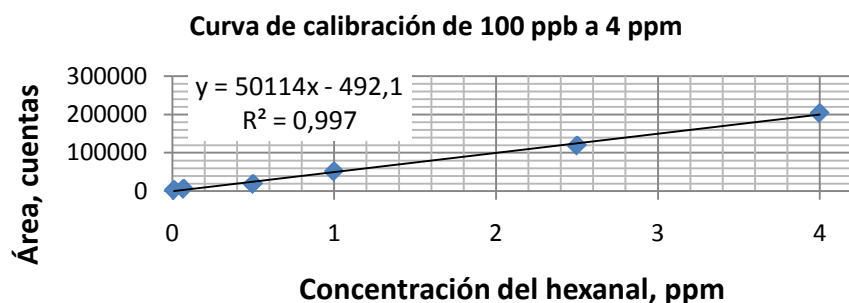
3.2.5 Curva de calibración. La curva de calibración del hexanal se realizó en un intervalo de concentraciones de 10 ppb hasta 300 ppm (Véase **Tabla 14, Figuras 16 y 17**), 18 mediciones de diferentes concentraciones del hexanal fueron hechas, de las cuales se tomaron 16, porque las dos últimas concentraciones (350 y 450 ppm) generaban la saturación del detector debido a la sensibilidad alta del mismo. Como consecuencia, aparece un “corte” en la parte superior del pico

cromatográfico (se encuentra fuera de la escala de señal empleada para otras concentraciones).

Tabla 14. Valores de área (cuentas) y concentración (ppm) para la curva de calibración del hexanal.

Hexanal, ppm	ÁREA, cuentas	Hexanal, ppm	ÁREA, cuentas
0,01	2720	80	1509641
0,07	5861	100	1714316
0,5	19165	125	1905919
1	51379	160	2033487
2,5	119210	200	2206684
4	203630	250	2356127
15	468917	300	2420776
25	729698	350	2582234
50	1159422	400	2824111

En la **Figura 15**, se observa un comportamiento lineal conforme se aumenta la cantidad del hexanal adsorbido sobre la fibra, pero llega un momento en el que a partir de la concentración de 50 ppm la linealidad empieza a perderse (Véase **Figura 16**).



Fuente: El autor.

Figura 15. Intervalo de concentraciones de 100ppb a 4 ppm de la curva de calibración del hexanal, obtenida por GC- μ -ECD.

Esta pérdida de la linealidad hizo que no fuera posible determinar un rango dinámico lineal de la totalidad de los puntos, pero sí, de pequeños segmentos de la curva, que tendrían un comportamiento lineal. Para este caso, se usó un rango dinámico lineal (RDL) del hexanal en las concentraciones que iban desde 1 ppb hasta 4 ppm.

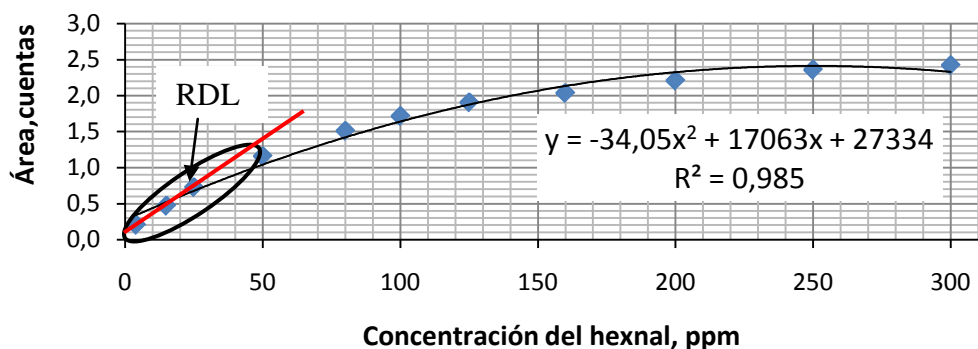


Figura 16. Intervalo de concentraciones de 4-300 ppm de la curva de calibración del hexanal, obtenida por GC- μ -ECD.

Los múltiples segmentos lineales graficados, muestran un comportamiento que se aleja de la linealidad, tal como se expone en la **Figura 16**. Se escogió un RDL entre 2,5 y 25 ppm, debido a que la concentración del hexanal en las diferentes muestras de las bases cosméticas estuvo variando dentro de un rango de áreas cromatográficas asociado a estas concentraciones (Véase **Figura 16**).

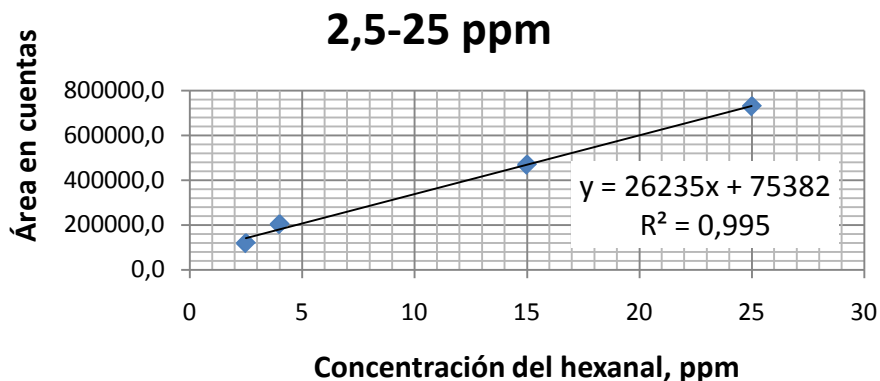
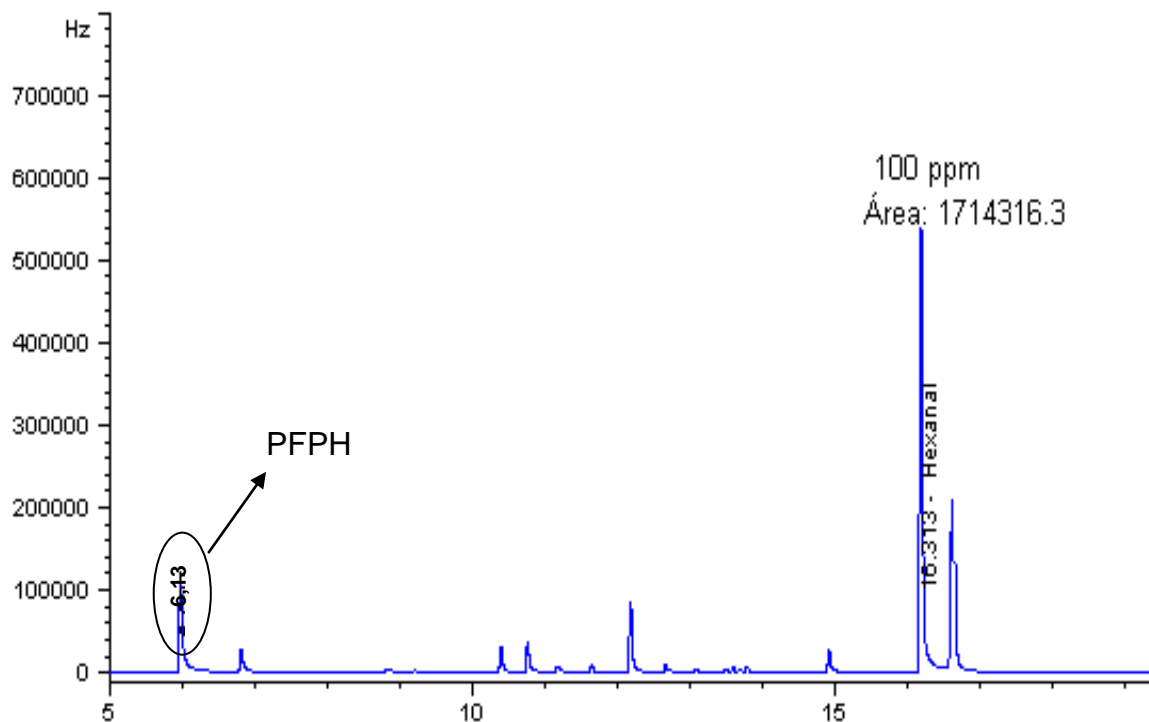


Figura 17. Intervalo de concentraciones de 2,5-25 ppm de la curva de calibración del hexanal, obtenida por GC- μ -ECD.

En el cromatograma (Véase **Figura 18**), con el tiempo de retención de 6 min, aparece el pico cromatográfico correspondiente a la PFPH, y a un tiempo de 16,3 min, se observa el de la pentafluórfenilhidrazona, producto de la reacción del hexanal (100 ppm) con la hidracina.



Fuente: El autor.

Figura 18. Cromatograma típico obtenido mediante GC- μ -ECD del derivado PFPH del hexanal (100 ppm) en la columna con fase estacionaria apolar HP-5 (30 m).

3.2.6 Determinación de las figuras analíticas de mérito. Para hallar el nivel mínimo de detección (NMD), se disminuyó la concentración del hexanal a derivatizar, hasta llegar a una señal del detector mínima discernible, correspondiente a una relación señal/ruido (S/N) de 3:1.

En la **Tabla 15**, se observa que el coeficiente de variación, CV, no superó el 4%, para la medición de áreas; lo que se encuentra dentro de lo recomendado por las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP, *Good Laboratory Practice*) [60] e indicando una buena repetitividad.

Tabla 15. Valores estadísticos encontrados en la implementación de la metodología para determinar el hexanal, empleando GC- μ -ECD.

FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO	
Área promedio (25 ppm), cuentas	771859
Varianza, cuentas	30589
Limite de confianza, 95%	76030
Coefficiente de variación, %	4,0
Rango dinámico lineal (RDL), ppm	2,5-25
S/N	3:1
NMD, ppb	5
NMC, ppb	15

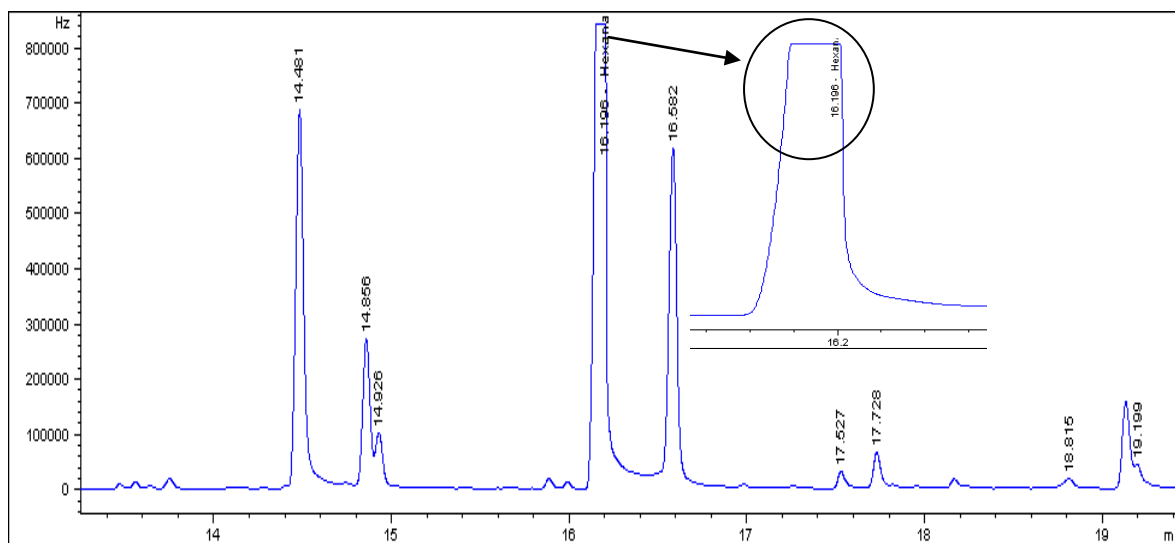
3.2.6.1 Evaluación del RDL. El rango dinámico lineal se determinó con base en los datos obtenidos de la curva de calibración. En la **Figura 18**, se muestra la ecuación de ese segmento de la curva de calibración, el coeficiente de determinación, R^2 , que midió el ajuste de la curva para el rango de concentraciones evaluado (2,5-25 ppm), la pendiente de la curva fue el factor de respuesta, R_f , y la sensibilidad se reportó como la pendiente de la curva a un nivel de confianza del 95%. El $R^2=0,995$, para la curva de calibración en el rango escogido, indicó un alto ajuste a los al rango lineal para el intervalo de concentraciones escogidas.

Las figuras analíticas de mérito encontradas, mostraron que la metodología garantizó la medición reproducible del hexanal 5–15 ppb; la cual, fue una concentración insuficiente para ser detectada por el olfato del consumidor en un producto cosmético; en cambio, un rango de concentraciones de 4-300 ppm, fue una cantidad suficiente para generar un olor poco agradable; además permitió lograr resultados confiables para la determinación de concentraciones del aldehído en el rango estipulado (CV=4,0 %).

3.3 OXIDACIÓN DE LA BASE COSMÉTICA INDUCIDA POR IONES Fe^{2+}

A continuación, se presentan los resultados de la medición de la actividad antioxidante (antirradicalaria), de los aceites y de los extractos de las plantas estudiadas. Las cantidades tenidas en cuenta para adicionar a los aceites y los extractos se basaron en las cantidades mostradas en la **Tabla 9**, las cuales se establecieron por debajo de la dosis tóxica dérmica [61].

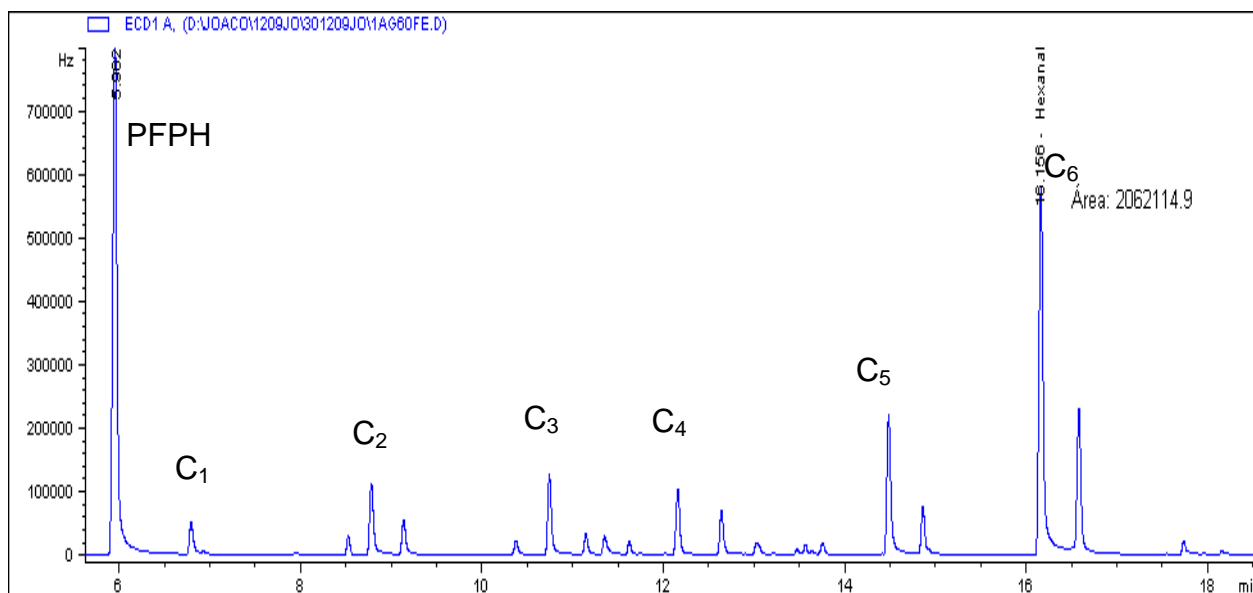
3.3.1 Pruebas previas. Antes de iniciar la oxidación de las bases cosméticas, se procedió a hacer pruebas con aceite de girasol. Éste se evaluó siguiendo la misma metodología empleada con los AE y los extractos. Las pruebas que se llevaron a cabo con el aceite de girasol se iniciaron sin la adición del *buffer*. Pero se comprobó que la adición de éste fue necesaria, para controlar la reacción y para poder tener una cantidad del hexanal cuantificable, puesto que si se emplean las cantidades descritas el **Numeral 2.6**, para el SDS, la reacción se desplazaba hacia la formación del aldehído, en cantidades que impedían su cuantificación, ya que el detector se saturaba.



Fuente: El autor.

Figura 19. Perfil cromatográfico de la hidrazona (PFPH) del hexanal, generado en el aceite de girasol, oxidado por el reactivo tipo Fenton, sin la adición de *buffer*, obtenido por GC- μ -ECD, en la columna con fase estacionaria apolar HP-5 (30 m).

Si se adicionaba el *buffer* al aceite de girasol, al cabo de 12 horas la reacción producía cantidades del hexanal medibles y que no generaban la saturación del detector. Lo observado puso en evidencia la utilidad de emplear el *buffer* para las muestras de desodorante.



Fuente: El autor.

Figura 20. Cromatograma de la hidrazona (PFPH) del hexanal, generado en el aceite de girasol, oxidado por el reactivo tipo Fenton, con la adición de *buffer*; obtenido por GC- μ -ECD en la columna con fase estacionaria apolar HP-5 (30 m).

3.3.2 Implementación de la metodología en las muestras de desodorante. La vitamina E y BHT se adicionaron al desodorante en concentraciones de 5 mg/g y 0,5 mg/g, respectivamente. Estas cantidades son típicas y se emplean en la industria para proporcionar un efecto protector (antioxidante) a los productos cosméticos.

3.3.2.1 Aceites en desodorante. Los aceites de *L. organoides*, quimiotipos “timol” y “carvacrol”, tienen un efecto antioxidante superior al del BHT e inferior al de la vitamina E (Véase **Tabla 21**). En trabajos realizado por Salgar [62], el autor muestra que en los aceites estudiados, las AAO que obtuvieron para los AE son

inferiores a las de las sustancias antioxidantes empleadas (vitamina E y BHT) y solo en el orégano común, romero y el cilantro se observaron AAO similares a las del presente estudio.

Tabla 16. Determinación de la actividad antioxidante (antirradicalaria) de los aceites esenciales y las mezclas de las especies vegetales estudiadas.

MUESTRA	AAO, %	S (n=3)	CV%	Hexanal, ppm	S (n=3)	CV%
Blanco				111	4,4	3,9
LOT (timol)	84	1,1	1,3	8,0	0,3	3,8
LOC (carvacrol)	84	1,3	1,5	7,6	0,5	6,3
LAC (carvona)	74	1,3	1,8	14,3	0,2	1,6
LAC:LOT 1:1	86,3	0,6	0,7	6,2	0,1	1,5
LAC:LOT 2:1	85	3,1	3,6	7	1,7	23,7
LOC:LAC 1:1	85	1,7	2,0	6,8	0,8	11,5
LOC:LAC 2:1	91	4,6	5,0	3	2,8	2,5
LOT:LOC 1:1	88	2,3	2,6	5	1,2	22,2
LOT:LOC 2:1	86	2,6	3,0	6	1,4	22,7
BHT(0,5 mg/g)	75	5,7	7,5	9,1	0,4	3,9
VIT E (5 mg/g)	87	2,0	2,3	5,3	0,4	8,0

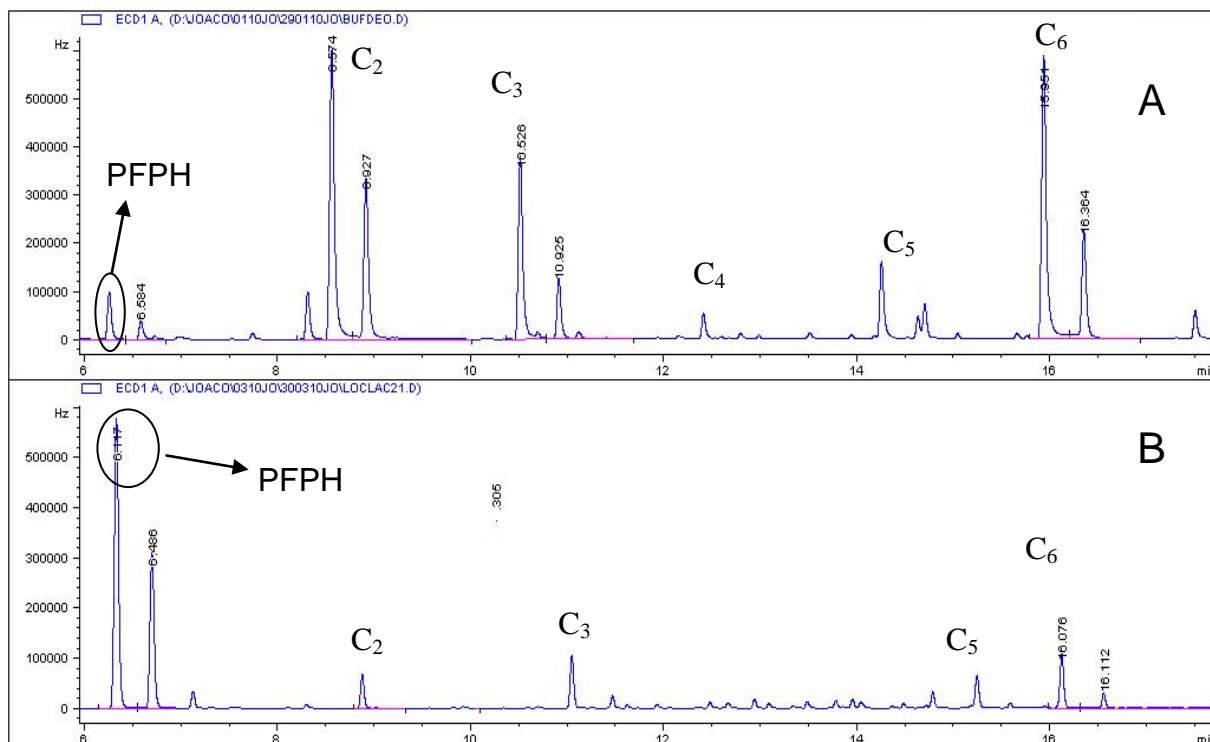
En la **Tabla 16** se puede apreciar que los AE adicionados al desodorante de manera individual, exhibieron una alta AAO que superó a la del BHT, aunque no alcanzó la AAO de la vitamina E. No todos los desodorantes modificados con mezclas de AE mostraron un efecto aditivo puesto que sus AAO en mezcla alcanzaron a estar en el mismo rango de variación que los aceites individuales. En la **Tabla 16** (columna del hexanal), la concentración más alta del hexanal fue en la muestra desodorante con *L. alba* (14,3 ppm), correspondiente a una AAO de 74,0%. La cantidad del hexanal de la primera fila (111 ppm) corresponde a la reacción llevada a cabo sin la adición de algún tipo de antioxidante (blanco).

El desodorante con la mezcla 2:1 de AE de *L. origanoides*, quimiotipo “carvacrol” y *L. alba*, quimiotipo “carvona”, añadida exhibió una AAO del 91%. De todas las mezclas presentes en la **Tabla 16**, ésta es la única que se amerita agregar para someterla luego a un análisis antibacteriano, ya que la *L. alba* aumenta un 10% la AAO. Las otras AAO de las mezclas, se encuentran dentro del rango del coeficiente de variación de los aceites adicionados individualmente. La cantidad de AE adicionado se puede ver en la **Tabla 22 (Anexo 3)**.

El desodorante con la mezcla de *L. alba* y *L. origanoides*, quimiotipo “carvacrol”, 1:1, exhibe una AAO (85,3%), sin descubrir ningún efecto aditivo, ya que es como si sólo se hubiera adicionado el AE del quimiotipo “carvacrol”.

La baja actividad antioxidante (antirradicalaria) del desodorante con LAC, se debe probablemente al alto contenido en monoterpenos oxigenados e hidrocarburos monoterpénicos y el contenido bajo de fenilpropanos, que son principales responsables de la actividad antioxidante alta en LOT y LOC [18].

En las diferentes reacciones de oxidación en el desodorante, al cual se añadieron aceites o extractos, fue típico encontrar que la formación del hexanal era baja (**Figura 21, B**). En el blanco (**Figura 21, A**) se observa la aparición de otros picos que corresponden a aldehídos derivados de la peroxidación; esto sucede porque se encuentran en la mezcla otros lípidos que hacen parte de la composición (Véase **Tabla 3**). Por ejemplo, cuando se adiciona el aceite esencial o el extracto, hubo un efecto protector no sólo para el ácido linoleico, sino también para otros ácidos grasos.



Fuente: El autor.

Figura 21. A. Muestra del desodorante oxidado en la presencia del reactivo Fenton, sin adición de aceites esenciales. **B.** Muestra del desodorante con adición de LOC: LAC, en proporción de 2:1. GC- μ -ECD en la columna con fase estacionaria apolar HP-5 (30 m).

En el cromatograma (**Figura 21 B**) se puede observar que el efecto inhibitor de la formación de aldehídos, no sólo es para el hexanal, ya que se obtiene toda una familia de aldehídos que se generan en diferentes cantidades (**Figuras 5 y 6**). Comparando la **Figura 21A**, con la **21B**, se puede apreciar la reducción de los aldehídos presentes en la base cosmética, para el hexanal se observa una reducción del 91%, lo que indica un efecto antioxidante de los AE alto.

3.3.2.2 Extractos en desodorante.

El desodorante con la LAC (**Tabla 17**), exhibió la concentración más alta del hexanal formado en la bases cosmética modificada (19 ppm), y las mezclas de

LAC:LOT (1:1) y LOC:LAC (2:1), las que presentaron la menor concentración del hexanal, por lo tanto, una AAO (antirradicalaria) alta (92%).

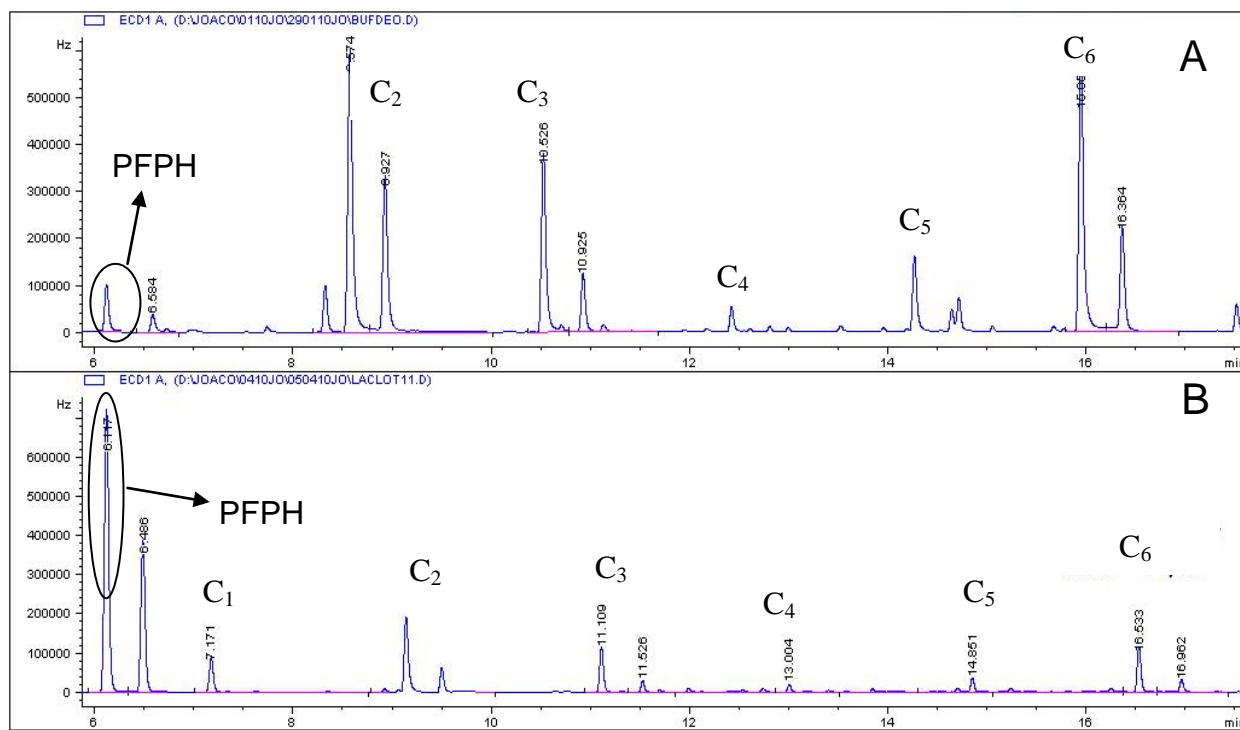
Tabla 17. Determinación de la actividad antioxidante (antirradicalaria) de la base cosmética con los extractos SFE-CO₂ de las especies evaluadas.

MUESTRA	AAO, %	S (n=3)	CV%	Hexanal, ppm	S (n=3)	CV%
Blanco				111	4,4	3,9
LOT	87	2,42	2,79	6	1,76	27,92
LOC	86	1,38	1,60	6,6	0,83	12,71
LAC	69	2,6	3,8	19	1,6	8,5
LAC:LOT 1:1	92	1,4	1,5	2,8	0,9	31,7
LAC:LOT 2:1	89	1,8	2,0	5	1,1	25,3
LOC:LAC 1:1	80,2	0,8	1,0	10,7	0,4	3,9
LOC:LAC 2:1	92	1,5	1,7	3	1,0	7,0
LOT:LOC 1:1	86	1,7	2,0	7	1,1	15,7
LOT:LOC 2:1	89	1,0	1,1	4,5	0,8	17,4
BHT (0,5 g/kg)	75	5,7	7,5	9,1	0,4	3,9
VIT E (5 g/kg)	87	2,0	2,3	5,3	0,4	8,0

Nuevamente, se observa que en las mezclas de desodorante con *L. alba*, a excepción de la mezcla con *L. origanoides*, quimiotipo “carvacrol” (LAC:LOT, 1:1), se presenta un efecto aditivo en la actividad antioxidante. Este resultado es interesante porque las mezclas con estas plantas resultan ser una potencial combinación de antioxidante-antibacteriano para bases cosméticas.

Las mezclas que ameritan ser ensayadas en el *test* desafío microbiológico son LAC:LOT, 1:1; LOC:LAC 2:1; y LOT:LOC, 2:1, ya que son las mezclas que exhibieron una AAO mayor que las de las demás. Además, se aprecia que los

extractos en mezclas binarias poseían una AAO más alta que la de los extractos adicionados de manera individual.

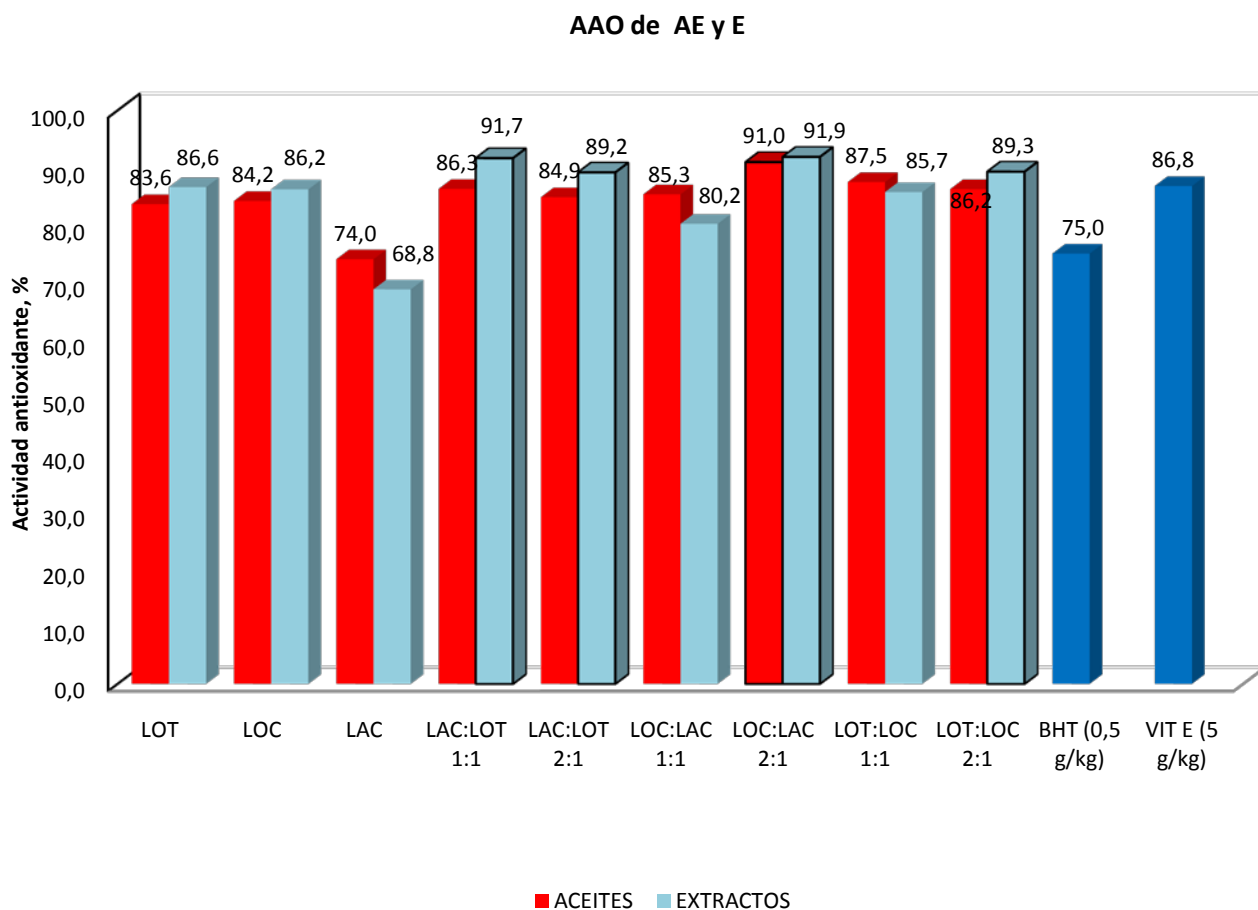


Fuente: El autor.

Figura 22. A. Muestra de desodorante oxidado en presencia del reactivo Fenton, sin adición de aceites esenciales. **B.** Muestra de desodorante oxidado en presencia del reactivo Fenton, con adición de la mezcla de extractos de LAC: LOT, en proporción de 1:1. GC- μ -ECD en la columna con fase estacionaria apolar HP-5 (30 m).

Al comparar los dos cromatogramas de la **Figura 22**, se observa que, al igual que en la **Figura 21**, también se pone de manifiesto el efecto reductor de la formación del hexanal en el 91,7%, así como para otros aldehídos volátiles. Esta actividad antioxidante alta, puede atribuirse a la presencia de moléculas de tipo flavonoide como también un alto contenido de timol (69,1%) en el extracto de *L. origanoides*, quimiotipo “timol” obtenido por SFE-CO₂. Comparando la AAO de la mezcla de LAC:LOT, con las AAO de los extractos de LAC y LOT adicionados de manera

individual, se aprecia un efecto aditivo en el que la *L. origanoides*, quimiotipo “timol”, aumenta en un 5% su AAO y la *L. alba*, quimiotipo “carvona”, en un 32% (Véase **Tabla 17**).



Fuente: El autor.

Figura 23. Cuadro comparativo de la actividad antioxidante de aceites esenciales y extractos adicionados a la base cosmética del desodorante de manera individual y en mezclas binarias.

En la **Figura 23** se aprecia que la AAO de los extractos fue más alta que la de los AE, probablemente, porque los extractos tienen una mayor cantidad de sustancias antioxidantes, que la presente en los aceites obtenidos por destilación.

Los valores de AAO tan altos, comparados con los obtenidos en los trabajos de Puertas, M. [8] y Salgar, W. [62], se deben a que no sólo la mezcla de los aceites o extractos generan un aumento de la actividad antioxidante (antirradicalaria), sino que, posiblemente, la matriz —que es diferente a la de los otros trabajos—, también influye sobre el aumento de la acción antirradicalaria, puesto que ofrece menos interferencia, lo que permite a los antioxidantes ejercer un mayor efecto.

La reacción tipo Fenton permitió acelerar la oxidación de la base cosmética, y apreciar en unas horas el proceso de oxidación que le sucede en un producto cosmético durante varios meses, gracias a la adición de sulfato de hierro y un tampón que facilita la reacción de oxidación [4]. Para ello, se cuantificó el hexanal liberado cuando el desodorante sin aceite o extracto, se comparó con el desodorante que contenía un aceite o un extracto, de modo individual o en mezclas (Véase **Figura 22 A**).

Los resultados obtenidos de la actividad antioxidante (antirradicalaria) muestran que el empleo de AE y extractos de las plantas de *L. alba*, quimiotipo “carvona” y *L. origanoides*, quimiotipos “timol” y “carvacrol” son promisorios, ya que hubo una reducción de *ca.* 10 veces en la producción del hexanal y, además, la actividad superó en muchos casos a la de los antioxidantes comerciales empleados (BHT y Vitamina E). Por lo tanto, es útil para la industria cosmética emplear estos aceites y extractos, como ingredientes cosméticos naturales y producidos además en Colombia, para lograr un efecto antioxidante y antibacteriano.

4 CONCLUSIONES

1. Se determinaron las condiciones operacionales en las cuales se obtiene la mayor cantidad de los extractos por SFE, ricos en antioxidantes, a saber: presión - 400 bar, temperatura - 318 °K, flujo - 20 g/min y 1 h de extracción.
2. Se determinaron las figuras analíticas de merito y establecieron los parámetros instrumentales adecuados para la cuantificación del hexanal, producto volátil final de la peroxidación lipídica. Se implementó el método para determinar la cantidad del hexanal y evaluar la actividad antioxidante (antirradicalaria) en muestras cosméticas de tipo gel-crema, empleando el método *headspace*-SPME con derivación simultánea con la PFPH, directamente sobre la fibra de PDMS/DVB (65 µm). El producto de la reacción de derivación (C₆-PFPH), se cuantificó mediante cromatografía de gases con detector de microcaptura de electrones (GC-µ-ECD). El nivel mínimo de detección, NMD, para este aldehído fue de 5 ppb.
3. Usando el método *headspace*-SPME con derivación del aldehído con la PFPH directamente sobre la fibra, se evaluó el efecto protector (antirradicalario) *in-vitro* de los aceites esenciales y extractos de *L. origanoides*, quimiotipos “timol” y “carvacrol”, *L. alba*, quimiotipo “carvona” y de los antioxidantes de uso comercial BHT y vitamina E, contra la degradación oxidativa de una base de desodorante en gel tipo *roll-on*.
4. Los aceites esenciales y extractos de ambos quimiotipos *L. origanoides*, exhibieron una AAO mayor que la del BHT y vitamina E. Esto los convierte en buenos ingredientes naturales para bases cosméticas. Todos los aceites estudiados presentaron niveles de protección antirradicalaria altos (74,- 84%). Los extractos de ambos quimiotipos de *L. origanoides* exhibieron un efecto protector de ca. 86%.

5. Se evaluó el efecto protector antirradicalario de mezclas binarias de aceites esenciales $AE_1:AE_2$ y extractos $E_1:E_2$ en el proceso de peroxidación lipídica de una base cosmética de desodorante en gel tipo *roll-on*, inducida por el reactivo Fenton. Las mezclas binarias de LOC: LAC 2:1, LOT: LOC 1:1 y LOT: LOC 2:1 de aceites esenciales y las de LOC: LAC, 2:1; LOT: LOC, 2:1; LAC: LOT, 1:1 y LACLOT, 2:1 de extractos presentaron un efecto aditivo que superó la AAO del BHT y de la vitamina E. Estas mezclas también son interesantes como ingredientes cosméticos, y podrían registrarse en el *Handbook of International Nomenclature of Cosmetic Ingredients* (INCI), como agentes anti-radicalarios con actividad *in vitro* demostrada.

6. Los resultados obtenidos de la actividad antioxidante (antirradicalaria) de los desodorantes con adición de aceites o extractos, muestran que su empleo en la base cosmética en forma simple o como mezclas binarias, es prometedora, ya que generan una reducción del hexanal de ca. 10 veces y, además, estos valores superaron, en muchos casos, a los de los antioxidantes comerciales empleados —BHT, vitamina E—. Por lo tanto, sería interesante que la industria cosmética los empleara, con el fin de lograr efectos antioxidante y antibacteriano.

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar más ensayos con extractos y aceites con el fin de encontrar su proporción con una máxima eficacia.
2. Extender este estudio no sólo a estas plantas aromáticas nativas, sino a otras especies endémicas de la zona, con el fin de encontrar nuevos y eficaces ingredientes cosméticos promisorios.
3. Obtener extractos glicólicos o hidroglicólicos de *L. alba*, quimiotipo “carvona” y *L. origanoides*, quimiotipos “timol” y “carvacrol”, para mejorar una mejor dosificación de los extractos en la base cosmética.
4. Desarrollar una metodología por cromatografía líquida de alta eficiencia, para determinar ácidos fenólicos, taninos, entre otras sustancias, o desarrollar una metodología por LC-MS, para lograr una identificación de los componentes no volátiles presentes en los extractos obtenidos por SFE-CO₂.

BIBLIOGRAFÍA

1. **VÉLEZ M. y CUADRADO B.**; Control microbiológico a medicamentos, cosméticos y desinfectantes, Editorial Universitaria, Cartagena de Indias, **2005**, pp.49-53.
2. **SCHAMPER T.**, Chemical aspects of antiperspirants and deodorants, *J. Chem. Ed.*, **1993**, 70(3), pp. 242-244.
3. **GUTTERIDGE J.**, and **HALLIWELL B.**, *Antioxidants in Nutrition, Health and Disease*. Oxford University Press: New York, **1994**, p. 143.
4. **MAKINEN, M.** Lipid hydroperoxides: Effects of tocopherols and ascorbic acid on their formation and descomposition. Academic dissertation, University of Helsinki, Helsinki, **2002**. Online:
<http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/maa/skemi/vk/makinen/lipidhyd.pdf>. Fecha de consulta: 1 enero de 2011.
5. **PRADA, F.**, Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de extractos de *Erythroxylum coca* Lam. y *Coffea arabica* L. en un sistema lipídico modelo, Bucaramanga, **2004**. Trabajo de Grado (Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química, pp. 30-50.
6. **BADUI, S.**, Química de los alimentos, Alhambra Mexicana: México, **1996**, pp. 213.
7. **GURR M.**, and **HARWOOD J.**, Lipid Biochemistry. An Introduction. Chapman & Hall: New York, **1991**, p. 406.
8. **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. Bucaramanga, **2002**, Tesis Doctoral (Químico). Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química, pp. 20-60, 100-120.
9. **MARTÍNEZ M.**, Toxicidad de xenobióticos medida por radicales libres de oxígeno. *Ars. Pharmaceutica*, **1998**, 39, pp. 5-18.

10. **JACOBSEN, C.**, et al. Partitioning of selected antioxidants in mayonnaise. En: *J. Agric. Food Chem*, **1999**, 41, pp. 3601-3610.
11. **BONDER, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; and BERSET, C.**, Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH·, *Lebensm-Wiss.UTechnol.*, **1997**, 30, pp. 609-615.
12. **RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A. YANG, M., and RICE-EVANS, C.**, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay., *Free Rad. Biol. Med.*, **1999**, 26, pp. 1231-1237.
13. **BELITZ H. D., and GROSCH W.**, *Food Chemistry*, 2nd Ed., Springer: Berlin, **1990**, p. 992.
14. **JARAMILLO, B.**, Estudio de la actividad antioxidante *in vitro* de aceites esenciales de plantas tropicales y compuestos nitrogenados sintéticos. Bucaramanga, **2004**. Tesis Doctoral (Química). Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química. pp. 55-58, 86-88.
15. **STASHENKO, E.E.; FERREIRA, C.; SEQUEDA, G.; MARTÍNEZ, J.R., and WONG, J.W.**, Comparison of extraction methods and detection systems in the gas chromatography analysis of volatile carbonyl compounds. *J. Chromatogr. A*, **1997**, 779, pp. 360-369.
16. **STASHENKO, E.E.; FERREIRA, C.; SEQUEDA, G.; MATEUS, A.; CERVANTES, M., and MARTÍNEZ, J.R.**, Desarrollo de un método para monitoreo de la degradación oxidativa en lípidos y evaluación de la actividad antioxidante de productos naturales. *Arte y Ciencia Cosmética*, **1997**, 12, pp. 20-27.
17. **STASHENKO, E.E.; PUERTAS, M.A.; SALGAR, W.; DELGADO, W., and MARTÍNEZ, J. R.**, Solid-phase microextraction with on fibre derivatisation applied to the analysis of volatile carbonyl compounds. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 886, pp. 175-181.
18. **STASHENKO, E.E.; PUERTAS, M.A. and MARTÍNEZ, J.R.**, SPME determination of volatile aldehydes for evaluation of *in vitro* antioxidant activity. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2001**, 373 (2), pp. 70-74.

19. **CRISTANCHO R. y GUERRERO C.**; Evaluación de la actividad antifúngica y antibacteriana de aceites esenciales de plantas superiores colombianas, Santa fe de Bogotá, **1997**, Trabajo de Grado (Químicos Farmacéuticos). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia. pp. 3-20.
20. **ZOLLNER, H.; SCHAUR,R.; ESTERBAUER, H.**, Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants, Academic Press, New York, **1991**, p. 337.
21. **BOTTIA E.; VARGAS A.**, Estudio de la composición química de los aceites esenciales de seis especies vegetales cultivadas en los municipios de Bolívar y el Peñón, Santander, Colombia, Bucaramanga, **2008**, Trabajo de Grado (Químicos). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química, pp. 30-50.
22. **MENDIVELSO, D. L. y OLIVARES, M. C.**, Estudio de los metabolitos secundarios volátiles en hojas frescas y secas de *Pelargonium graveolens* (geranio) en función del método de extracción y su estado de desarrollo vegetativo, Bucaramanga, **2007**, Trabajo de Grado (Química), Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química, pp. 20-40.
23. **CELIS MELO, Clara**, Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia origanoides* y *Phyla (Lippia) dulcis*, especies de la familia *Verbenaceae*. Bucaramanga, **2007**, Trabajo de Grado (Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química, pp. 25-30, 35-37.
24. **RUÍZ, C.**, Estudio de los metabolitos secundarios volátiles de *Lippia origanoides* H.B.K., en tres estados fenológicos, Bucaramanga, **2008**, Trabajo de Grado (Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química, pp. 22-43.
25. **RANDRIANALIJAONA, J., RAMANOELINA, P., RASOARAHONA, J., and GAYDOU, E.**, Seasonal and chemotype influences on the chemical composition of *Lantana camara* L. essential oils from Madagascar. *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 545, pp. 46-52.

26. **BANDONI, A.**, Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. **2000**, CYTED, 1ª ed., La Plata, p. 410.
27. **STASHENKO, E.E.; JARAMILLO, B.E.; 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, *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1025, pp. 93–103.
28. **PASCUAL, M., SLOWING, K., CARRETERO, E., SÁNCHEZ, D., and VILLAR, A.**, *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review, *J. Ethnopharmacol.*, **2001**, 76, pp. 201–214.
29. **GARCÍA H.**, Flora medicinal colombiana: botánica médica, **1992**, Tercer Mundo, 2ª Ed., Bogotá, 1-3, p. 1603.
30. **HENNEBELLEA, T., SAHPAZA, S., DERMONTB, C., JOSEPHC, H., and BAILLEUL, F.**, The essential oil of *Lippia alba*: analysis of samples from French overseas departments and review of previous works, *Chem. Biodiver.*, **2006**, 3, pp. 1116-1125.
31. **PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, M. E., and VILLAR, A.**, Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae), *J. Pharmacol*, **2001**, 56, pp. 501–504.
32. **VALE, T., FURTADO, E., SANTOS, K., VIANA, G.**, Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, *Phytomed.*, **2002**, 9, pp. 709-714.
33. **OLIVEIRA, D., LEITÃO, G., SANTOS, S., BIZZO, H., LOPES, D., ALVIANO, C., ALVIANO, D., LEITÃO, S.**, Ethnopharmacological 186 study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil, *J. Ethnopharmacol.*; **2006**; 108 (1), pp. 103-108.
34. **FISCHER, U.; LOPEZ, R.; POLL, E.; VETTER, S.; NOVAK, J., and FRANZ, C.**, Two chemotypes within *Lippia alba* populations in Guatemala, *Flavour Fragr. J.*, **2004**, 19, pp. 333-335.
35. **PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, M. E., and VILLAR, A.**, Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae), *J. Pharmacol*, **2001**, 56, pp. 501–504.

36. **BRAGA, M.; EHLERT, P.; MING, L.;** Supercritical fluid extraction from *Lippia alba*: global yields, kinetic data, and extract chemical composition, *J. Supercrit. Fluids*, **2005**, 34, pp. 149–156.
37. **RAMOS, A.; VISOZO, A.; PILOTO, J.; GARCÍA, A., RODRÍGUEZ, C. A., and RIVERO, R.,** Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants, *J. Ethnopharmacol.*, **2003**, 87, pp. 241–246.
38. **VALE, T., FURTADO, E., SANTOS, K., VIANA, G.,,** Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, *Phytomed.*, **2002**, 9, pp. 709-714.
39. **STASHENKO, E., JARAMILLO, B., and MARTÍNEZ, J.,** Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante in vitro de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae, *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, **2003**, 27 (105), pp. 579-598.
40. **OLIVEIRA D., LEITAO G., BIZZO H., LOPES, D., ALVIANO, C., ALVIANO, D., and LEITAO, S.,** Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K. *Food Chem.*, **2007**, 101 (1), pp. 236-240.
41. **GALLINO, M.,** Una Verbenacea essenziera ricca in timolo: *Lippia organoides* H.B.K, *Essen. Deriv. Agrum.*, **1987**, 57 (4), pp. 628–629.
42. **DOS SANTOS, F., ARIMATÉIA, J., LOPES, D.; CITO, G., OLIVEIRA, E., LIMA. S., and REIS, F.,** Composition and biological activity of essential oils from *Lippia organoides* H.B.K., *JEOR*, **2004**, 16 (5), pp. 504-506., <http://mobot.mobot.org/W3T/Search/vas.html>. Página Web consultada el 30 de marzo de 2007.
43. **AESCHEBACH, T., LOLIGER, J., SCOTT, B.C., MURCIA, A., BUTLER, J., HALLIWELL, B., ARUOMA, O.,** Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol, *Food Chem. Tox.*, **1994**, 32 (1), pp. 31-36.
44. **DE VINCENZI, M.; STAMMATI, A.; DE VINCENZZI, A.; SILANO, M.,** Constituents of aromatic plants: carvacrol, *Fitoterapia*, **2004**, 75, pp. 801-804.

45. **YANISHLIEVA, N.V.; MARINOVA, E.M.; GORDON, M.H.; RANEVA, V.G.**, Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems, *Food Chem.*, **1999**, 64, pp. 59-66.
46. **TSARKOVA, T.**, Desarrollo de la técnica de extracción de metabolitos secundarios de plantas aromáticas utilizando la radiación de microondas. Trabajo de Investigación (Maestría). Escuela de Química. Universidad Industrial de Santander, **2007**, pp. 27-31.
47. **GOMES, P., MATA, N. and RODRIGUES, A.**, Production of rose geranium oil using supercritical fluid extraction. *J. Supercritical Fluids*. **2007**, 41, pp. 50-60.
48. **LU, T. J., GASPAR, F., MARRIOTT, R., MELLOR, S., WATKINSON, C., ALDURI, B., et al.** Extraction of borage seed oil by compressed CO₂: Effect of extraction parameters and modeling. *J. Supercritical Fluids*, **2007**, 41, pp. 68–73.
49. **ARAUJO, J., and SANDI, D.**, Extraction of coffee diterpenes and coffee oil using supercritical carbon dioxide. *Food Chemistry*, **2007**, 101(3), pp. 1087–1094.
50. **TEPELLI, F.**, The Journal of Supercritical Fluids Perspectives on supercritical fluid processing of fats and oils; *Department of Agricultural, Food and Nutritional Science, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada T6G 2P5; J. Supercritical Fluids*, **2009**, 47, pp. 583–590.
51. **MODEY W., MULHOLLAND D., RAYNOR M.**, Analytical, supercritical fluid extraction of natural products. *Phytochem. Anal.*, **1996**, 7, pp. 1–15.
52. **LORD, H. and PAWLISZYN, J.**, Evolution of solid-phase microextraction technology, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 885, pp. 153–193.
53. **PAWLISZYN, J.**, Solid phase microextraction: Theory and Practice, Wiley-VCH, New York, **1997**, p. 233.
54. **ZHANG, Z. and PAWLISZYN, J.**, Headspace solid-phase microextraction, *Anal. Chem.*, **1993**, 65, pp. 1843-1852.
55. **GÓMEZ G.**, Análisis de la composición química y de la actividad biológica de los aceites esenciales de dos quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br., en

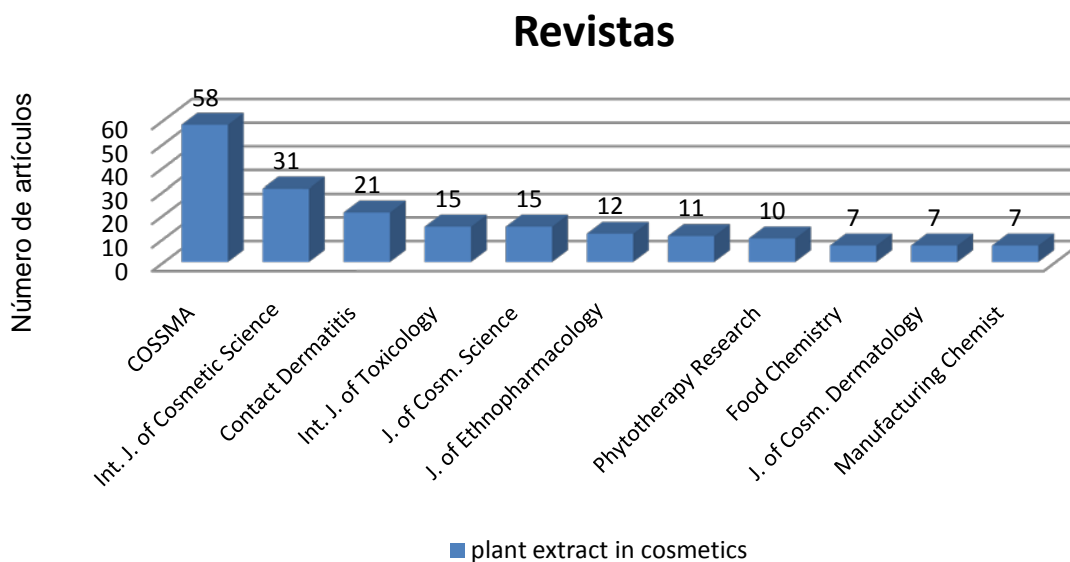
- función de las condiciones de extracción y secado de la planta. Bucaramanga, **2007**, Trabajo de Grado (Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química, pp. 79-80.
56. **MARA, E., BRAGA, A., POLYANA, A., LIN, C.**, Supercritical fluid extraction from *Lippia alba*: global yields, kinetic data, and extract chemical composition, *J. Supercrit. Fluids*, **2005**, 34, pp. 149–156.
57. **BRAGA, M.; EHLERT, P.; MING, L.**; Supercritical fluid extraction from *Lippia alba*: global yields, kinetic data, and extract chemical composition, *J. Supercrit. Fluids*, **2005**, 34, pp. 149–156.
58. **KOVÀTS, E.** Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Advan. Chromatogr.*, **1965**, 1, pp. 229-247.
59. **ADAMS, R.**, Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4ed, Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation, **2007**, p. 804.
60. **HORWITZ, W.**; Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs. *Anal. Chem.* **1982**, 54, p.67.
61. **DWECK, A.**, The toxicity of essential oil. Descargado [documento de internet]. http://www.dweckdata.com/Published_papers/A_List_of_published_papers.htm. [Consulta: 17 noviembre 2010].
62. **SALGAR, W.**, Evaluación de dos sistemas lipídicos modelo de la actividad antioxidante *in-vitro* de aceites esenciales extraídos de plantas pertenecientes a la familia Labiatae. Bucaramanga, **2001**. Trabajo de Investigación (Maestría), Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.

ANEXOS

ANEXO A. Datos adicionales de la búsqueda cuantitativa.

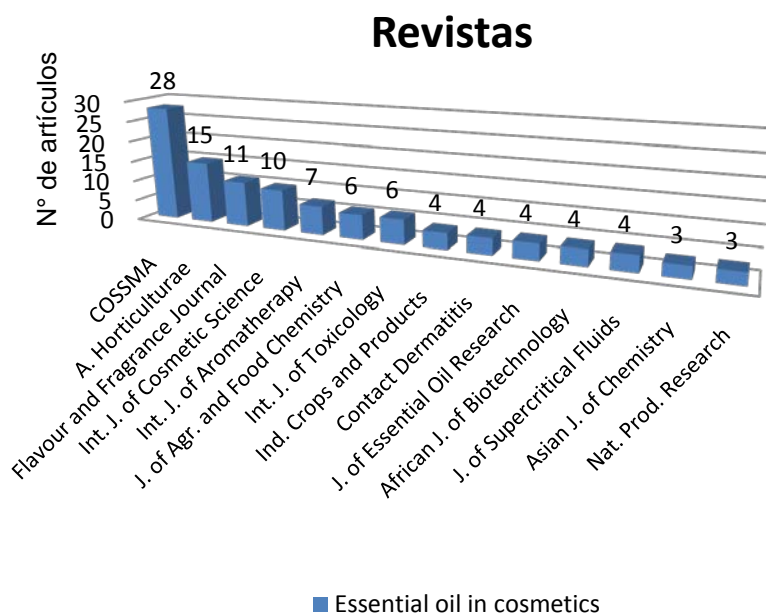
Tabla 18. Análisis cuantitativo. Base de Datos: *Scopus*, Período de observación: de 2001 -2008. Fecha de consulta: 27/06/2.008. Ecuación de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY (deodorant dermatitis plant extract)*

País	Año	Revista	Área	Autor
EE.UU	2008 (4)	Contact Dermatitis (29)	Medicine (65)	Beaudet, A.L. (2)
	2007 (8)	International Journal of	Pharmacology,	Basch, E. (2)
Francia	2006 (15)	Aromatherapy (6)	Toxicology and	Mizgerd, J.P. (2)
UK	2005 (15)	Berufs Dermatosen (5)	Pharmaceutics (50)	Hammer, K.A. (2)
Alemania	2004 (12)	British Journal of	Immunology and	De Groot, A.C. (3)
	2003 (9)	Dermatology (4)	Microbiology (38)	Grzywa, Z. (5)
	2002 (12)	Acta Dermato	Agricultural and	Rudzki, E. (5)
		Venereologica (3)	Biological	
			Sciences (16)	
			Biochemistry,	
			Genetics and	
			Molecular	
			Biology (12)	



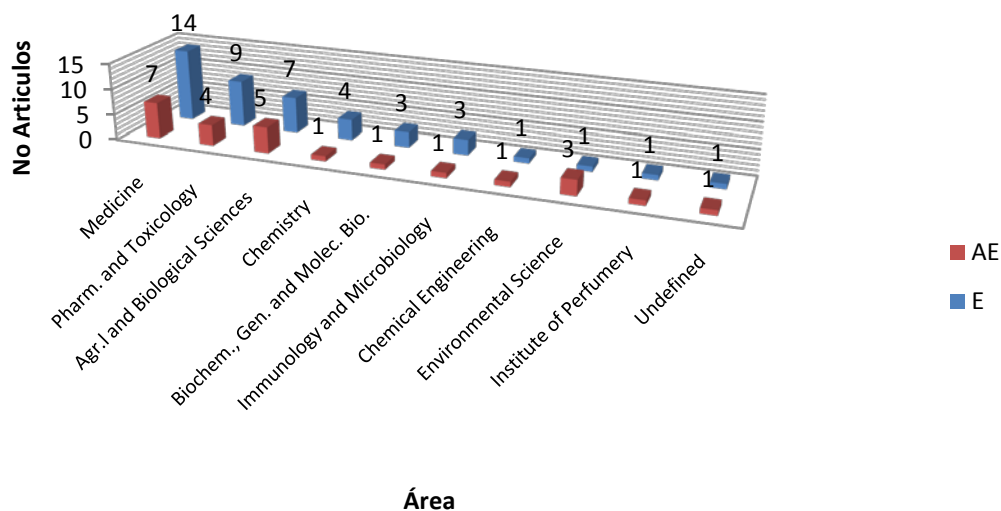
Fuente: Base de Datos. *Scopus* (*Elsevier*, B.V., 2010)

Figura 24. Análisis cuantitativo. Base de Datos: *Scopus*. Período de observación: de 2001 -2007. Fecha de consulta: 27/06/2.008. Ecuación de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY (plant extract in cosmetics)*.



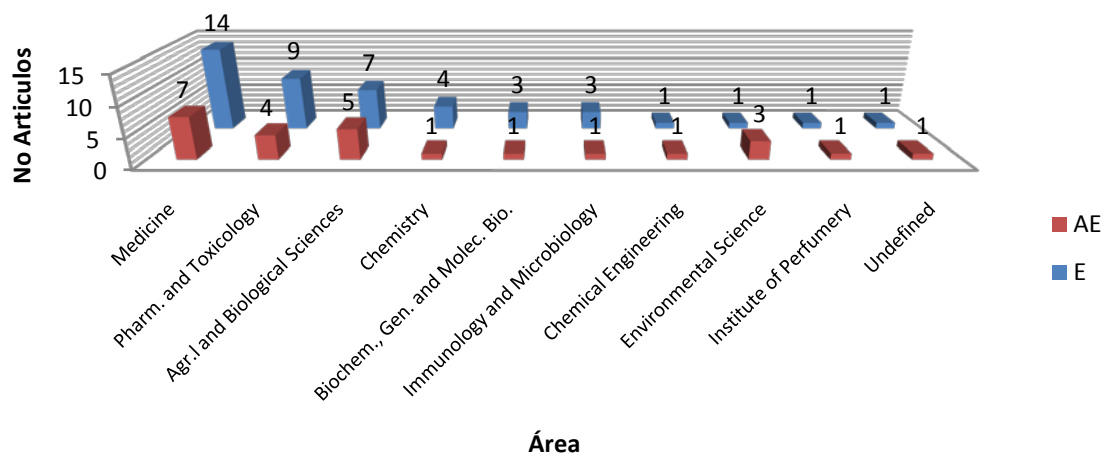
Fuente: Base de Datos. *Scopus* (Elsevier, B.V., 2010)

Figura 25. Análisis cuantitativo. Base de datos: *Scopus*. Período de observación: de 2001 -2007. Fecha de consulta: 27/06/2.008. Ecuación de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY (essential oil in cosmetics)*



Fuente: Base de Datos. *Scopus* (Elsevier, B.V., 2010)

Figura 26. Análisis cuantitativo. Base de Datos: *Scopus*. búsqueda por área. Período de observación: 1999-2010 Fecha de consulta: 4/06/2.010. Ecuaciones de búsqueda: *TITLE ABS KEY (essential oil in cosmetics)* y *TITLE-ABS-KEY (plant extract in cosmetics)*.



Fuente: Base de Datos. *Scopus* (Elsevier, B.V., 2010)

Figura 27. Análisis cienciométrico. Base de Datos: *Scopus*. búsqueda: por área. Período de observación: 1999-2010 Fecha de consulta: 4/06/2010. Ecuaciones de búsqueda: *TITLE ABS KEY (essential oil in deodorants)* y *TITLE-ABS-KEY (plant extract in deodorants)*.

ANEXO B. Ficha cosmética de la vitamina F

Vitamin F

10-3-E

Essential fatty acids and -esters

Description:

So called "Vitamin F" is a high quality complex consisting of several unsaturated fatty acids particularly linoleic acid and linolenic acid.

Application:

For dry, rough and chapped skin, dry hair and Seborrhoea sicca. Makes skin and hair smooth and pliable. Also suitable for healthy skin as a preventative.

General:

The essential, unsaturated fatty acids used to be classified as so-called "Vitamin F". Actually these fatty acids are no more considered as Vitamins, but they are well-established in cosmetic for the care of dry and scaling skin and dry hair.

Although all Cosmetochem "Vitamin F" products contain an antioxidant (Oxynex 2004 (Merck)), the products have to be protected from exposure to air. Filling is done under Nitrogen to prevent oxidation and the products are therefore protected until opening. Once opened the products should be used as quickly as possible or refilled with Nitrogen before resealing.

Supplied as:

"Vitamin F" oil soluble

"Vitamin F" water soluble

"Vitamin F" Glyceryl ester

Packing:

PE-cans	containing	25 kg
PE-drums	containing	100 kg
Steel drum	containing	100 kg

cosmetochem

Examples for application:

**Shampoo for dry hair
COS-K.10.3.1**

Item	%	Material
1	48,0	Sodium-Laureth-Sulphate (28 %)
2	2,0	VITAMIN F WATER SOLUBLE
3	4,0	CONDIPON
4	6,0	Lamepon S
5	0,5	LIPOCONSERV COS
6	0,5	Perfume
7	39,0	Water (NaCl)
		<hr/>
100,0		

**Foot-Spray
COS-K.10.3.3**

Item	%	Material
1	1,8	VITAMIN F OIL SOLUBLE
2	1,0	DEO-USNATE
3	2,0	Propylene Glycol
4	1,0	Perfume
5	0,5	Menthol
6	43,7	Alcohol
7	50,0	Propellent
		<hr/>
100,0		

**Hair-Care-Emulsion
COS-K.10.3.2**

Item	%	Material
1	8,0	CONDIQUAT NW
2	1,5	VITAMIN-F-GLYCERYL ESTER
3	1,0	Eumulgin B-1
4	3,0	Emulgade F special
5	1,5	JOJOBA OIL COS
6	0,4	LIPOCONSERV COS
		<hr/>
7	82,5	Water
8	2,0	HERBASOL COMPLEX E
9	0,1	Perfume
		<hr/>
100,0		

**Skin-Mask
COS-K.10.3.4**

Item	%	Material
1	3,0	EMULSIFIER B-6
2	2,0	VITAMIN-F-GLYCERYL ESTER
3	1,0	CARROT OIL COS
4	2,0	AVOCADO OIL COS
5	1,5	Cetyl alcohol
6	0,5	LIPOCONSERV COS
		<hr/>
747,3		Water
8	2,5	NATIV-COLLAGEN PUR COS
9	0,2	Perfume
10	40,0	Kaolin
		<hr/>
100,0		

"Vitamin F" oil soluble

Free highly unsaturated fatty acids in high concentration

Use:

Skin creams, face masks, skin oils, hair-lotions etc.

Solubility:

Soluble in oils, fats, ethanol, iso-propanol.

Insoluble in Water

Soluble in limited amounts in aqueous alcohol with higher percentage of alcohol:

Dosage: abt. 0,5 - 2,5 %

Aspect:

Light yellow oil or turbid liquid with characteristic smell.

Typical analytical data:

Unsaturated Fatty Acids:	abt. 88 %
Saturated Fatty Acids:	abt. 12 %
Density:	0,897 - 0,907
Refractive Index:	1,468 - 1,474
Cloud point:	abt. 20° C
Iodine value:	170 - 190
Acid value:	195 - 210

Customs-tariff-No.:

2916.1500 S099

CTFA-Denomination:

Linolic Acid (and) Linolenic Acid (and) Oleic Acid (and) Palmitinic Acid

"Vitamin F" water soluble

Free, highly unsaturated fatty acids solubilised by use of non-ionic surfactant. Activity.

Use:

Shampoos, bath-preparations, hair lotions etc.

Solubility:

Soluble in water, alcohol and surfactans

Dosage: abt. 1 - 5 %

Aspect:

Yellow oil with mild characteristic odour.

Typical analytical data:

Density:	1,082 - 1,092
Refractive Index:	1,467 - 1,472
pH-value (1:10 in H ₂ O):	4,5 - 6,0
Acid value:	abt. 12 - 14
Iodine value:	abt. 12 - 14

Customs-tariff-Nr.:

3402.9000 S099

CTFA-Denomination:

Polysorbate 20 (and) Linolic Acid (and) Linolenic Acid (and) Oleic Acid (and) Palmitinic Acid

"Vitamin F" Glyceryl ester

Glyceryl esters of highly unsaturated fatty acids.

Use:

Skin creams, skin oils, skin emulsions, particularly for dry and rough skin.

Solubility:

Soluble in oils, fats, hydrocarbons etc.

Dosage: abt. 2 - 5 %

Aspect:

Yellowish oil with very mild odour.

Typical analytical data:

Density:	0,910 - 0,920
Refractive Index:	1,472 - 1,477
Iodine value:	120 - 135
Saponification value:	185 - 198

Customs-tariff-No.:

2916.1500 S099

CTFA-Denomination:

Linolic Acid Triglycerides (and)
Linolenic Acid Triglycerides (and)
Oleic Acid Triglycerides (and)
Palmitinic Acid Triglycerides

This information is true and accurate to the best of our knowledge, but all recommendations or suggestions are made without guarantee since the conditions of use are beyond our control. Cosmetochem disclaims any liability incurred in connection with these suggestions.

COSMETOCHEM AG

Riedstrasse 7

CH- 6330 Cham

Switzerland

cosmetochem

ANEXO C. Cromatogramas de aceites esenciales y sus extractos y cantidades
adicionadas a la base cosmética.

***Lippia origanoides*, quimiotipo “timol”**

Tabla 19. Cantidad relativa (%) e identificación de los principales componentes del aceite esencial de *Lippia origanoides*, aislados por MWHD.

N° Pico*	Compuesto	I _R		Cantidad relativa, %
		DB-5	DB-WAX	
1	<i>trans</i> -2-Hexenal	848	1213	0,2
2	α-Tujeno	925	1023	0,6
3	α-Pineno	934	1028	0,2
4	3-Octenol	974	1448	0,2
5	β-Mirceno	990	1152	2,8
6	α-Felandreno	1010	1158	0,3
7	Δ ³ -Careno	1013	N.I.	0,2
8	α-Terpineno	1019	1164	1,9
9	<i>p</i> -Cimeno**	1025	1269	8,8
10	Limoneno	1031	1196	0,5
11	β-Felandreno	1033	1165	0,4
12	1,8-Cineol	1035	1223	0,4
13	<i>trans</i> -β-Ocimeno	1049	1251	0,2
14	γ-Terpineno	1060	1240	7,0
15	<i>cis</i> -Hidrato de sabineno	1071	1550	0,2
16	Terpinoleno	1091	1280	0,3
17	6,7-Epóxido de mirceno	1096	1324	0,5
18	Linalol	1102	1543	0,5
19	Umbellulona	1226	1662	0,7
20	Metil timil éter	1226	1589	3,8
21	Timol**	1293	2182	47,4
22	Carvacrol	1304	2210	2,9
23	3-Metil-4-isopropilfenol	1308	N.I.	0,1
24	Acetato de timilo	1350	1866	8,2
25	Eugenol	1359	N.I.	1,6
26	α-Copaeno	1384	1493	0,1
27	<i>cis</i> -α-Bergamoteno	1410	N.I.	0,1
28	<i>trans</i> -β-Cariofileno**	1428	1597	4,7
29	α-Cedreno	1430	1598	0,3
30	<i>trans</i> -α-Bergamoteno	1440	1594	0,3
31	α-Humuleno	1464	1674	1,4

Tabla 19, continuación.

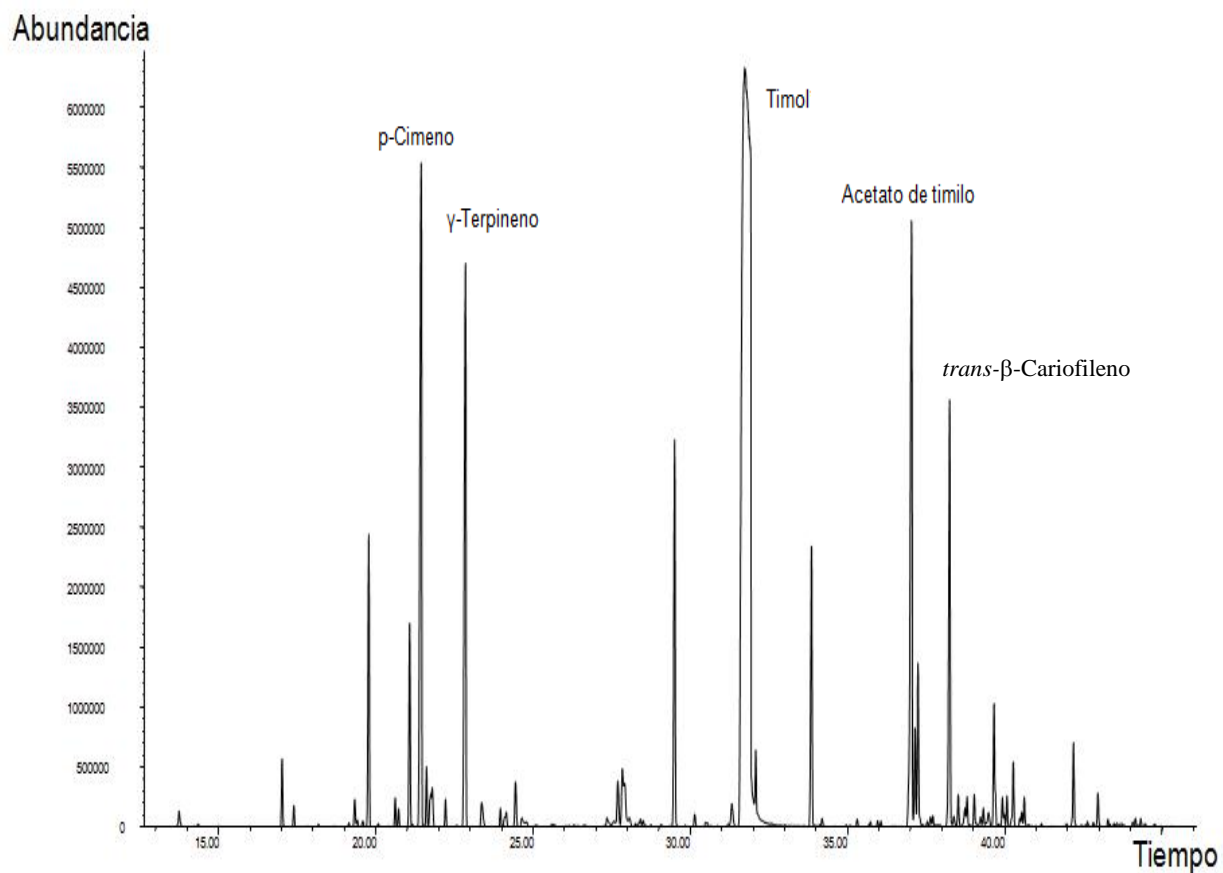
32	<i>trans</i> -Cadina-1(6),4-dieno	1481	N.I.	0,3
33	γ -Muuruleno	1486	1698	0,3
34	α -Curcumeno	1488	1775	0,7
35	Germacreno D	1492	1710	0,1
36	α -Muuruleno	1508	1784	0,1
37	β -Bisaboleno	1516	1745	0,3
38	γ -Cadineno	1521	1786	0,8
39	δ -Cadineno	1530	1788	0,3
40	<i>trans</i> -Calameneno	1534	1833	0,1
41	<i>cis</i> -Calameneno	1537	1843	0,1
42	Óxido de cariofileno	1591	2006	0,1
43	Epóxido de humuleno II	1621	2060	0,2
Familia de compuestos				Cantidad relativa, %
Hidrocarburos monoterpénicos				11,2
Monoterpenos oxigenados				1,4
Hidrocarburos sesquiterpénicos				7,6
Sesquiterpenos oxigenados				0,3
Fenilpropanos				79
Otros compuestos oxigenados				0,7

* **Figura 28.**

**Pico mayoritario

N.I. No identificado.

tr Detectado en trazas.



Fuente: El autor.

Figura 28. Perfil cromatográfico típico del aceite esencial de *Lippia origanoides*, quimiotipo “timol”. GC-MS en la columna con fase estacionaria apolar HP-5 (30 m).

***Lippia origanoides*, quimiotipo “carvacrol”**

Tabla 20. Cantidad relativa (%) e identificación de los principales componentes del aceite esencial de *Lippia origanoides*.

No. Pico*	Compuestos	I _R		Cantidad relativa, %
		DB-5	DB-WAX	
1	α-Tuyeno	924	1026	2,2
2	α-Pineno	933	1022	0,6
3	Canfeno	952	1065	0,2
4	1-Octen-3-ol	979	1451	0,1
5	β-Pineno	981	1108	0,2
6	β-Mirceno	991	1165	3,2
7	α-Felandreno	1010	1166	0,7
8	C ₁₀ H ₁₆	1012	1148	0,2
9	α-Terpineno	1022	1181	3,8
10	p-Cimeno	1033	1274	18,0
11	Limoneno	1035	1200	0,6
12	β-Felandreno	1039	1212	1,7
	Eucalipto(1,8-Cineol)	1039	1212	
13	trans-β-Ocimeno	1048	1253	0,6
14	γ-Terpineno	1066	1250	17,3
15	trans-4-Tuanol	1075	1559	0,5
16	α-Terpinoleno	1089	1286	0,2
17	Linalool	1100	1553	0,2
18	Terpinen-4-ol	1188	1611	0,7
19	Umbelulona	1192	1650	0,3
20	Metil timiléter	1232	1597	2,8
21	Metil carvacril éter	1241	1608	0,2
	2-Isopropil-4-metilfenol			0,3
22	(Isómero del timol)	1281	2173	
23	Timol	1293	2192	4,1
24	Carvacrol**	1308	2224	26,6
25	iso-Ascaridol	1321	----	0,2
26	Acetato de timilo	1350	1860	0,5
27	Eugenol	1359	2180	0,2

28	Acetato de carvacrilo	1370	1882	1,9
29	<i>trans</i> - β -Cariofileno	1435	1606	20,4

Tabla 20, continuación.

30	<i>trans</i> - α -Bergamoteno	1441	1591	0,2
31	α -Humuleno	1471	1680	14,8
32	2,5-Dimetoxiacetofenona	1478	----	0,9
33	β -Bisaboleno	1514	1736	0,5
34	C ₁₅ H ₂₆ O,N.I.	1542	----	0,1
35	<i>trans</i> - α -Bisaboleno	1546	1766	0,1
36	Óxido de cariofileno	1599	2006	0,3
37	Epóxido de humuleno	1628	2064	0,1

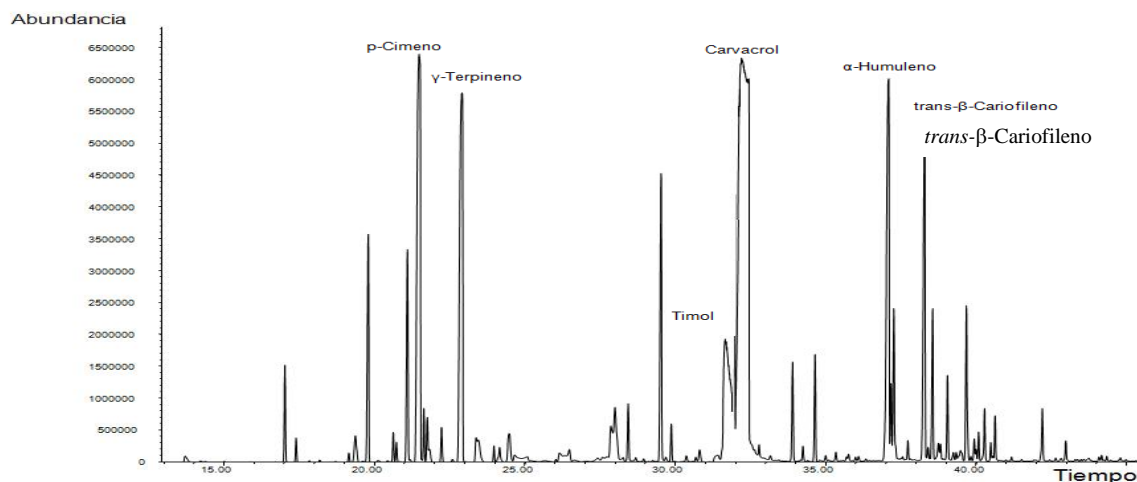
Familia de compuestos	Cantidad relativa, %
Hidrocarburos monoterpénicos	39,8
Monoterpenos oxigenados	3,7
Hidrocarburos sesquiterpénicos	3,4
Sesquiterpenos oxigenados	0,6
Fenilpropanoides	51,5
Otros compuestos oxigenados	1

* **Figura 29.**

**Pico mayoritario

N.I. No identificado.

tr Detectado en trazas.



Fuente: El autor.

Figura 29. Perfil cromatográfico típico del aceite esencial de *Lippia origanoides*, quimiotipo “Carvacrol”. GC-MS. Columna con fase estacionaria apolar HP-5 (30 m).

***Lippia alba*, quimiotipo “carvona”**

Tabla 21. Cantidad relativa (%) e identificación de los principales componentes del aceite esencial de *Lippia alba*, aislado por MWHD.

Nº Pico*	Compuesto	I _k		Cantidad relativa, %
		DB-5	DB-WAX	
1	α-Pineno	939	1018	0,2
2	Canfeno	954	1061	0,1
3	β-Mirceno	991	1163	0,6
4	1,3,8- <i>p</i> -Mentatrieno	1009	1214	0,1
5	Limoneno	1038	1200	24,5
6	<i>trans</i> -β-Ocimeno	1048	1251	0,6
7	Linalool	1101	1547	0,6
8	<i>trans-p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	1127	1634	0,3
9	<i>cis</i> -Óxido de limoneno	1138	1451	0,2
10	<i>cis-p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	1142	1873	0,9
11	Borneol	1181	1713	0,1
12	<i>cis</i> -Dihidrocarvona	1204	1618	0,1
13	<i>trans</i> -Dihidrocarvona	1211	1639	0,3
14	Etilcumeno	1229	1998	0,3
15	<i>trans</i> -Carveol	1231	1842	0,2
16	Carvona	1260	1753	30,8
17	Piperitona	1267	1743	0,4
18	Isopiperitenona	1279	1856	1,6
19	<i>trans</i> -Óxido de carvona	1284	1809	0,2
20	Timol	1293	2186	0,1
21	<i>trans</i> -Acetato de carvilo	1337	1706	0,9
22	Piperitenona	1351	1945	0,1
23	Eugenol	1359	2177	2,5
24	α-Copaeno	1388	1500	0,3
25	β-Bourboneno	1396	1528	5,0
26	β-Elemeno	1399	1598	0,3
27	β-Cedreno	1433	1586	0,6
28	<i>trans</i> -β-Cariofileno	1436	1610	0,6
29	β-Copaeno	1445	1691	0,7
30	<i>trans</i> -β-Farneseno	1457	1669	1,9
31	allo-Aromadendreno	1459	1661	0,3
32	γ-Gurjuneno	1476	1739	1,3
33	γ-Muuroleno	1484	1701	0,4

Tabla 21, continuación.

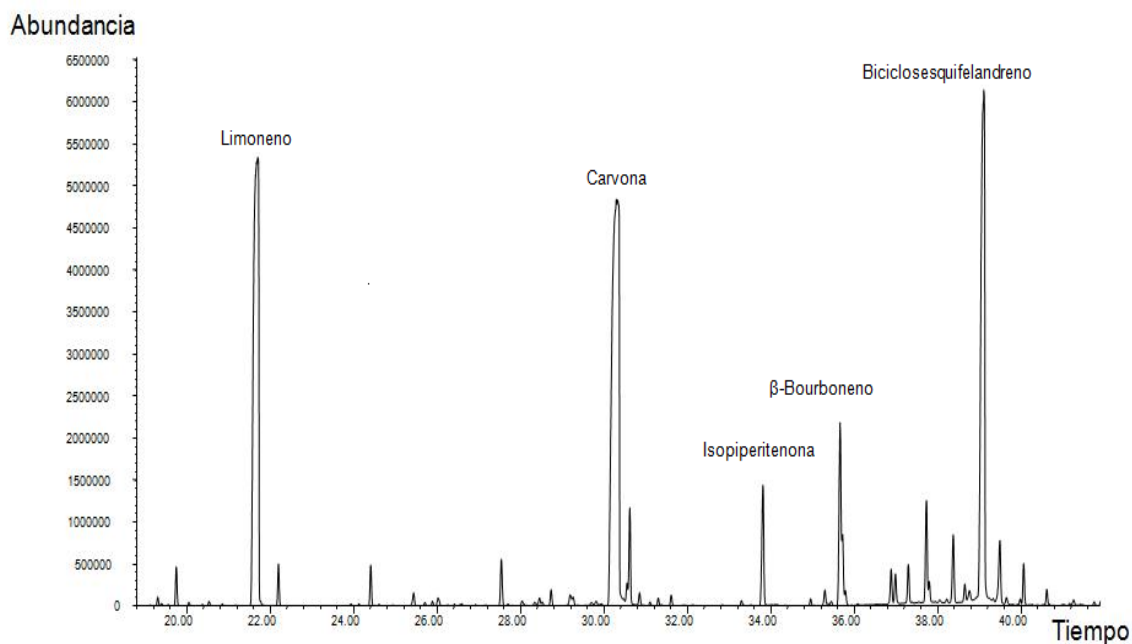
34	GermacrenoD	1488	1654	0,3
35	Biciclosesquifelandreno	1498	1727	20,8
36	Biciclogermacreno	1510	1705	1,5
37	Cubebol	1528	1955	0,7
38	GermacrenoD-4-ol	1590	2066	0,5
39	N.I.	1700	2381	0,2
Familia de compuestos				Cantidad relativa, %
Hidrocarburos monoterpénicos				34,5
Monoterpenos oxigenados				44,3
Hidrocarburos sesquiterpénicos				19,4
Sesquiterpenos oxigenados				1,07
Otros				0,79

* **Figura 30.**

**pico mayoritario

N.I. No identificado.

tr Detectado en trazas.



Fuente: El autor.

Figura 30. Perfil cromatográfico típico del aceite esencial de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”. Mediante GC-MS. Columna apolar con fase estacionaria HP-5 (30 m).

Tabla 22. Cantidades adicionadas (mg/g) de aceites esenciales de manera individual y en mezclas, al desodorante en gel.

AE	AE:AE [mg/g]				\bar{X}		s (n=2)		CV%		
LOT	2,8				2,4		2,6		0,28		10,9
LOC	1,2				0,9		1,0		0,18		17,8
LAC	2,3				2,5		2,4		0,15		6,3
LAC:LOT11	2,10	2,07	2,11	1,99	2,1	2,03	0,01	0,06	0,3	2,8	
LAC:LOT21	2,04	0,90	2,10	1,03	2,1	0,97	0,04	0,09	2,0	9,5	
LOC:LAC11	1,14	1,08	1,08	1,05	1,1	1,07	0,04	0,02	3,8	2,0	
LOC:LAC21	2,50	1,34	2,45	1,23	2,5	1,29	0,04	0,08	1,4	6,1	
LOT:LOC11	1,3	1,2	1,1	1,0	1,2	1,1	0,15	0,10	12,4	9,1	
LOT:LOC21	2,04	0,90	2,05	1,02	2,1	0,96	0,01	0,08	0,3	8,8	

Fuente: El autor.

Tabla 23. Cantidades adicionadas (mg/g) de extracto de manera individual y en mezclas binarias al desodorante en gel.

Extracto	Extracto:Extracto, [mg/g]				\bar{X}		s (n=2)		CV%		
LOT	1,17				1,20		1,19		0,02		1,8
LOC	3,90				4,03		3,97		0,09		2,3
LAC	2,44				2,46		2,45		0,01		0,6
LAC:LOT11	1,92	2,10	2,01	2,03	1,97	2,07	0,06	0,05	3,2	2,4	
LAC:LOT21	2,09	1,03	2,00	1,02	2,05	1,03	0,06	0,01	3,1	0,7	
LOC:LAC11	1,1	1,2	1,0	1,1	1,1	1,2	0,11	0,12	10,7	10,5	
LOC:LAC21	3,98	2,10	4,02	1,99	4,00	2,05	0,03	0,08	0,7	3,8	
LOT:LOC11	1,00	1,00	1,09	1,02	1,05	1,01	0,06	0,01	6,1	1,4	
LOT:LOC21	2,09	1,03	2,05	1,02	2,07	1,03	0,03	0,01	1,4	0,7	

Fuente: El El autor.