



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“ELABORACIÓN DE COSMÉTICOS DECORATIVOS A PARTIR DE FRUTOS
VERDES DE *Genipa americana L.*”**

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR

SHIRLEY MIREYA TENESACA CAYAMBE

**RIOBAMBA – ECUADOR
2012**

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico con mucho amor aquellas personas que me ayudaron a cumplir con esta meta.

A mi creador, Jehová, desde siempre mi inspiración y razón de mi esmero.

A mis padres, José y Aída, por apoyarme y enseñarme que con perseverancia se alcanzan grandes sueños.

A mis hermanos, Víctor, Giovanni, Jacqueline y Miriam porque gracias a ellos es agradable vivir un día más.

Y a mis amigos, porque me permiten ver el mundo desde otras perspectivas.

AGRADECIMIENTO

A mi Dios, por darme la vida con libertad de inscribir mi historia.

A mis padres y hermanos, por ese espíritu de unión, lealtad y justicia que amo en ellos y por lo cual todo lo que hago tiene sentido.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, prestigiosa institución de cultura y ciencia.

A la Dra. Susana Abdo, al BQF. Fausto Contero, y al BQF. Diego Vinuesa por su valiosa colaboración y asesoramiento en la elaboración de la presente Tesis

A mis amigos por su compañía durante estos cinco años, en los cuales hemos compartido sueños y metas que ahora vemos realizados.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: “ELABORACIÓN DE COSMÉTICOS DECORATIVOS A PARTIR DE FRUTOS VERDES DE *Genipa americana L.*”, de responsabilidad de la señorita egresada Shirley Mireya Tenesaca Cayambe ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dra. Yolanda Díaz DECANA FAC. CIENCIAS	_____	_____
Dr. Luis Guevara DIRECTOR DE ESCUELA	_____	_____
Dra. Susana Abdo DIRECTOR DE TESIS	_____	_____
Bqf. Fausto Contero MIEMBRO DE TRIBUNAL	_____	_____
Lcdo. Carlos Rodríguez DIRECTOR CENTRO DE DOCUMENTACIÓN	_____	_____
NOTA DE TESIS ESCRITA	_____	

Yo, **Shirley Mireya Tenesaca Cayambe** soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

SHIRLEY MIREYA TENESACA CAYAMBE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ANOVA	Analysis of Variance
BAM	Bacteriological Analytical Manual
C	Concentración
°C	Grados Celsius
CAS	Chemical Abstracts Service
CE	Comisión Europea
D	Disolución
EINECS	European Inventory of Existing Chemical Substances
FC	Factor de conversión
Genpd	Genipósido
HLB	Balance hidrofílico-lipofílico
InChI	International Chemical Identifier
INCI	International Nomenclature of Cosmetic Ingredients
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
I. C. LSD	Intervalos de Confianza Least Significant Difference
i. p.	Vía intraperitoneal
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
i.v.	Vía intravenosa
LD50	Dosis Letal media
MEA	Agar Extracto Malta
MLB	Caldo modificado letheen
nm	Nanómetros
O/W	Agua en aceite
PM	Peso molecular
p.o.	Vía oral
ppm	partes por millón
PubChem	Base de datos de moléculas mantenido por el National Center for Biotechnology Information
PVP	Polivinilpirrolidona
SCCNFP	Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-food products
Solv.	Solvente
S/Solv	Relación sólido/ Solvente
T	Temperatura
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
USA	Estados Unidos de América
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
VA	Volumen de alícuota
VD	Volumen de disolución
v/v	volumen/volumen

ÍNDICE GENERAL

INDICE DE ABREVIATURAS.....	i
ÍNDICE GENERAL.....	ii
ÍNDICE DE CUADROS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS.....	ix
ÍNDICE DE ANEXOS.....	x
INTRODUCCIÓN.....	
CAPÍTULO I.....	1
1 MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 Cosméticos.....	1
1.1.1 Definición de cosméticos.....	1
1.1.2 Categoría de productos cosméticos.....	1
1.1.3 Cosmética natural.....	2
1.1.3.1 Cosmético natural.....	2
1.1.3.2 Cosmético natural y ecológico.....	3
1.1.4 Cosméticos decorativos.....	3
1.1.5 Cosméticos decorativos para los ojos.....	3
1.1.6 Sustancias utilizadas en cosméticos decorativos para ojos.....	4
1.1.6.1 Caolín.....	4
1.1.6.2 Polímeros y resinas.....	4
1.1.6.3 Ceras.....	5
1.1.6.4 Sustancias auxiliares.....	5
1.1.6.5 Pigmentos.....	5
1.1.7 Consideraciones generales para la elaboración de cosméticos.....	5
1.1.7.1 Parámetros que deben ser observados en la evaluación de los ingredientes para productos cosméticos.....	6
1.1.7.2 Consideraciones generales sobre estabilidad.....	7
1.2 Descripción de la especie.....	8
1.2.1 <i>Genipa americana</i> L.....	8
1.2.2 Área de distribución natural y de naturalización.....	9
1.2.3 Cultivo y Cosecha.....	10
1.2.4 Uso común y tradicional de las especies.....	10
1.2.5 Compuestos de <i>Genipa americana</i> L.....	10
1.3 Descripción de Genipósido y Genipina.....	12
1.3.1 Propiedades fisicoquímicas de Genipósido y Genipina.....	12
1.3.2 Estabilidad acuosa de la Genipina.....	14
1.3.3 Mecanismo de reacción de la Genipina con un grupo amino primario.....	14
1.3.4 Formación del pigmento azul por reacción de Genipina con un grupo amino primario	15
CAPÍTULO II.....	17
2 PARTE EXPERIMENTAL.....	17
2.1 Lugar de la investigación.....	17

2.2	Factores de estudio.....	17
2.3	Materiales, equipos y reactivos.....	17
2.3.1	Material de laboratorio.....	17
2.3.2	Equipos.....	18
2.3.3	Reactivos.....	18
2.3.4	Material para cromatografía.....	18
2.3.5	Materia prima (Nombre INCI).....	19
2.4	Métodos de análisis.....	19
2.4.1	Aislamiento de Genipósido.....	19
2.4.2	Análisis de los cristales de Genipósido mediante Cromatografía de Alta resolución.....	20
2.4.3	Determinación de la Eficiencia en extracción de Genipósido bajo condiciones específicas.....	21
2.4.3.1	Curva de Calibración de Genipósido.....	21
2.4.3.2	Condiciones de la determinación de eficiencia en extracción de Genipósido.....	21
2.4.4	Formulación de un delineador semipermanente a base de extracto de frutos verdes de <i>Genipa americana</i> L.....	24
2.4.4.1	Formulación para elaborar un delineador semipermanente en gel.....	24
2.4.4.2	Formulación para elaborar un delineador semipermanente tipo emulsión O/W.....	25
2.4.5	Determinación de las especificaciones de la formulación para la elaboración de un delineador semipermanente a base de frutos verdes de <i>Genipa americana</i> L.....	27
2.4.5.1	Ensayos organolépticos.....	27
2.4.5.2	Ensayos fisicoquímicos.....	28
2.4.5.3	Ensayos microbiológicos.....	29
2.4.6	Evaluación de la estabilidad forzada del Genipósido.....	31
	CAPÍTULO III.....	32
3	Resultados y discusión.....	32
3.1	Aislamiento de Genipósido.....	32
3.1.1	Compuestos extraídos con metanol.....	32
3.1.2	Separación de compuestos glicosilados.....	34
3.1.3	Compuestos extraídos mediante cromatografía flash de silicagel.....	36
3.1.4	Compuestos extraídos mediante cromatografía en columna de silicagel... ..	38
3.2	Análisis de los cristales de Genipósido mediante Cromatografía de Alta Resolución (HPLC).....	41
3.3	Determinación de la eficiencia en extracción de Genipósido en soluciones hidroalcohólicas bajo condiciones específicas.....	42
3.3.1	Curva de calibración de Genipósido.....	42
3.3.2	Cuantificación de Genipósido bajo distintas condiciones de extracción... ..	43
3.3.3	Análisis estadístico de los datos de extracción de Genipósido.....	45
3.3.3.1	Medidas descriptivas.....	45
3.3.3.2	Gráficos de interacciones.....	47
3.3.3.3	Análisis de la muestra.....	48

3.3.3.4	Análisis de la población.....	48
3.4	Formulación de un delineador semipermanente a base de frutos verdes de <i>Genipa americana</i> L.....	51
3.4.1	Formulación para un delineador en forma de gel.....	51
3.4.2	Formulación para un delineador en forma de emulsión O/W.....	52
3.4.3	Especificaciones del delineador semipermanente propuesto a base de frutos verdes de <i>Genipa americana</i> L.....	55
3.5	Evaluación de la estabilidad del Genipósido.....	56
	CAPÍTULO IV.....	60
4	Conclusiones.....	60
	CAPÍTULO V.....	62
5	Recomendaciones.....	62
	CAPÍTULO VI.....	64
6	Resumen.....	64
	CAPÍTULO VII.....	67
7	Bibliografía.....	67
	CAPÍTULO VIII.....	74
8	Anexos.....	74

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N° 1	Diseño experimental para la determinación de la eficiencia en extracción de Genipósido. Diseño Factorial 3x2x4.....	23
CUADRO N° 2	Descripción del valor Rf de los compuestos presentes en el extracto metanólico de frutos verdes de <i>Genipa americana</i> L.....	34
CUADRO N° 3	Descripción del valor Rf de los compuestos presentes en el extracto butanólico de frutos verdes de <i>Genipa americana</i> L.....	36
CUADRO N° 4	Descripción del valor Rf de los compuestos presentes en la fracción 6 obtenido mediante cromatografía flash en silicagel.....	38
CUADRO N° 5	Curva de calibración para el Genipósido aislado de frutos verdes de <i>Genipa americana</i> L.....	43
CUADRO N° 6	Códigos y variables de estudio del análisis de eficiencia en extracción de Genipósido.....	45
CUADRO N° 7	Porcentaje de Genipósido obtenido bajo distintas condiciones de extracción.....	46
CUADRO N° 8	Estadísticos para la variable relación sólido- solvente en el análisis de eficiencia de extracción de Genipósido.....	47
CUADRO N° 9	Estadísticos para la variable solvente en el análisis de eficiencia de extracción de Genipósido	47
CUADRO N° 10	Estadísticos para la variable temperatura en el análisis de eficiencia de extracción de Genipósido	47
CUADRO N° 11	ANOVA factorial sin interacciones de los datos de extracción de Genipósido bajo distintas condiciones.....	50
CUADRO N° 12	ANOVA factorial. Comparaciones múltiples de los ensayos de eficiencia en extracción de Genipósido.....	50
CUADRO N° 13	ANOVA factorial con interacciones a dos niveles de los datos de extracción de Genipósido bajo distintas condiciones.....	51
CUADRO N° 14	Análisis I.C. LSD con interacción a dos niveles.....	51
CUADRO N° 15	Absorbancia observada en las muestras sometidas a los diferentes tratamientos de estudio de estabilidad.....	56
CUADRO N° 16	Concentración de Genipósido en las muestras sometidas a diferentes tratamientos de estudio de estabilidad	56

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N° 1	Descripción de <i>Genipa americana</i> L.....	9
TABLA N° 2	Análisis alimentario de <i>Genipa americana</i> L.....	11
TABLA N° 3	Información sobre Genipósido.....	12
TABLA N° 4	Información sobre Genipina.....	13
TABLA N° 5	Composición de partida de un delineador semipermanente en forma de gel.....	24
TABLA N° 6	HLB de los componentes de la fase lipófila de la emulsión O/W.....	25
TABLA N° 7	Composición de partida de un delineador semipermanente tipo emulsión O/W.....	26
TABLA N° 8	Porcentajes de recuperación de compuestos extraídos en cada etapa durante el aislamiento del Genipósido.....	41
TABLA N° 9	Formulaciones para la elaboración de un delineador semipermanente en forma de emulsión O/W.....	53
TABLA N° 10	Especificaciones del delineador semipermanente propuesto a base de frutos verdes de <i>Genipa americana</i> L.....	55

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO N° 1	Curva de calibración de Genipósido obtenido de frutos verde de <i>Genipa americana</i> L.....	44
GRÁFICO N° 2	Interacción de las variables relación sólido-solvente por solvente en el análisis de eficiencia de extracción de Genipósido.....	48
GRÁFICO N° 3	Interacción de las variables relación sólido-solvente por temperatura en el análisis de eficiencia de extracción de Genipósido.....	48
GRÁFICO N° 4	Interacción de las variables solvente por temperatura en el análisis de eficiencia de extracción de Genipósido.....	49
GRÁFICO N° 5	Degradación de Genipósido por hidrólisis alcalina.....	57
GRÁFICO N° 6	Degradación de Genipósido por hidrólisis ácida.....	57
GRÁFICO N° 7	Degradación de Genipósido por exposición a la luz.....	58

ÍNDICES DE FIGURAS

FIGURA N° 1	Las áreas de distribución natural e introducidas aproximadas del árbol de Jagua, <i>Genipa americana</i> L.....	9
FIGURA N° 2	Reacciones reversible y de apertura de anillo propuestas para la Genipina en solución acuosa.....	14
FIGURA N° 3	El grupo Touyama propone un mecanismo de reacción de la Genipina con metilamina.....	15
FIGURA N° 4	Mecanismo de reticulación intermolecular e intramolecular de la Genipina con el colágeno.....	15
FIGURA N° 5	Cromatograma de Genipósido mediante HPLC. Condiciones: Acetonitrilo: Agua acidificada (Ácido acético, pH3, 0; 15:85) como fase móvil y detección por absorción UV (240nm).....	42

ÍNDICES DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA N° 1	Frutos de <i>Genipa americana</i> L.....	8
FOTOGRAFÍA N° 2	Cromatografía del extracto metanólico de <i>Genipa americana</i> L, sistema de solventes: CHCl ₃ - CH ₃ OH- H ₂ O (60:40:4, v/v), revelador vainillina sulfúrica.....	34
FOTOGRAFÍA N° 3	Separación de la fracción glicosídica mediante cromatografía flash de carbón activado. a. Azúcares eluidos con etanol 10%, b. Azúcares eluidos en la transición de etanol 10% a metanol. c. Compuestos glicosídicos eluidos con metanol.	35
FOTOGRAFÍA N° 4	Cromatografía del extracto butanólico de <i>Genipa americana</i> L, sistema de solventes: BUOH – CH ₃ COOH- H ₂ O (4:1:5,v/v), revelador vainillina sulfúrica. a. Extracto metanólico inicial, b. Extracto butanólico, c. Extracto acuoso..	37
FOTOGRAFÍA N° 5	Cromatografía en capa fina de las fracciones 4, 5 y 6 obtenidos de la extracción en columna flash de silicagel, sistema de solventes: CHCl ₃ - CH ₃ OH- H ₂ O (60:40:4, v/v), revelador vainillina sulfúrica.....	38
FOTOGRAFÍA N° 6	Cromatografía en capa fina de la fracción 6. Sistema de solventes: acetato de etilo–n-butanol-agua (2:1.5:3, v/v/v) Revelador vainillina sulfúrica.....	39
FOTOGRAFÍA No 7	Cromatografía en capa fina de la fracción 6. Sistema de solventes: CH ₃ OH - CHCl ₃ – CH ₃ COOH (3:7:1, v/v). Revelador vainillina sulfúrica.....	40
FOTOGRAFÍA No 8	Cromatografía en capa fina de las fracciones 4, 5 y 6 obtenidas por cromatografía en columna de silicagel, sistema de solventes: CHCl ₃ - CH ₃ OH- H ₂ O (60:40:4, v/v), revelador vainillina sulfúrica.....	41
FOTOGRAFÍA No 9	Diferencia en el color de la extracción al utilizar etanol 95% y etanol 50%.....	45
FOTOGRAFÍA No 10	Delineador en forma de gel.....	52
FOTOGRAFÍA No 11	Formulación No 3 para la elaboración de un delineador en forma de emulsión o/w.....	54
FOTOGRAFÍA No 12	Aplicación del delineador semipermanente propuesto.....	54

ÍNDICES DE ANEXOS

ANEXO N° 1	Secuencia de fotos del aislamiento de Genipósido.....	71
ANEXO N° 2	TLC de las fracciones 3-14 obtenidos mediante cromatografía flash de silicagel.....	72
ANEXO N° 3	TLC de las fracciones 1 a 14 obtenidos mediante cromatografía en columna de silicagel.....	72
ANEXO N° 4	Fotografía del equipo de HPLC LC-10Ai SHIMADZU.....	73
ANEXO N° 5	Picos identificados en el solvente metanol-agua mediante HPLC. Ensayo 1.....	73
ANEXO N° 6	Cromatograma del solvente metanol-agua obtenido mediante HPLC.....	74
ANEXO N° 7	Picos identificados en el solvente metanol-agua mediante HPLC. Ensayo 2.....	74
ANEXO N° 8	Picos identificados en la muestra de Genipósido mediante HPLC. Ensayo 1.....	75
ANEXO N° 9	Picos identificados en la muestra de Genipósido mediante HPLC. Ensayo 2.....	75
ANEXO N° 10	Picos identificados en la muestra de Genipósido mediante HPLC. Ensayo 3.....	76
ANEXO N° 11	Fotografías de la determinación de la curva de calibración del Genipósido.....	76
ANEXO N° 12	Fotografías de la determinación de la eficiencia en extracción de Genipósido bajo condiciones específicas.....	77
ANEXO N° 13	Fotografías de la determinación de la eficiencia en extracción de Genipósido bajo condiciones específicas. (Continuación)...	78
ANEXO N° 14	Datos experimentales de la determinación de la eficiencia en extracción de Genipósido bajo condiciones específicas.....	79
ANEXO N° 15	Datos experimentales de la determinación de la eficiencia en extracción de Genipósido bajo condiciones específicas. (Continuación).....	80
ANEXO N° 16	Secuencia de fotografías de la elaboración del delineador propuesto.....	81
ANEXO N° 17	Secuencia de fotografías del estudio de estabilidad forzada de Genipósido.....	82

INTRODUCCIÓN

El comercio de productos de belleza ha experimentado un auge en los últimos cinco años a nivel mundial; en el Ecuador la industria cosmética genera 350 millones de dólares anuales y crece a un promedio del 20%, se estima que una persona de bajos ingresos gasta entre 20 y 30 dólares al año en artículos básicos de cuidado personal, mientras que una persona con ingresos más altos gasta una media de 150 dólares al año. (42)

Estos índices muestran que el mercado de los cosméticos es prometedor, sin embargo también se reporta que el 90% de los productos vendidos son importados desde Colombia, Perú, USA, Argentina, Chile, Brasil y Francia en contraposición al 10% que corresponde a los productos ofertados por la industria nacional. Apoyados en estos datos es evidente que las industrias del país necesitan entregar a los consumidores productos innovadores accesibles y de calidad. (42)

A la par de la gran demanda en el comercio de productos de belleza, se ha experimentado problemas de salud en los usuarios que utilizan cosméticos con sustancias tóxicas provenientes de industrias inescrupulosas, razón por la cual los organismos reguladores internacionales desarrollaron listas de sustancias permitidas para la elaboración de cosméticos inocuos; a saber, el uso de colores se restringió con la sanción de la Ley de Alimentos y Drogas de 1906 por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, luego de que hubo constancia del empleo descuidado e indiscriminado de colorantes peligrosos como los derivados de alquitrán de hulla, en sustancias alimenticias y bebidas. (2) (37)

Por otro lado el actual Comité de los productos de consumo de la Comisión Europea prohibió, en diciembre de 2006 (Directiva 2006/65/CE de la Comisión de 19 de julio de 2006), la venta de cosméticos que incluían tintes azoicos relacionados con el riesgo de

cáncer vesical y específicamente se impidió la utilización de 22 sustancias porque la industria no emitió ningún informe de seguridad. (2)(36)

A pesar de estas circunstancias negativas que rodean a los cosméticos, lo cierto es que su uso prevalece desde tiempos antiguos, tanto con fines decorativos como destinados para rituales religiosos; el uso popular de productos de origen vegetal, animal y mineral son la base para explotar comercialmente sustancias inocuas para la industria, ejemplo de ello es el empleo de los frutos verdes de *Genipa americana* por las poblaciones indígenas de América del Sur, como colorante negro para el cuerpo durante las ceremonias para las batallas. (16)

Un artículo de las Naciones Unidas titulado “Market Brief in the European Union for selected natural ingredients derived from native species” ha propuesto la utilización de varios componentes del árbol de huito (*Genipa americana L*) como frutos, corteza, resina, y flores para elaborar productos como colorantes, almíbares, bebidas, licores; productos farmacéuticos como insecticidas, fungicidas, y antibióticos, productos para el cuidado personal como perfumes, shampoos, desodorantes, etc. Resalta el mercado potencial de colorantes alimenticios y cosméticos que pueden cubrir el Genipósido, o su aglicona Genipina, que son los compuestos responsables de desarrollar el color azul oscuro de este fruto; así, en la industria de cosméticos se utilizarían para productos decorativos como maquillaje de ojos, esmalte de uñas, barra de labios, tatuajes y tintes capilares. (43)

Es por ello que en esta tesis se desarrolló un estudio en el cual se propuso como hipótesis que el extracto de los frutos verdes de *Genipa americana L.* puede ser utilizado como colorante para la formulación de cosméticos decorativos, con el fin de darle un valor agregado a esta especie que crece en los bosques de la Amazonía Ecuatoriana.

Los objetivos fueron purificar el compuesto colorante, Genipósido, de los frutos de *Genipa americana L.* para realizar un análisis de eficiencia en extracción. Las variables de estudio fueron la condición de concentración y pH del solvente (etanol), la

temperatura y la relación sólido-solvente; se escogieron estos parámetros con el fin de optimizar la extracción ya que se conoce que los colorantes naturales tienden a ser más caros que los sintéticos por las características tanto del proceso de obtención como por su concentración en la materia prima, esta última consideración no es preocupante ya que se ha reportado que la cantidad de Genipina es del 4-6% del fruto seco. (13)

Las ventajas de utilizar este colorante en un cosmético son su inocuidad avalado en publicaciones que garantizan la baja toxicidad de este compuesto (En ratones LD50 i.v., i. p. y p.o. es de 3g/Kg) y la coloración atractiva negro-azul que se consigue sin presentar riesgos para la salud, además esta tinción permanece en la piel por un periodo de 5 días, por tanto se propone la elaboración de un delineador semipermanente para aquellas personas que no desean maquillarse muy a menudo. (26)

El siguiente objetivo fue ensayar formulaciones de los tipos gel y emulsión O/W que permitan obtener un producto con características de fácil aplicación, fijación continua en la piel, extensibilidad sin dejar grumos y tiempo de secado óptimo; se limitó a estas formas cosméticas debido a que el compuesto es soluble en condiciones hidrofílicas.

Como último objetivo se propuso determinar las especificaciones de la mejor formulación que permitan la reproducibilidad del producto, cerciorar que los parámetros físico químicos conserven estable al Genipósido y ajustarse con los requisitos de calidad, para entregar al consumidor un cosmético novedoso y seguro.

CAPÍTULO I

1 MARCO TEÓRICO

1.1 COSMÉTICOS

1.1.1 DEFINICIÓN DE COSMÉTICOS

“Cosméticos, Productos de Higiene y Perfumes “son preparaciones constituidas por sustancias naturales o sintéticas, de uso externo en las diversas partes del cuerpo humano, piel, sistema capilar, uñas, labios, órganos genitales externos, dientes y membranas mucosas de la cavidad oral, con el objetivo exclusivo o principal de limpiarlas, perfumarlas, modificar su apariencia y/o corregir olores corporales y/o protegerlas o mantenerlas en buen estado”. (11) (12)

1.1.2 CATEGORÍAS DE LOS PRODUCTOS COSMÉTICOS

Según el Real Decreto 1599/1997, de 17 de octubre, sobre productos cosméticos, Normativa vigente en España los productos cosméticos se distribuyen en las siguientes categorías:

1. Cremas, emulsiones, lociones, geles y aceites para la piel.
2. Máscaras de belleza (con exclusión de los productos de abrasión superficial de la piel por vía química).
3. Maquillaje (líquidos, pastas, polvos).
4. Polvos de maquillaje, polvos para utilizar después del baño y para la higiene corporal.
5. Jabón de tocador, jabón desodorante.
6. Perfumes, aguas de tocador, aguas de colonia.

7. Productos para baño y ducha (sales, espumas, aceites, geles).
8. Depilatorios.
9. Desodorantes y antitranspirantes.
10. Productos capilares:
Tintes y decolorantes.
 - Productos para moldear, para desrizar y fijar.
 - Productos que ayudan a mantener el peinado.
 - Productos de limpieza (lociones, polvos, champús).
 - Productos acondicionadores (lociones, lacas, brillantinas).
 - Otros productos para el peinado.
11. Productos para el afeitado (jabones, espumas, lociones).
12. Productos para el maquillaje y desmaquillaje de la cara y los ojos.
13. Productos para los labios.
14. Productos para cuidado bucal y dental.
15. Productos para cuidado y maquillaje de las uñas.
16. Productos para cuidado íntimo externo.
17. Productos solares.
18. Productos para bronceado sin sol.
19. Productos blanqueadores de la piel.
20. Productos antiarrugas. (41)

1.1.3 COSMÉTICA NATURAL

Ecocert, institución no gubernamental con sede en Francia y delegaciones en varios países entre ellos, España define cosmético natural y cosmético natural y ecológico como sigue:

1.1.3.1 Cosmético natural

Es el que reúne las siguientes condiciones: un mínimo del 95% del total de los ingredientes (incluyendo el agua) es natural o de origen natural. Como máximo el 5% restante pueden ser ingredientes de síntesis, que forman parte de una corta lista restrictiva que incluye algunos conservantes y sustancias auxiliares. Como mínimo el

5% del total de los ingredientes procede de agricultura biológica, que representa como mínimo el 50% de los ingredientes vegetales.

1.1.3.2 Cosmético natural y ecológico

Cuando cumple las siguientes exigencias: como mínimo el 95% del total de los ingredientes es natural o de origen natural. Como máximo el 5% restante pueden ser ingredientes de síntesis que forman parte de la lista restrictiva. Un mínimo del 10% del total de los ingredientes procede de agricultura biológica, que representa como mínimo el 95% de los ingredientes vegetales.

Los conservantes permitidos son: ácido benzoico y sus sales; ácido propiónico y sus sales; ácido salicílico y sus sales; ácido 4 hidroxibenzoico, sus sales y sus ésteres; ácido fórmico; 2 fenoxietanol; alcohol benzílico; y ácido sórbico. (36) (39)

1.1.4 COSMÉTICOS DECORATIVOS

“Los productos cosméticos decorativos son aquellos cuya función es dar color o modificar el color de la zona corporal en la que van a ser aplicados. Es por esta razón, que este tipo de preparados está formado por dos componentes esenciales, la parte activa compuesta por pigmentos o colorantes y el vehículo, también conocido como excipiente. Los colorantes utilizados en este tipo de cosméticos deben presentar unas características comunes tales como figurar en las listas positivas de la legislación cosmética vigente, ser dermatológicamente inocuos, cumplir los requisitos de pureza química y presentar el tamaño de partícula adecuado para su incorporación. Los vehículos o excipientes utilizados en los productos cosméticos decorativos pueden agruparse en polvos sueltos o compactos, suspensiones, pomada y emulsiones” (9).

1.1.5 COSMÉTICOS DECORATIVOS PARA LOS OJOS

La decoración de la zona ocular se practica desde la antigüedad, en Egipto se utilizaba una mezcla de carbón, kohl y grasa animal para aplicarlo en párpados y pestañas con el fin de acentuar la mirada y atraer la atención hacia los ojos. Existen varios productos

cosméticos para este fin, uno de ellos es el delineador de ojos, este cosmético se presenta en forma líquida, gel y lápiz. En su versión fluida, la composición de estos productos presenta muchas similitudes con la de los maquillajes fluidos, pero, obviamente, difiere en los agentes colorantes (que son similares a los de los rímeles), así como en la incorporación de sustancias filmógenas (normalmente polímeros sintéticos cuya finalidad es la de formar una película elástica sobre la piel) y en la eliminación de los aceites de la parte grasa (para darle mayor fijación y evitar que se corra). Respecto a su versión en lápiz de ojos extruido, suele tratarse de productos tipo *kohl* incorporados en minas fuertemente grasas, de consistencia adecuada, que los hacen aptos para conseguir una distribución fina y uniforme, así como una buena permanencia del producto sobre los párpados. (1) (10)

1.1.6 SUSTANCIAS UTILIZADAS EN COSMÉTICOS DECORATIVOS PARA OJOS

1.1.6.1 Caolín

Se trata de un silicato de aluminio hidratado que se presenta en forma de polvo muy fino de color blancogrisáceo, con un tacto untuoso. Presenta unas apropiadas propiedades absorbentes, además de ser tolerado dermatológicamente. Su utilización en este tipo de preparados incrementa el poder absorbente y cubriente, y elimina el brillo del talco al ser totalmente opaco. (9).

1.1.6.2 Polímeros y resinas

“Estos activos forman una película uniforme en la piel, destacan los derivados de celulosa (fundamentalmente, hidroxietilcelulosa); la goma de acacia (INCI: Acacia senegal); el alcohol polivinílico y sus derivados, los polímeros cuaternarios como Polyquaternium-10; los derivados del ácido vinilacrílico, como alil estearato/VA copolímero, y los derivados de vinilpirrolidona, como PVP/eicoseno copolímero. Estos últimos también actúan como dispersantes de los pigmentos de color y mejoran su fijación”. (28)

1.1.6.3 Ceras

Impermeabilizan y protegen, la adherencia y flexibilidad se consigue combinando ceras duras y flexibles en la proporción adecuada. Las ceras duras, que poseen mayor punto de fusión, fijan a las ceras flexibles sobre la piel y pestañas de forma inmediata. Las más empleadas son las de carnaúba (INCI: *Copernicia cerifera*), de candelilla INCI: *Euphorbia cerifera*) y la cera de arroz (INCI: *Oryza sativa*). Entre las ceras flexibles empleadas con más frecuencia cabe citar la de jojoba (INCI: *Simmondsia chinensis*), la de abejas (INCI: Cera alba) y la ozoquerita (INCI: ozokerite). Según el porcentaje final en que figuren cada una de ellas en las formulaciones pueden ser cremosas o más ligeras. (28)

1.1.6.4 Sustancias auxiliares

“Se incluyen conservantes, antioxidantes (p. ej., acetato de tocoferol), reguladores del pH, etc. El pH final del producto es similar al de la lágrima”. (28)

1.1.6.5 Pigmentos

“Los pigmentos de color más empleados son los óxidos de hierro (INCI: iron oxides). Para conseguir un color más definido, los productos más avanzados también incluyen pigmentos perlados, que absorben la luz y reflejan el mismo tono que la máscara. En consecuencia, la cantidad de luz reflejada es mayor que cuando sólo existen pigmentos de color, y las pestañas se perciben con un color más nítido”. (28)

1.1.7 CONSIDERACIONES GENERALES PARA LA ELABORACIÓN DE COSMÉTICOS.

Es total responsabilidad del fabricante, del importador o del responsable de la colocación del producto en el mercado, garantizar su seguridad para los consumidores en las condiciones normales o razonablemente previsibles de uso.

Considerándose que no existe ausencia total de riesgo, según surge de la literatura consultada, y en función de las dificultades para establecer conceptos relativos a una

condición razonablemente previsible de uso, el responsable de un producto cosmético debe emplear recursos técnicos y científicos suficientemente capaces de reducir posibles daños a los usuarios, es decir:

- a) formular el producto con *ingredientes referenciados*, que sean lo más seguros posible.
- b) dejar un margen de seguridad entre el nivel de riesgo y el nivel de uso del producto.
- c) informar al consumidor, de la forma más clara posible, a fin de evitar un mal uso del producto.
- d) seguir las *Buenas Prácticas de Fabricación y Control*. (35)

1.1.7.1 Parámetros que deben ser observados en la evaluación de los ingredientes para productos cosméticos

Los ingredientes de productos cosméticos pueden ser sustancias químicas, extractos de origen botánica o animal, o asociación de ingredientes.

Esta consideración lleva a pensar que los parámetros a contemplar en la evaluación de la seguridad de uso de tales componentes dependen de su categoría.

1. Caracterización

Es necesaria tener a disposición los siguientes datos, para todos los ingredientes:

- Nombre comercial;
- Codificación *INCI*, cuando la haya;
- Número *CAS* o *EINECS*;
- Especificaciones físico químicas, microbiológicas y de estabilidad;
- Método de identificación;
- Restricción de uso;
- Condiciones particulares de almacenaje y manejo.

2. Aplicación cosmética:

- Concentración de uso indicada por el proveedor;
- Restricciones reglamentares de uso;
- Otros usos.

3. Datos toxicológicos:

El producto cosmético debe ser seguro para el usuario en las condiciones normales o razonablemente previsibles de uso. Esto significa que los ingredientes se deben incorporar a la fórmula del producto cosmético en un nivel de concentración que presente un margen de seguridad adecuado. (35)

1.1.7.2 Consideraciones generales sobre estabilidad.

El estudio de la estabilidad de productos cosméticos proporciona informaciones que indican el grado de estabilidad relativa de un producto en las variadas condiciones, a las que pueda estar sujeto desde su fabricación hasta su expiración.

Esta estabilidad es relativa, pues varía con el tiempo y en función de factores que aceleran o retardan alteraciones en los parámetros del producto. Modificaciones dentro de límites determinados pueden no configurar como motivo para reprobar el producto.

El estudio de la estabilidad de productos cosméticos contribuye para:

- Orientar el desarrollo de la formulación y del material de acondicionamiento, adecuado;
- Proporcionar ayudas para el perfeccionamiento de las formulaciones;
- Estimar el plazo de validez y proporcionar informaciones para su confirmación;
- Auxiliar en el monitoreo de la estabilidad organoléptica, físico-química y microbiológica, produciendo informaciones sobre la confiabilidad y seguridad de los productos.

Antes de iniciar los Estudios de Estabilidad, se recomienda someter al producto a la prueba de centrifugación. Se sugiere centrifugar una muestra a 3.000 rpm durante 30 minutos. El producto debe permanecer estable y cualquier señal de inestabilidad indica la necesidad de reformulación. Si es aprobado en esta prueba, el producto puede ser sometido a las pruebas de estabilidad. (10)

1.2 DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE

1.2.1 *Genipa americana* L.

“*Genipa americana* es un árbol de tamaño pequeño a mediano, de 8 a 20 m de altura, sin embargo se encuentran especímenes de hasta 30 metros. El diámetro del tronco es de 30 a 80 cm y tiene una corteza gruesa y suave. Cuenta con una copa densa y las ramas más bajas crecen más o menos en forma horizontal, con 10 a 35 hojas en los extremos. En la mayor parte de la cuenca del Amazonas, los árboles florecen de mayo a septiembre y dan frutos entre septiembre y abril. Los frutos tardan hasta un año para madurar. En la mayoría de los árboles, las abejas polinizan las flores. Su fruto es grande, tipo baya, de 9 a 15 cm de largo, 7 a 9 cm de ancho, con un peso entre 200 y 400 g; tiene una capa delgada y correosa de 1 a 2 cm de espesor, y su pulpa es de color amarillo-marrón. La cavidad central contiene hasta 300 semillas, encerradas en las membranas. Las semillas son duras, planas y de color marrón oscuro. Son de 10 a 12 mm de longitud y por lo general se cuentan 10.000 en un kg. La germinación es alta, pero lento el crecimiento inicial.” (43)



FOTOGRAFÍA No. 1. FRUTOS DE *Genipa americana* L.

FUENTE: TENESACA, S. 2011

TABLA No 1. DESCRIPCIÓN DE *Genipa americana* L.

Familia	Rubiaceae
Género	Genipa
Especie	Americana
Nombres comunes	Jagua, juito, huito y genipa (En Latinoamérica y áreas españolas), genipap y genipa (inglés), bois de fer (Francés) y genipapo (Portugués)
Partes utilizadas	Frutos, corteza, resina y flores

FUENTE: UNITED NATIONS CONFERENCE ON TRADE AND DEVELOPMENT 2005.

1.2.2 ÁREA DE DISTRIBUCIÓN NATURAL Y DE NATURALIZACIÓN

“El árbol de jagua se originó probablemente en la Cuenca Amazónica y fue esparcido a través de los Trópicos Americanos por los seres humanos en tiempos pre-históricos. Los límites originales de su distribución se desconocen. Hoy en día, los árboles de jagua crecen naturalmente a lo largo de ambas costas en México un poco al norte del Istmo de Tehuantepec y del istmo a través de la América Central y a través del norte de la América del Sur hasta Paraguay y el norte de Argentina (Figura No. 1). Esta especie también se puede encontrar en las Antillas Mayores (a excepción de Jamaica) y en muchas de las islas de las Antillas Menores”. (16)



FIGURA No. 1 LAS ÁREAS DE DISTRIBUCION NATURAL E INTRODUCIDAS APROXIMADAS DEL ÁRBOL DE JAGUA, *Genipa americana* L.

FUENTE: FRANCIS K. 1993

1.2.3 CULTIVO Y COSECHA

El cultivo de *Genipa americana* L. puede realizarse con fines de aprovechamiento tanto de sus frutos como de la madera, se recomienda añadir cultivos temporales de algodón o yuca entre los árboles jóvenes para cuidarlos del sol. La cosecha de las frutas es factible cerca de los 6 años de edad del árbol, se puede recolectar entre 400 a 600 frutos por cosecha y se lo realiza en bolsas de ventilación. Para la extracción de colorante se macera la pulpa de la fruta en agua. (43)

1.2.4 USO COMÚN Y TRADICIONAL DE LAS ESPECIES

Del árbol de esta especie se producen colorantes, jarabes, ingredientes farmacéuticos, extractos curtientes y otros materiales. En zonas remotas de América Latina se utilizan las flores para elaborar aceites aromáticos y como infusión medicinal, la madera se utiliza en la ebanistería, en la fabricación de hormas para zapatos, mangos de herramienta, artículos torneados, trabajo doblado, material para muebles, pisos, chapas decorativas y paneles. La fruta se consume muy poco, pero se lo acepta mejor en jugos, jaleas, confites y licores, además se le atribuye propiedades medicinales como cicatrizante y para remover el pez parasítico *Vandellia* sp. que penetra en los orificios humanos. También de la fruta se obtiene un colorante para teñir telas y el cuerpo. (16) (43)

1.2.5 COMPUESTOS DE *Genipa americana* L.

Resultados de investigaciones indican que los compuestos bioquímicos de *Genipa americana* son:

- ✓ Lípidos: ácidos grasos y fitoesteroides como ergosta- 4, 6,22-trieno, 4,4-dimetil-colesta-6,22,24-trieno, β -sitosterol, tremulona, campesterol y estigmasterol.
- ✓ Compuestos fenólicos: 6,7-dimetóxi-cumarina, taninos.
- ✓ Iridoides: Genipósido, Ácido genípico, Ácido genipínico, tarenosídeo, gardenosídeo, gardendiol, shanzhisídeo, éster acetílico de ácido desacetilasperulosídico, genopocidic, entre otros.

- ✓ Monoterpenoides: genipacetal, genipaol
 - ✓ Compuestos volátiles: 2,4-octadieno, Estireno, Heptadienal, 2,3-dimetil-2-ciclopenteno-1-ona, Ácido hexanóico, Nonanol, Octanoato de metilo, Metilbenzaldeído, Ácido octanóico, Ácido 2-metil-butanóico.
 - ✓ Alcaloides: cafeína.
 - ✓ Ácidos y alcoholes orgánicos: manitol, ácido tartárico.
 - ✓ Otros: hidantoína.
- (31) (43)

TABLA No 2. ANÁLISIS ALIMENTARIO DE *Genipa americana* L.

Análisis alimentario por cada 100 g de pulpa comestible	
Calorías	113
Humedad	67.6 g
Proteínas	5.2 g
Lípidos	0.3 g
Glicerina	25.7 g
Fibra	9.4 g
Cenizas	1.2 g
Calcio	40.0 mg
Fósforo	58.0 mg
Hierro	3.6 mg
Vitamina B	0.04 mg
Vitamina B2	0.04 mg
Niacina	0.50 mg
Ácido ascórbico	33.0 mg
Aminoácidos (por g de Nitrógeno [N 6.25]	
Lisina	316 mg
Metionina	178 mg
Treonina	219 mg
Triptófano	57 mg

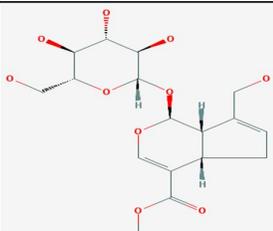
FUENTE: UNCTAD, 2005

1.3 DESCRIPCIÓN DE GENIPÓSIDO Y GENIPINA

1.3.1 PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE GENIPÓSIDO Y GENIPINA

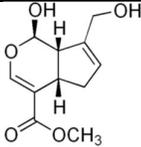
El Genipósido es un iridoide glicosilado que mediante hidrólisis con β -glucosidasa se descompone en Genipina y D-glucosa. La estructura de la Genipina fue descubierto en 1960 por Djerassi y sus colaboradores a partir de la fruta madura de *Genipa americana* L. esta sustancia es responsable de la coloración azul violeta que se observa al reaccionar espontáneamente con aminoácidos, en general con aminas primarias. Existen amplios estudios sobre las propiedades antiangiogénico, antiinflamatoria y antioxidante de este iridoide, además se lo considera un potente reticulante no tóxico de proteínas, cuya aplicación inmediata es la elaboración de un biopolímero para sistemas de liberación controlada de fármacos. El LD₅₀ i.v., i. p., y p.o. del Genipósido en ratones es de 3g/Kg, mientras que el LD₅₀ de la genipina en ratones es de 190 mg/Kg i. p. y 237 mg/Kg p.o. La Genipina constituye el 4-6% en peso de fruto seco, presenta absorbancia máxima en el espectro ultravioleta a una longitud de onda de 240 nm al igual que el Genipósido. (13) (14) (15) (27) (32)

TABLA No 3. INFORMACIÓN SOBRE GENIPÓSIDO

GENIPÓSIDO	
	
Nombre UIPAC	Methyl 7-(hydroxymethyl)-1-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-1,4a,5,7a-tetrahydrocyclopenta[c]pyran-4-carboxylate
InChI:	InChI=1S/C17H24O10/c1-24-15(23)9-6-25-16(11-7(4-18)2-3-8(9)11)27-17-14(22)13(21)12(20)10(5-19)26-17/h2,6,8,10-14,16-22H,3-5H2,1H3
Peso Molecular	388.36646 [g/mol]
Fórmula Molecular	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀

FUENTE: NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION 2011

TABLA No 4. INFORMACIÓN SOBRE GENIPINA

GENIPINA	
	
Nombre IUPAC	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-2-Hidroxi-9-(hidroximetil)-3-oxabicyclo[4.3.0]nona-4,8-dieno-5-carboxilato de metilo
Otros nombres	Éster metílico de ácido 1,4a-alfa,5,7a-alfa-tetrahidro-1-hidroxi-7-(hidroximetil)-ciclopenta(c)pirano-4-carboxílico
Identificadores	
Número CAS	6902-77-8
PubChem	442424
InChI	InChI=1/C11H14O5/c1-15-10(13)8-5-16-11(14)9-6(4-12)2-3-7(8)9/h2,5,7,9,11-12,14H,3-4H2,1H3/t7-,9-,11-/m1/s1
Propiedades	
Fórmula molecular	C ₁₁ H ₁₄ O ₅
Masa molar	226.226 g/mol
Apariencia	Cristales incoloros
Punto de fusión	120-121 °C
Solubilidad en agua	Soluble
Solubilidades	Soluble en metanol, etanol y éter dietílico.
Toxicidad	Baja toxicidad, (En ratón) LD50 i.p.153mg/kg y LD50 p.o. 237mg/kg.
Longitud de onda de absorción	La genipina absorbe en el ultravioleta a una longitud de onda de 240nm.

FUENTE: WIKIPEDIA 2011; UENG, T. et al. 1997; DJERASSI et al., 1960

1.3.2 ESTABILIDAD ACUOSA DE LA GENIPINA

La degradación de la genipina en solución acuosa consiste con un mecanismo de reacción de primer orden, con un primer paso reversible; en esta reacción la genipina se convierte en un intermediario hipotético, el cual puede reformarla, o ser degradado a un segundo producto de manera irreversible.

El pH de la solución influye drásticamente en la degradación de la genipina, es rápida bajo condiciones tanto alcalinas como ácidas, mientras que a pH 4-7 la molécula se mantiene inmutable por más tiempo. La degradación procede muy probablemente a través de la apertura del anillo reversible dihidropirano por agua seguida por la polimerización irreversible del intermedio (Figura No 2). (22)

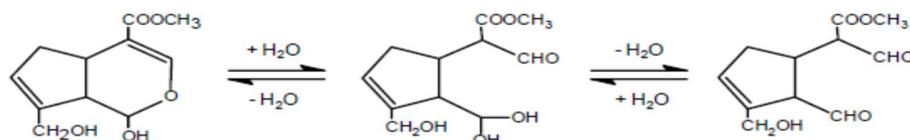


FIGURA No. 2 REACCIONES REVERSIBLE Y DE APERTURA DE ANILLO PROPUESTAS PARA LA GENIPINA EN SOLUCIÓN ACUOSA.

FUENTE: SLUSAREWICZ, P. et al. 2010

1.3.3 MECANISMO DE REACCIÓN DE LA GENIPINA CON UN GRUPO AMINO PRIMARIO

El grupo Touyama propuso un mecanismo para la reacción de genipina con metilamina. Su grupo prevé que la reacción se produjo a través de un ataque nucleofílico de la amina primaria en el carbono 3 de la genipina. Esta reacción se muestra en la figura No. 3 Por otro lado la reacción de genipina con las proteínas de la piel como el colágeno se ilustra en la figura No. 4. (25) (26)

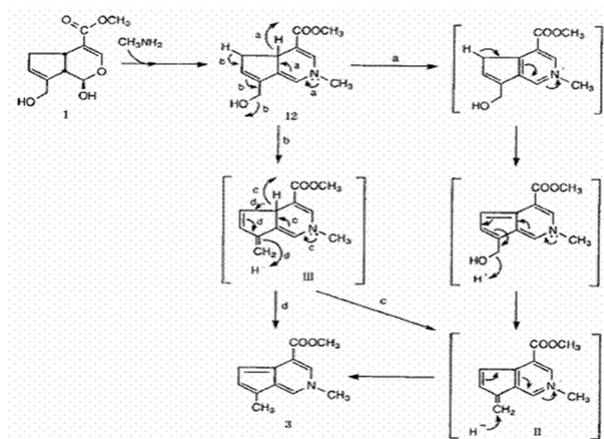


FIGURA No. 3 EL GRUPO TOUYAMA PROPONE UN MECANISMO DE REACCIÓN DE LA GENIPINA CON METILAMINA.

FUENTE: TOUYAMA, R. et al. 1994

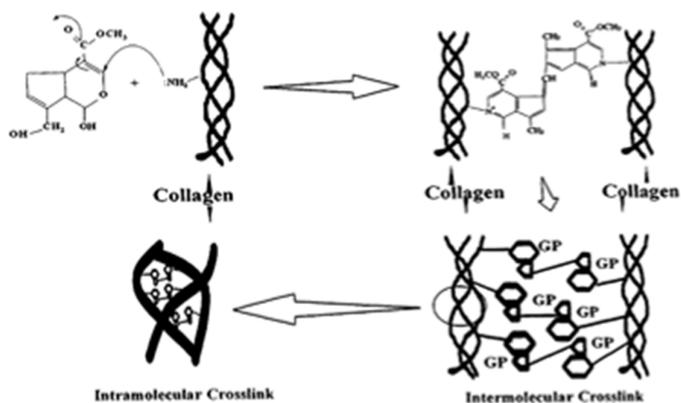


FIGURA No. 4 MECANISMO DE RETICULACIÓN INTERMOLECULAR E INTRAMOLECULAR DE LA GENIPINA CON EL COLÁGENO.

FUENTE: SUNG et al. 2003

1.3.4 FORMACIÓN DEL PIGMENTO AZUL POR REACCIÓN DE GENIPINA CON UN GRUPO AMINO PRIMARIO

La formación del pigmento azul por reacción de genipina con un grupo amino primario es óptimo a pH 7, el estudio de la absorbancia de una mezcla de genipina y aminoácidos en el espectro ultravioleta-visible demuestra que la $\lambda_{m\acute{a}x}$ a 240 nm

perteneciente a la genipina desaparece, mientras que aparece una nueva $\lambda_{m\acute{a}x}$ a 290 nm que corresponde a un intermediario, y finalmente se establece una $\lambda_{m\acute{a}x}$ entre 570-600 nm generado por el polímero pigmento azul formado. Este pigmento es más estable en solución alcalina (pH 9) que en solución neutra (pH 7) o ácida (pH 5) y se mantiene estable después de permanecer 10 horas a temperaturas de entre 60-90 °C (18)

CAPÍTULO II

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación se desarrolló en los laboratorios de Análisis instrumental y Productos Naturales de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2 FACTORES DE ESTUDIO

Se consideraron como factores en estudio:

1. La eficiencia en extracción del Genipósido bajo condiciones específicas
2. Aplicación del extracto en un producto cosmético
3. La determinación de las especificaciones del producto cosmético

2.3 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

2.3.1 MATERIAL DE LABORATORIO

- Vasos de precipitación
- Embudo de separación
- Varillas
- Balones esmerilados
- Cuba cromatográfica
- Pipetas aforadas

- Pipetas volumétricas
- Columnas cromatográficas
- Reverbero
- Espátulas
- Pinzas
- Tubos de ensayo
- Gradillas

2.3.2 EQUIPOS

- Cámara de Luz ultravioleta
- Evaporador rotatorio marca Heidolph
- Bomba generadora de vacío
- Espectrofotómetro marca Helios β .
- Baño de ultrasonidos marca Branson 2510
- Equipo HPLC marca LC-10Ai Shimadzu
- Balanza analítica marca Boeco Germany

2.3.3 REACTIVOS

- Metanol
- Cloroformo
- Ácido acético
- Ácido clorhídrico
- Etanol
- Alcohol butílico
- Acetonitrilo
- Agua bidestilada

2.3.4 MATERIAL PARA CROMATOGRAFÍA

- Placas cromatográficas de silicagel 60F₂₅₄
- Silicagel para cromatografía en columna

2.3.5 MATERIA PRIMA (NOMBRE INCI)

- Frutos verdes de *Genipa americana* L
- Copernicia Cerifera Cera
- Cera Alba
- Stearic Acid
- Cetyl Alcohol
- Lanolin
- Steareth-2
- Carbomer
- Triethanolamine
- Steareth-20
- Kaolin
- Propylene glycol
- Propylparaben
- Methylparaben

2.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS

2.4.1 AISLAMIENTO DE GENIPÓSIDO.

El aislamiento de Genipósido de los frutos verdes de *Genipa americana* L. se basó en el método descrito por Endo y Taguchi, así como en el método empleado por L'Empereur y Stermitz para el análisis de iridoides. A continuación se detalla el procedimiento:

1. Se ralló 349,5 g de frutos verdes de *Genipa americana* L.
2. Se separó las grasas y compuestos lipofílicos del material vegetal por maceración con 700 ml de cloroformo durante 3 horas.

3. Posteriormente se extrajo mediante maceración los iridoides glicosilados y otros compuestos polares con 1000 ml de metanol durante 3 horas, este extracto se evaporó a 60 °C bajo presión reducida.
4. Para separar los iridoides glicosilados de los azúcares obtenidos de la extracción metanólica se aplicó dos métodos: separación mediante una cromatografía flash de carbón activado, en el cual se eluyó primero etanol 10% para separar los azúcares y luego metanol para recuperar la fracción glicosídica. Y extracción n-butanol-agua, en el cual el residuo seco (19.9 g) se disolvió en 300 ml de agua y se extrajo con 3 fracciones de 100 ml de n-butanol con la finalidad de separar los azúcares, las fracciones se recolectaron y la mezcla se evaporó a 60 °C hasta sequedad. Se eligió la muestra obtenida mediante extracción butanol-agua para continuar con el aislamiento del Genipósido.
5. A continuación se empacó una columna cromatográfica flash con 25 g de silicagel para separar los iridoides glicosilados, el peso del residuo butanólico fue 3.3425 g, se utilizó como sistema de solventes $\text{CH}_3\text{OH} - \text{CHCl}_3$ (3:7, v/v), el cual se recolectó en fracciones de 10ml.
6. Para aislar el Genipósido se utilizó una columna cromatográfica de silicagel, el sistema de solventes fue $\text{CH}_3\text{OH} - \text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{COOH}$ (3:7:1, v/v) y se recolectó en fracciones de 1 ml
7. Finalmente se seleccionó la fracción 4, la cual se concentró y cristalizó mediante la adición de 3 ml de acetona para dar 5.3 mg de Genipósido.
(6)(15)(17)(23)(29)

2.4.2 ANÁLISIS DE LOS CRISTALES DE GENIPÓSIDO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).

Para el análisis de los cristales de Genipósido mediante cromatografía de alta resolución se basó en el método empleado por Barbosa con una modificación menor. Los cristales (3.5 mg) se disolvieron en una mezcla de metanol-agua (1:1, v/v) hasta volumen de 25 ml.

Para el análisis se utilizó un cromatógrafo LC-10Ai Shimadzu, equipado con detector de absorbancia (UV- Vis) SPD-10AVi Shimadzu, sistema inyector programado y columna Rexchrom C18. La fase móvil fue acetonitrilo-agua acidificada (Ácido acético, pH 3; 15:85), y la detección se centró en la visualización de un pico a $\lambda_{m\acute{a}x} = 240$ nm que corresponde al Genipósido. (31)

2.4.3 DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA EN EXTRACCIÓN DE GENIPÓSIDO BAJO CONDICIONES ESPECÍFICAS.

2.4.3.1 Curva de calibración de Genipósido

La curva de calibración para el Genipósido se realizó por el método de calibración de un estándar externo, para ello los cristales aislados de Genipósido se disolvieron a 25 ml con una solución de metanol-agua (1:1, v/v).

Luego se realizaron diluciones para obtener soluciones con concentraciones de 9.80, 19.60, 29.40, 40.60, 50.40 y 60.20 ppm y finalmente se midió la absorbancia de cada muestra a 240 nm en un espectrofotómetro Heλios β. (5)

2.4.3.2 Condiciones de la determinación de eficiencia en extracción de Genipósido

a) Variables de estudio

1. Relación sólido-solvente: 1: 2, 1:10, 1: 30.
2. Temperatura de extracción: 20 °C y 40 °C (Se exceptuaron temperaturas mayores debido a que el extracto se torna color azul con el incremento de la temperatura.
3. Solventes: Solución hidroalcohólica 50%, etanol 95%, solución hidroalcohólica 50% pH 4, etanol 95 % pH 4. (34) (31)

b) Procedimiento

1. Se trituraron los frutos verdes de *Genipa americana* L para distribuirlos en muestras de aproximadamente 5 gramos, y se adicionaron los diferentes solventes de extracción en las proporciones establecidas.
2. Las muestras se pusieron en el baño ultrasónico por treinta minutos, y se reguló la temperatura del baño mediante adición de hielo.
3. Se filtraron las muestras, luego se concentraron a presión reducida en un evaporador rotatorio a 60 °C.
4. Las muestras concentradas se pesaron y diluyeron a volúmenes específicos con una solución metanol-agua (1:1, v/v).
5. Finalmente se midió la absorbancia de cada muestra a 240 nm para cuantificar la concentración de Genipósido, se ajustaron los resultados al rango de absorbancia de la curva de calibración. (19)

CUADRO No 1. DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA EN EXTRACCIÓN DE GENIPOSIDO. DISEÑO FACTORIAL 3X2X4

Variables			
	Relación sólido-solvente (p/v)	Temperatura de extracción (°C)	Solventes % Etanol
Niveles	1: 2	20	50
			95
			50 pH 4
			95, pH 4
		40	50
			95
			50 pH 4
			95, pH 4
	1:10	20	50
			95
			50 pH 4
			95, pH 4
40		50	
		95	
		50 pH 4	
		95, pH 4	
1: 30	20	50	
		95	
		50 pH 4	
		95, pH 4	
	40	50	
		95	
		50 pH 4	
		95, pH 4	

c) Tratamiento estadístico de los datos

Para el tratamiento estadístico de los datos se utilizó el programa G-Stat 2.0, en el cual se realizó el análisis de la Varianza (ANOVA) multifactorial que es un método para comparar dos o más medias y el análisis de las comparaciones múltiples mediante el método I. C. LSD para diferenciar las medias poblacionales. (3)

2.4.4 FORMULACIÓN DE UN DELINEADOR SEMIPERMANENTE A BASE DE EXTRACTO DE FRUTOS VERDES DE *Genipa americana* L.

Para la elaboración de un delineador semipermanente se partió de la elección del tipo de forma farmacéutica adecuada a la solubilidad del colorante y a las propiedades y características del producto cosmético deseado; por lo tanto se optó por un gel y una emulsión O/W.

2.4.4.1 Formulación para elaborar un delineador semipermanente en gel

TABLA No 5. COMPOSICIÓN DE PARTIDA DE UN DELINEADOR SEMIPERMANENTE EN FORMA DE GEL.

Función	Materia prima	Porcentaje	Para 25 g
Vehículo	Carbomer	0,50	0,125
	Trietanolamina	0,10	0,025
	Agua	49,04	12,260
Colorante	<i>G. americana</i>	40,00	10,000
Sistema conservante	Metilparabeno	0,18	0,045
	Propilparabeno	0,18	0,045
	Propilenglicol	10	2,500
pH formulación			7

Procedimiento. Se calentó el agua a 85° C, luego se añadió el Carbomer con agitación, cuando el gel estuvo formado se añadió la trietanolamina y el colorante. Se enfrió la mezcla a 45 y finalmente se añadió el sistema conservante.

2.4.4.2 Formulación para elaborar un delineador semipermanente tipo emulsión O/W

Para determinar la concentración de los emulsionantes en la formulación se siguió el método de Griffin en el que el porcentaje de emulsionantes depende de la composición de la fase oleosa, para cada componente graso y para los emulsionantes se ha determinado el balance hidrófilo-lipófilo (HLB), el cual es la relación (o equilibrio) entre la porción hidrófila del tensioactivo no iónico a la porción lipófila de la formulación. (4)

Se calculó el HLB requerido según Griffin para la fase oleosa de una emulsión O/W.

TABLA No. 6 HLB DE LOS COMPONENTES DE LA FASE LIPÓFILA DE LA EMULSIÓN O/W

Componente	HLB	% En la formulación	% En la fase oleosa
Copernicia Cerifera Cera	12	0,6	6,3
Cera Alba	12	2,8	29,2
Stearic Acid	15	2,8	29,2
Cetyl Alcohol	15	1,7	17,7
Lanolin	12	1,7	17,7

$$HLB_{req} = \frac{\sum HLB \text{ de cada componente} * \% \text{ en la fase oleosa}}{100}$$

$$HLB_{req} = \frac{12 * 6.3 + 29.2 * 12 + 29.2 * 15 + 17.7 * 15 + 17.7 * 12}{100} = 13.4$$

El porcentaje de emulsionantes en la formulación se ajustó al 10% del peso de la fase oleosa. Se utilizó un par contrastado de emulsionantes, uno lipófilo Steareth-2 (HLB: 4.9) y uno hidrófilo Steareth-2 (HLB: 15.3) y se mezcló en una proporción adecuada para dar el valor de HLB requerido de la fase oleosa, según la fórmula:

$$HLB = XA + (1 - X)B$$

Donde x es la proporción de tensioactivos

A y B son los valores de HLB de los tensioactivos empleados.

De esta forma, se calculó la proporción de los emulsionantes a utilizar.

$$13.4 = X(15.3) + (1 - X) * 4.9$$

$$10.4x = 8.5$$

$$x = 0.82$$

Finalmente, la cantidad de emulsionantes a manejar en la fórmula fue:

$$0.82 * 1 = 0.82 \text{ para steareth-20 y}$$

$$0.18 * 1 = 0.18 \text{ para steareth-2}$$

TABLA No 7. COMPOSICIÓN DE PARTIDA DE UN DELINEADOR SEMIPERMANENTE TIPO EMULSIÓN O/W

Fase	Materia prima (Denominación INCI)	Peso 25g	Porcentaje %
A	Copernicia Cerifera Cera	0,150	0,6
	Cera Alba	0,700	2,8
	Stearic Acid	0,700	2,8
	Cetyl Alcohol	0,425	1,7
	Lanolin	0,425	1,7
	Steareth-2	0,046	0,18
	Steareth-20	0,204	0,8
B	Aqua	11,525	46,1
	Carbomer	0,150	0,6
	Triethanolamine	0,025	0,1
	Kaolin	0,100	0,4
C	Propylene glycol	1,250	5
	Propylparaben	0,025	0,1
	Methylparaben	0,025	0,1
D	Extracto de <i>Genipa americana</i>	9,250	37
	Total	25	100,0

Procedimiento.

1. Se calentó el agua a 80 °C, luego se añadió el caolín y el carbomer mientras se agitaba, cuando el gel estuvo formado se añadió la trietanolamina.
2. Se calentó la fase A a 80°C, luego se lo incorporó a la fase anterior mientras se agitaba hasta lograr una emulsión homogénea.
3. Se calentó el extracto de *Genipa americana* y se lo añadió a la emulsión.
4. Se disolvió los conservantes en el propilenglicol y se lo añadió a la mezcla anterior cuando ésta se enfrió a 45 °C.

2.4.5 DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIFICACIONES DE LA FORMULACIÓN PARA LA ELABORACIÓN DE UN DELINEADOR SEMIPERMANENTE DE FRUTOS VERDES DE *Genipa americana* L.

Para la determinación de las especificaciones de la formulación de un delineador semipermanente de frutos verdes de *Genipa americana* L. se utilizó métodos descritos en la USP 30, Guía para la Evaluación de la Seguridad de Productos Cosméticos, Guía de Estabilidad de Productos Cosméticos y Guía de Control de Calidad de productos Cosméticos de la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria de Brasil. (8)(11)(12)(35)

2.4.5.1 Ensayos organolépticos

1. Aspecto

Se observó visualmente las características de la muestra. Para la descripción del aspecto se consideraron términos como: Fluido, viscoso, volátil, homogéneo, heterogéneo, transparente, opaco, lechoso, etc.

En lo que respecta a las formas farmacéuticas tipo emulsión, son de principal preocupación la homogeneidad y la ausencia de proliferación y contaminación microbiana excesivas. Por lo que se consideró como signos de inestabilidad, la

separación de la emulsión; o los cambios organolépticos ya que la proliferación microbiana puede estar acompañada de decoloración, turbidez o formación de gases.

2. Color

Se observó el color de la muestra utilizando fuente de luz natural.

3. Olor

Se percibió el olor de la muestra, directamente a través del olfato.

2.4.5.2 Ensayos fisicoquímicos

1. pH (Determinación potenciométrica)

Antes del uso, se debe verificar la limpieza y la sensibilidad del electrodo utilizando soluciones tampón de referencia (pH 4 y 7). Se preparó una solución acuosa al 10% del producto y se midió el pH con un electrodo de vidrio.

2. Densidad

Se determinó la densidad como un parámetro que puede indicar la incorporación de aire o la pérdida de ingredientes volátiles al producto.

Se utilizó un picnómetro de vidrio de 10mL y se procedió de la siguiente manera:

- a) Se pesó el picnómetro vacío (M_0)
- b) Se lo llenó completamente con agua purificada, evitando introducir burbujas,
- c) Se secó cuidadosamente el picnómetro, y se pesó nuevamente (M_1)
- d) Se llenó el picnómetro completamente con la muestra
- e) Se secó cuidadosamente, y se pesó una vez más (M_2)

Para el cálculo se utilizó la siguiente fórmula:

$$d = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0}$$

Donde:

d = densidad

M₀ = masa del picnómetro vacío, en gramos

M₁ = masa del picnómetro con agua purificada, en gramos

M₂ = masa do picnómetro con la muestra, en gramos

3. Viscosidad

La viscosidad se determinó en un viscosímetro Brookfield digital que se basa en la resistencia que ofrece la sustancia al movimiento de la parte rotatoria del equipo y se procedió de la siguiente manera:

- a) Se agregó aproximadamente 5 g de la muestra en un vaso de precipitación
- b) Se adaptó el ursillo L3 al equipo porque su diámetro reducido es apto para la medición de muestras muy viscosas.
- c) Se programó el equipo a velocidad de 100 rpm y se anotó la lectura de la viscosidad

2.4.5.3 Ensayos microbiológicos

Los ensayos microbiológicos se realizaron con la finalidad de conservar las características microbiológicas conforme a los requisitos especificados. (30)(38)

1. Determinación del número de Microorganismos Aerobios Mesófilos UFC/g

Este estudio se realizó por el Método descrito por el Bacteriological Analytical Manual y se procedió de la siguiente forma:

- a) Se prepararon y etiquetaron por duplicado un conjunto de placas petri que contenían agar modificado letheen (MLA) para muestras diluidas desde un factor 10^{-1} a un factor 10^{-6} .
- b) Se tomó 1 gramo del cosmético y se añadió a un tubo de ensayo que contenía 1 ml de una solución estéril de Tween 80 y perlas de vidrio, esta mezcla se agitó en un Vortex, luego la mezcla se ajustó a volumen de 10 ml con caldo estéril letheen modificado (MLB), de esta forma se elaboró la dilución 10^{-1} .
- c) Para obtener la dilución 10^{-2} se tomó 1 ml de la dilución 10^{-1} y se añadió a un tubo de ensayo con 9 ml con MLB, y las siguientes diluciones se elaboraron consecutivamente usando la última dilución.
- d) Luego se inoculó 0.1 ml de cada dilución en la superficie de las cajas petri preparadas y se dispersó la muestra con una espátula Drigalski estéril.
- e) Se dejaron absorber las muestras por el medio de cultivo, luego se invirtieron las placas y se incubaron a 30 ± 2 °C por 48 horas
- f) Finalmente se contaron las colonias formadas en el medio de cultivo. (40)

2. Determinación de Levaduras y Hongos UFC/g

- a) Se prepararon y etiquetaron por duplicado un conjunto de placas petri que contenían agar extracto de Malta (MEA) y 40 ppm de clortetraciclina, para muestras diluidas desde un factor 10^{-1} a un factor 10^{-6}
- b) Las diluciones del producto cosmético se prepararon de la forma descrita anteriormente
- c) Luego se inoculó 0.1 ml de cada dilución en la superficie de las cajas petri preparadas y se dispersó la muestra con una espátula Drigalski estéril.

- d) Se dejaron absorber las muestras por el medio de cultivo, luego se invirtieron las placas, se incubaron a 30 ± 2 °C y se observaron a diario por 7 días.
- e) Finalmente se contaron las levaduras u hongos formados en el medio de cultivo.
(40)

2.4.6 EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD FORZADA DEL GENIPÓSIDO

El objetivo de este estudio es conocer las posibles rutas de degradación del Genipósido por lo que se ensaya la degradación artificial mediante hidrólisis ácida, hidrólisis alcalina, degradación oxidativa y efecto de la luz. Además este estudio nos advierte sobre los riesgos en la estabilidad química. (33)

Para ello se procedió de la siguiente manera:

- a) Se tomó una alícuota de 5 ml de extracto hidroalcohólico de *Genipa americana* L y se aforó a 25 ml con agua destilada, para la medición de la absorbancia en el espectro ultravioleta- visible se tomó 0.2 ml de esta solución y se aforó a 10ml, de esta forma se cuantificó la concentración inicial antes de someter a las condiciones degradativas de estudio.
- b) Se elaboraron soluciones del extracto para el estudio de hidrólisis alcalina mediante la adición de NaOH 20%, hidrólisis ácida mediante la adición de HCl 20%, degradación oxidativa mediante la adición de peróxido de hidrógeno al 30% y efecto de la luz.
- c) Para cada solución se adicionó 5 ml de extracto y se aforó a 25 ml con la solución degradativa, las muestras se colocaron en una estufa a 50 ± 2 °C, excepto la muestra sometida al efecto de la luz, la cual se mantuvo a la luz natural durante el día y bajo luz de neón en la noche.
- d) Se midió la absorbancia a 240 nm de cada solución a tiempo 0, 1, 3, y 4 días, para ello se preparó la muestra con una alícuota de 0.2 ml de la solución de estudio y se aforó a 10 ml con agua.

CAPÍTULO III

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 AISLAMIENTO DE GENIPÓSIDO.

Se aisló 3.5 mg de Genipósido de acuerdo como se explica en el capítulo II, la obtención del compuesto se logró en 4 etapas que se describen a continuación.

3.1.1 COMPUESTOS EXTRAÍDOS CON METANOL.

En el extracto metanólico se apreciaron 7 compuestos del tipo iridoide glicosilado, la detección se realizó por cromatografía en capa delgada con un sistema de solventes compuesto por cloroformo-metanol-agua (60:40:4, v/v) con revelador de vainillina sulfúrica. Se numeró las manchas en la Fotografía No. 2, de forma arbitraria en orden ascendente de abajo hacia arriba.

Para este sistema de solventes no se tuvo un valor Rf de referencia que corresponda al Genipósido, sin embargo se supuso que el compuesto No 6 era el Genipósido ya que la intensidad de la mancha sobrepasa a las otras, esta decisión se apoyó en lo mencionado en bibliografía (13), que menciona que este iridoide glicosilado es el que predomina en los frutos verdes de *Genipa americana* L, y también porque su color es violeta azulado.

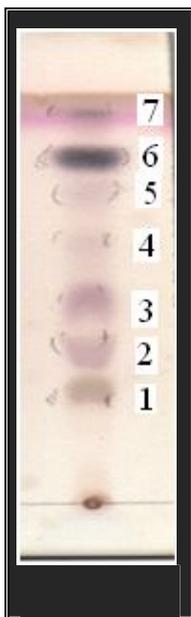
Se calculó los valores Rf de las manchas mediante la fórmula:

$$Rf = \frac{X_n}{X_s}$$

Donde X_n = Distancia recorrida por cada compuesto identificado.

X_s = Distancia recorrida por el sistema de solventes.

Entonces, para el sistema de solventes descrito, el Rf de Genipósido es 0.85. (Cuadro No. 2)



FOTOGRAFÍA No 2. CROMATOGRAFÍA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Genipa americana* L., SISTEMA DE SOLVENTES: CHCl₃ - CH₃OH- H₂O (60:40:4, v/v), REVELADOR VAINILLINA SULFÚRICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. DICIEMBRE DE 2011

CUADRO No 2. DESCRIPCIÓN DEL VALOR Rf DE LOS COMPUESTOS PRESENTES EN EL EXTRACTO METANÓLICO DE FRUTOS VERDES DE *Genipa americana* L. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. DICIEMBRE DE 2011

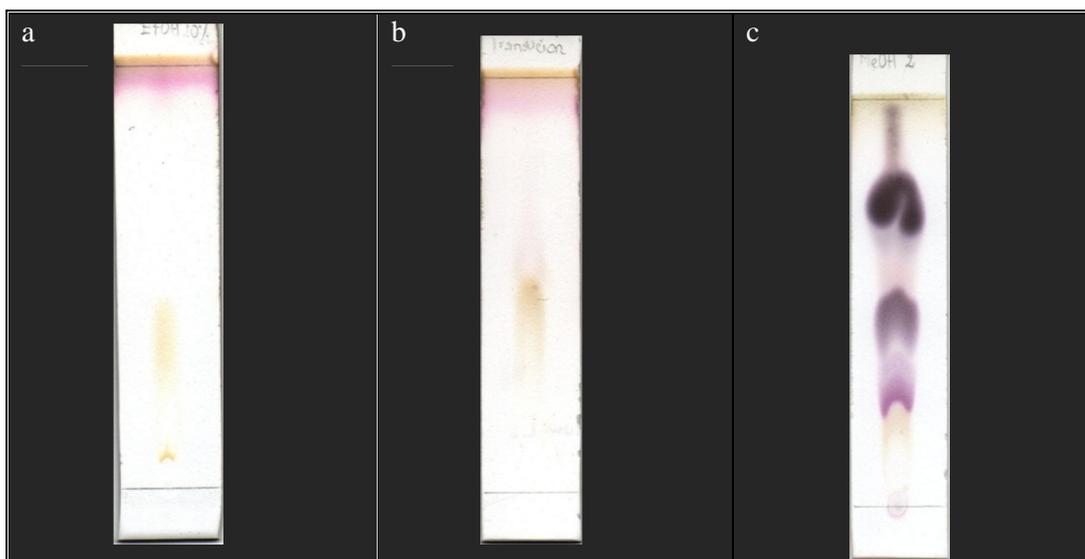
Compuestos	Distancia (cm)	Rf	Descripción
Sistema de solventes	7,8		
1	2,2	0,28	
2	2,8	0,36	
3	3,8	0,49	
4	5	0,64	
5	5,9	0,76	
6	6,6	0,85	Genipósido
7	7,4	0,95	

3.1.2 SEPARACIÓN DE COMPUESTOS GLICOSILADOS

Esta fase se estudió por dos métodos, el que corresponde a una cromatografía flash de carbón activado y el que utiliza extracción butanol-agua.

Para la cromatografía flash en carbón activado primero se eluyó Etanol 10% para separar los azúcares y luego metanol para recuperar la fracción glicosídica. Se partió de una muestra de 3.1050 g y se recuperó 1.032 g que corresponde a los iridoides glicosilados.

El seguimiento de la separación se realizó mediante cromatografía en capa fina con un sistema de solventes compuesto por cloroformo-metanol-agua (60:40:4, v/v) con revelador de vainillina sulfúrica. Se identificaron 4 compuestos de los cuales uno es el Genipósido y observa como la mancha más intensa en la fotografía No 3



FOTOGRAFÍA No 3. SEPARACIÓN DE LA FRACCIÓN GLICOSIDICA MEDIANTE CROMATOGRFÍA FLASH DE CARBÓN ACTIVADO. a. AZÚCARES ELUIDOS CON ETANOL 10%, b. AZÚCARES ELUIDOS EN LA TRANSICIÓN DE ETANOL 10% A METANOL. c. COMPUESTOS GLICOSÍDICOS ELUIDOS CON METANOL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. DICIEMBRE DE 2011

Este método presentó las siguientes ventajas: tiempo de elución moderado y una buena separación, las desventajas fueron la cantidad pequeña de muestra con la que se puede

trabajar y por ende la cantidad pequeña de muestra que se recupera y la falta de un equipo más grande para efectuar la cromatografía flash.

Para la extracción de los iridoides glicosilados en una mezcla n-butanol-agua se siguió la separación mediante cromatografía en capa fina con un sistema de solventes n-butanol-ácido acético-agua (4:1:5, v/v), y revelador de vainillina sulfúrica. Se identificaron 7 compuestos en el extracto metanólico de partida y en la fracción acuosa; en la fracción butanólica se identificaron 4 compuestos; se enumeraron las manchas en la placa cromatográfica de forma arbitraria en orden ascendente de abajo hacia arriba.

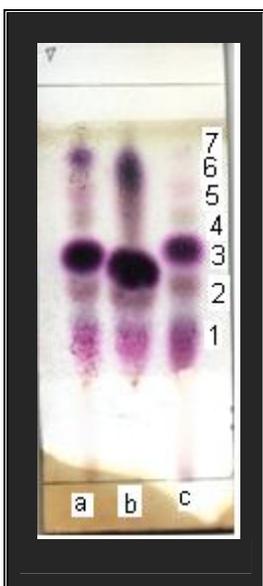
En este sistema de solventes se tuvo como referencia un valor Rf de 0,60 para el Genipósido; se encontraron cantidades apreciables de este iridoide glicosilado, con un valor Rf de 0.59, en la fracción metanólica, acuosa y butanólica (Compuesto No. 3 en el cuadro No 3 y fotografía No 4).

Este sistema de solventes no logra una buena resolución de las manchas como el que se obtiene con el sistema de solventes metanol-cloroformo-agua.

En la extracción n-butanol-agua, el Genipósido está presente tanto la fracción butanólica como en la fracción acuosa, esto sugiere que se debe hacer una extracción exhaustiva con butanol hasta que la mayor parte del Genipósido haya pasado a la fase butanólica. Se trabajó con 19.9 g de muestra y se recuperó 10.1 g.

CUADRO No 3. DESCRIPCIÓN DEL VALOR RF DE LOS COMPUESTOS PRESENTES EN EL EXTRACTO BUTANÓLICO DE FRUTOS VERDES DE *Genipa americana* L. FACULTAD DE CIENCIAS.ESPOCH. RIOBAMBA. DICIEMBRE DE 2011

Compuestos	Distancia (cm)	Rf extracto metanólico	Rf fracción acuosa	Rf fracción acuosa	Descripción
Sistema de solventes	7,3				
1	2,8	0,38	0,38	0,38	
2	3,7	0,51	0,51	0,51	
3	4,3	0,59	0,59	0,59	Genipósido
4	5,0	0,68	0,68	-	
5	5,5	0,75	0,75	-	
6	6,0	0,82	0,82	0,82	
7	6,3	0,86	0,86	-	



FOTOGRAFÍA No 4. CROMATOGRAFÍA DEL EXTRACTO BUTANÓLICO DE *Genipa americana* L, SISTEMA DE SOLVENTES: BUOH – CH₃COOH- H₂O (4:1:5, V/V), REVELADOR VAINILLINA SULFÚRICA. a. EXTRACTO METANÓLICO INICIAL, b. EXTRACTO BUTANÓLICO, c. EXTRACTO ACUOSO. FACULTAD DE CIENCIAS.EPOCH. RIOBAMBA. DICIEMBRE DE 2011

Las ventajas de este método son que se puede trabajar con una cantidad grande de muestra y por tanto se puede recuperar más, esto es posible sin utilizar grandes cantidades de solventes, además de que el tiempo de extracción es corto a diferencia de las condiciones requeridas en la cromatografía flash en carbón activado.

3.1.3 COMPUESTOS EXTRAÍDOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA FLASH DE SILICAGEL

El extracto butanólico (3.34g) que se obtuvo en la fase anterior se acondicionó para eluirlo en una columna flash de silicagel; se utilizó un sistema de solventes cloroformo-metanol (3:7, v/v), el cual se recolectó en fracciones de 10 ml; en total se obtuvieron 14 fracciones.

De las 14 fracciones se escogió la fracción 6 para continuar el aislamiento de Genipósido, porque se observaron solamente dos compuestos; el Genipósido presentó un valor R_f de 0,89. Las demás fracciones se descartaron tanto porque no contenían el

iridoide buscado como porque contenían más de 2 compuestos. (Fotografía No 5 y Cuadro No 4)

No se recuperó el Genipósido al 100%, ya que las fracciones restantes también lo contenían. Para mejorar el porcentaje de Genipósido obtenido es necesario recurrir a una elución a gradiente, de esta forma se eliminarían los compuestos interferentes. La cantidad de muestra de la fracción 6 fue de 0.1172 g



FOTOGRAFÍA No 5. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE LAS FRACCIONES 4, 5 Y 6 DE LA EXTRACCIÓN EN COLUMNA FLASH DE SILICAGEL, SISTEMA DE SOLVENTES: CHCl_3 - CH_3OH - H_2O (60:40:4, V/V), REVELADOR VAINILLINA SULFÚRICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. DICIEMBRE DE 2011.

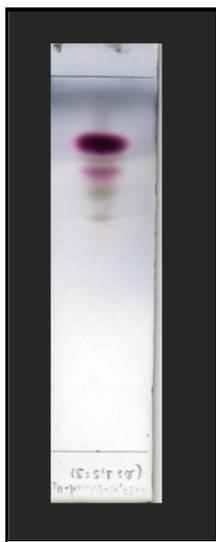
CUADRO No 4. DESCRIPCIÓN DEL VALOR R_f DE LOS COMPUESTOS PRESENTES EN LA FRACCIÓN 6 OBTENIDO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA FLASH EN SÍLICAGEL FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. DICIEMBRE DE 2011.

Compuestos	Distancia (cm)	R_f	Descripción
Sistema de solventes	8,2		
1	7,3	0,89	Genipósido
2	7,9	0,96	

3.1.4 COMPUESTOS EXTRAÍDOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA DE SILICAGEL.

Debido a que no se aisló al Genipósido en la etapa anterior, se recurrió a separar los dos compuestos de la fracción 6 mediante una cromatografía en columna de silicagel. Para ello primero se estudió el sistema de solventes a utilizar, los ensayos se realizaron en cromatografía de capa fina contraponiendo dos sistemas de solventes para optar por aquel que logre una distancia considerable entre los dos componentes.

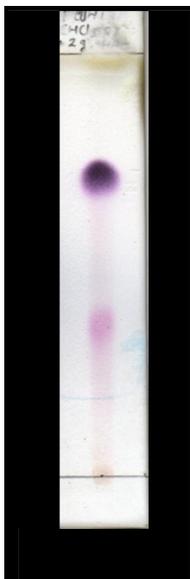
Con el sistema de solventes Acetato de etilo-*n*-butanol-agua (2:1.5:3, v/v/v) se observaron en la muestra más de dos componentes (Fotografía No 6) a diferencia del sistema de solventes CH₃OH - CHCl₃ (3:7, v/v), sin embargo no se escogió este sistema ya que no logra una distancia considerable entre los compuestos para que sea eficaz su separación mediante cromatografía en columna de silicagel.



FOTOGRAFÍA No 6. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE LA FRACCIÓN 6. SISTEMA DE SOLVENTES: ACETATO DE ETILO-*n*-BUTANOL-AGUA (2:1.5:3, v/v/v) REVELADOR VAINILLINA SULFÚRICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO DE 2012

El segundo sistema de solventes de estudio fue metanol-cloroformo-ácido acético (3:7:1, v/v), y como se observa en la Fotografía No 7 se logra separar con una distancia considerable los dos compuestos identificados en la fracción 6; se escogió este sistema

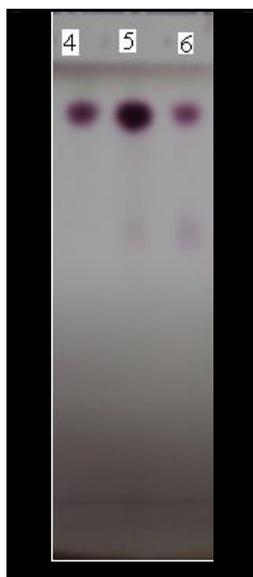
para aplicarlo en la cromatografía en columna de silicagel. El Genipósido corresponde a la mancha azul violeta.



FOTOGRAFÍA No 7. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE LA FRACCIÓN 6. SISTEMA DE SOLVENTES: CH₃OH - CHCl₃ - CH₃COOH (3:7:1, v/v). REVELADOR VAINILLINA SULFÚRICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO 2012

Para la cromatografía en columna de silicagel se trabajó con 26,7 mg de muestra y se recolectaron 18 fracciones de 1 ml, se escogió la fracción No 14 porque se logró aislar el Genipósido; en las fracciones siguientes eluyó también el segundo compuesto. Con este sistema de solventes se logra recuperar casi en su totalidad el Genipósido sin mayor interferencia.

La fotografía No 8 muestra las manchas que se relacionan con el Genipósido, si bien la mancha de la fracción No 5 se destaca por su intensidad no se escogió ésta porque en la parte inferior apareció una pequeña mancha débil que corresponde al segundo compuesto.



FOTOGRAFÍA No 8. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE LAS FRACCIONES 4, 5 y 6 OBTENIDAS POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA DE SILICAGEL, SISTEMA DE SOLVENTES: CHCl_3 - CH_3OH - H_2O (60:40:4, v/v), REVELADOR VAINILLINA SULFÚRICA. FACULTAD DE CIENCIAS.ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO 2012

A continuación se presentan en la tabla No. 8 los porcentajes de recuperación de los compuestos extraídos en cada etapa, cabe señalar que la extracción no fue exhaustiva.

TABLA No 8. PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN DE COMPUESTOS EXTRAÍDOS EN CADA ETAPA DURANTE EL ASILAMIENTO DEL GENIPÓSIDO. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO DE 2012

Etapa	Peso de muestra inicial	Peso de muestra recuperada	% Recuperación
Extracción metanólica	349,5 g	34,2 g	9,8
Extracción butanol-agua	19,9 g	10,1 g	50,8
Cromatografía Flash en silicagel	3,3425 g	0,1172 g	3,5
Cromatografía en columna de silicagel	26,7 mg	3,5 mg	13,1

3.2 ANÁLISIS DE LOS CRISTALES DE GENIPÓSIDO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Para el análisis de la pureza de los cristales de Genipósido mediante HPLC primero se obtuvo un cromatograma del blanco para descartar los picos generados por el disolvente; se detectó un total de 24 picos, con un área máxima de 343,94 y área promedio de 111,74; los dos primeros picos que aparecieron a los tiempos de retención 1,7 y 2,2 min corresponden a la fase móvil, los demás son atribuibles a la mezcla de metanol-agua (1:1) que se utilizó para disolver el Genipósido.

Luego se obtuvo el cromatograma de la muestra y se diferenció del cromatograma del disolvente por la destacada aparición de un pico a un tiempo de retención promedio de 5,072 y área promedio de 1715,35 que corresponde al Genipósido (Figura No. 5); el tiempo de retención difiere del reportado por Barbosa (8.32 min), debido a las diferencias en la columna utilizada para la elución; los demás picos observados corresponde a los generados por el solvente y se los puede correlacionar según sus tiempos de retención, por lo tanto se puede afirmar que se obtuvo el Genipósido en un grado de pureza considerable de aproximadamente el 100%.

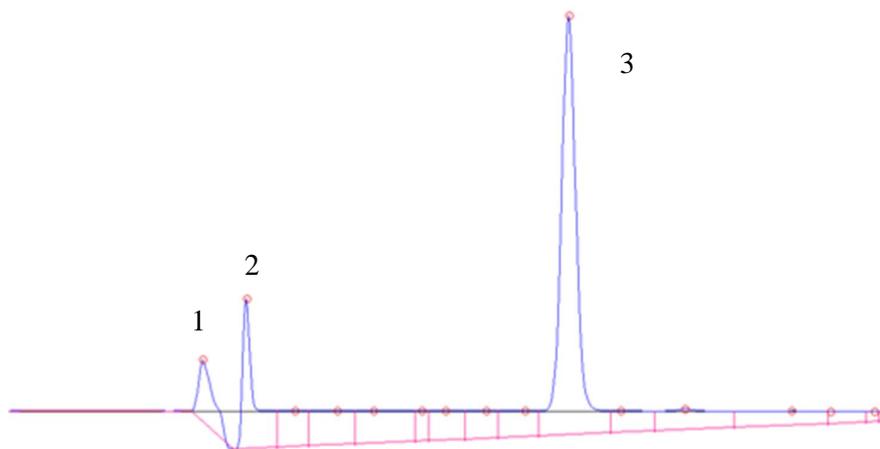


FIGURA No. 5 CROMATOGRAMA DE GENIPÓSIDO MEDIANTE HPLC. CONDICIONES: ACETONITRILLO: AGUA ACIDIFICADA (ÁCIDO ACÉTICO, pH3, 0; 15:85) COMO FASE MÓVIL Y DETECCIÓN POR ABSORCIÓN UV (240nm). 1 y 2. PICOS GENERADOS POR LA FASE MÓVIL. 3. PICO QUE CORRESPONDE AL GENIPÓSIDO FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO DE 2012

3.3 DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA EN EXTRACCIÓN DE GENIPÓSIDO EN SOLUCIONES HIDROALCOHÓLICAS BAJO CONDICIONES ESPECÍFICAS.

Para cuantificar la cantidad de Genipósido extraído en las condiciones de estudio, y de esta forma optimizar su obtención, primero se realizó una curva de calibración, donde se relaciona la concentración de Genipósido con la absorbancia medida a 240 nm en el espectro ultravioleta-visible.

3.3.1 CURVA DE CALIBRACIÓN DE GENIPÓSIDO

La curva de calibración para el Genipósido se realizó con seis concentraciones conocidas del compuesto aislado de frutos verdes de *Genipa americana* L., en el cuadro No. 5 se recogen los datos observados.

CUADRO No 5. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA EL GENIPÓSIDO AISLADO DE FRUTOS VERDES DE *Genipa americana* L. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. FEBRERO 2012

Concentración ppm	Absorbancia a 240 nm
9,80	0,079
19,60	0,175
29,40	0,335
40,60	0,475
50,40	0,596
60,20	0,734

Los datos se ajustaron a la ecuación de la recta por el método de los mínimos cuadrados lineales, se obtuvo la siguiente relación entre la absorbancia y la concentración de Genipósido.

$$A = 0.013C - 0.061$$

Donde A= absorbancia y
C = Concentración

Además se calculó el coeficiente de determinación para la ecuación resultante del tratamiento de los datos experimentales, el resultado se expresa a continuación:

$$R^2 = 0.9977$$

Dado que el valor del coeficiente de determinación se acerca a 1 y en el gráfico No. 1 se observa que los datos experimentales no se alejan considerablemente de la línea de tendencia, se argumenta que la ecuación es representativa y por tanto se la puede utilizar con un mínimo de error para la cuantificación de Genipósido en muestras procesadas bajo las mismas condiciones y cuyos datos concuerden al rango establecido.

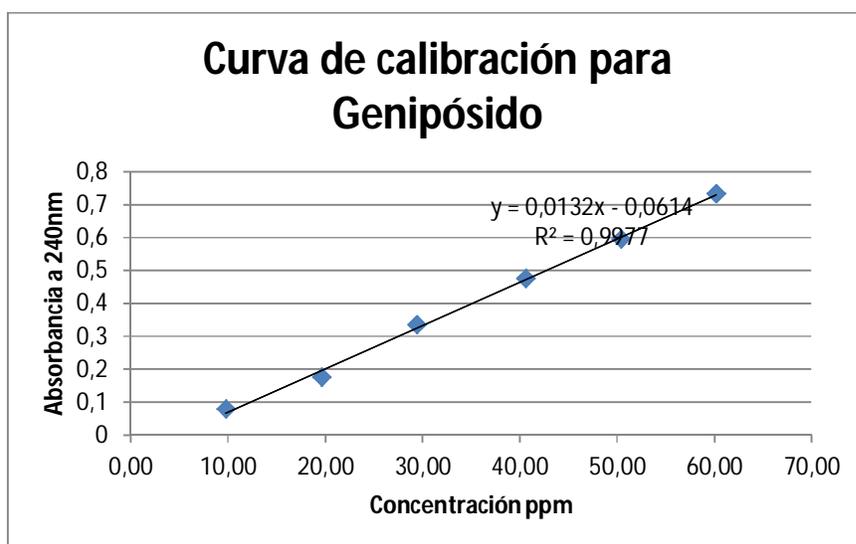


GRÁFICO No. 1 CURVA DE CALIBRACIÓN DE GENIPÓSIDO OBTENIDO DE FRUTOS VERDES DE *Genipa americana* L. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. FEBRERO DE 2012

3.3.2 CUANTIFICACIÓN DE GENIPÓSIDO BAJO DISTINTAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN

La concentración de Genipósido se expresó en porcentaje de Genipósido en muestra húmeda, se calculó mediante las siguientes expresiones:

$$C \text{ de Gnpd en } D_3 = \frac{A + 0.0614}{0.0132}$$

$$\% \text{ de Gnpd en muestra húmeda} = \frac{C \text{ de Gnpd en } D_3 * VD_3 * VD_2 * VD_1 * 100}{FC \text{ L a ml} * FC \text{ mg a g} * VA2 * VA1 * PM}$$

Los datos experimentales se muestran en el Capítulo VII

A continuación se expresa los códigos de las variables de estudio para facilitar el tratamiento de los datos.

CUADRO No 6. CODIGOS Y VARIABLES DE ESTUDIO DEL ANÁLISIS DE EFICIENCIA EN EXTRACCIÓN DE GENIPÓSIDO.

Tipo de solvente		Relación sólido-solvente		Temperatura	
Código	Descripción	Código	Descripción	Código	Descripción
A	Etanol 50%	1	1:2	a	20
B	Etanol 95%	2	1:10	b	40
C	Etanol 50% pH 4	3	1:30		
D	Etanol 95% pH 4				

Los resultados del porcentaje de Genipósido en muestra húmeda de cada condición se muestran en el cuadro No 7, además se aprecia que el valor máximo se obtiene en el tratamiento A3a que corresponde a 20 °C, con etanol al 50% y una relación sólido-solvente (1:30). Durante la ejecución de los ensayos se constató que con etanol 95% el color de la extracción es verde, diferente del color marrón que se consigue al usar etanol 50%, se considera que puede relacionarse con una extracción de clorofilas (Fotografía No 9).



FOTOGRAFÍA 9. DIFERENCIA EN EL COLOR DE LA EXTRACCIÓN AL UTILIZAR ETANOL 95% Y ETANOL 50%. FACULTAD DE CIENCIAS.ESPOCH. RIOBAMBA. FEBRERO DE 2012

CUADRO No 7. PORCENTAJE DE GENIPÓSIDO OBTENIDO BAJO DISTINTAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN. FACULTAD DE CIENCIAS.ESPOCH. RIOBAMBA. FEBRERO DE 2012

Condiciones			% de Genpd en muestra húmeda.
Solv	S/Solv	T	
A	1	a	3,27
B	1	a	2,32
C	1	a	1,99
D	1	a	2,08
A	1	b	3,90
B	1	b	6,77
C	1	b	3,17
D	1	b	4,08
A	2	a	4,18
B	2	a	4,22
C	2	a	4,01
D	2	a	2,72
A	2	b	7,75
B	2	b	6,40
C	2	b	7,41
D	2	b	5,02
A	3	a	9,09
B	3	a	8,93
C	3	a	8,17
D	3	a	7,36
A	3	b	8,14
B	3	b	5,85
C	3	b	5,62
D	3	b	8,70

3.3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS DE EXTRACCIÓN DE GENIPÓSIDO

El tratamiento estadístico de los datos se realizó en el programa G-Stat 2.0 y se obtuvieron los siguientes resultados:

3.3.3.1 Medidas descriptivas

Las medidas descriptivas se refieren a la media, mediana, valor máximo y mínimo de cada grupo gobernado por una variable, se observa que la media de la variable relación sólido-solvente (1:30) tiene el más alto porcentaje de Genipósido en muestra húmeda del grupo y es indicativo de que esa proporción sería la más idónea para una extracción eficaz. (Cuadros No 8, 9 y 10)

CUADRO No 8. ESTADÍSTICOS PARA LA VARIABLE RELACIÓN SÓLIDO- SOLVENTE EN EL ANÁLISIS DE EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN DE GENIPÓSIDO. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. FEBRERO DE 2012

Relación sólido-solvente	N	Media	Mediana	Desviación		
				Típica	Mínimo	Máximo
3	8	7.7325	8.1550	1.3478	5.6200	9.0900
2	8	5.2137	4.6200	1.7898	2.7200	7.7500
1	8	3.4475	3.2200	1.5592	1.9900	6.7700
Total	24	5.4646	5.3200	2.3439	1.9900	9.0900

CUADRO No 9. ESTADÍSTICOS PARA LA VARIABLE SOLVENTE EN EL ANÁLISIS DE EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN DE GENIPÓSIDO. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. FEBRERO DE 2012

Solvente	N	Media	Mediana	Desviación		
				Típica	Mínimo	Máximo
A	6	6.0550	5.9650	2.5435	3.2700	9.0900
D	6	4.9933	4.5500	2.6012	2.0800	8.7000
C	6	5.0617	4.8150	2.4334	1.9900	8.1700
B	6	5.7483	6.1250	2.2668	2.3200	8.9300
Total	24	5.4646	5.3200	2.3439	1.9900	9.0900

CUADRO No 10. ESTADÍSTICOS PARA LA VARIABLE TEMPERATURA EN EL ANÁLISIS DE EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN DE GENIPÓSIDO. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. FEBRERO DE 2012

Temperatura	N	Media	Mediana	Desviación		
				Típica	Mínimo	Máximo
b	12	6.0675	6.1250	1.7800	3.1700	8.7000
a	12	4.8617	4.0950	2.7433	1.9900	9.0900
Total	24	5.4646	5.3200	2.3439	1.9900	9.0900

3.3.3.2 Gráficos de interacciones

Estos gráficos muestran la posible interacción entre los factores de estudio sobre la variabilidad de la variable respuesta; así tanto en el gráfico No. 2 como en el gráfico No 3 se observa la influencia conjunta de los factores relación sólido solvente, solvente y temperatura en la variable respuesta % de Genipósido en muestra húmeda, además se aprecia que éste incrementa cuando la proporción sólido-solvente es de 1:30.

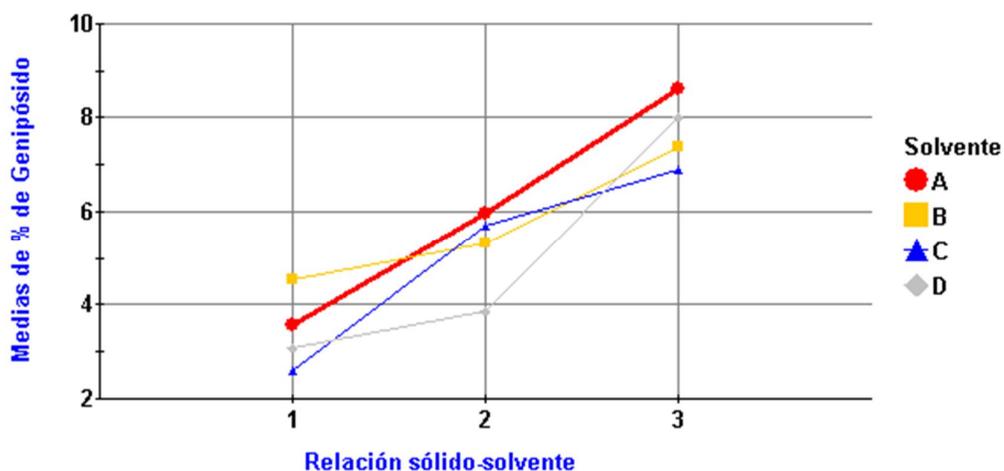


GRÁFICO No. 2 INTERACCIÓN DE LAS VARIABLES RELACIÓN SÓLIDO-SOLVENTE POR SOLVENTE EN EL ANÁLISIS DE EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN DE GENIPÓSIDO. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. FEBRERO DE 2012

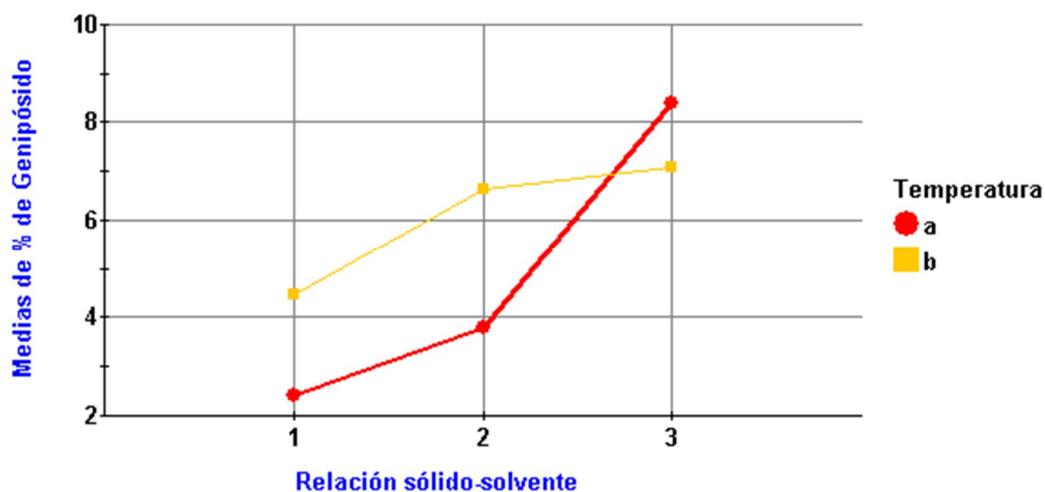


GRÁFICO No. 3 INTERACCIÓN DE LAS VARIABLES RELACIÓN SÓLIDO-SOLVENTE POR TEMPERATURA EN EL ANÁLISIS DE EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN DE GENIPÓSIDO. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. FEBRERO 2012

En el gráfico No 4 hay paralelismo entre las variables temperatura y solvente, se interpreta que estos factores no actúan de forma conjunta en la variabilidad del % de Genipósido obtenido. Según este gráfico parece que la temperatura de 40 °C logra una mayor extracción.

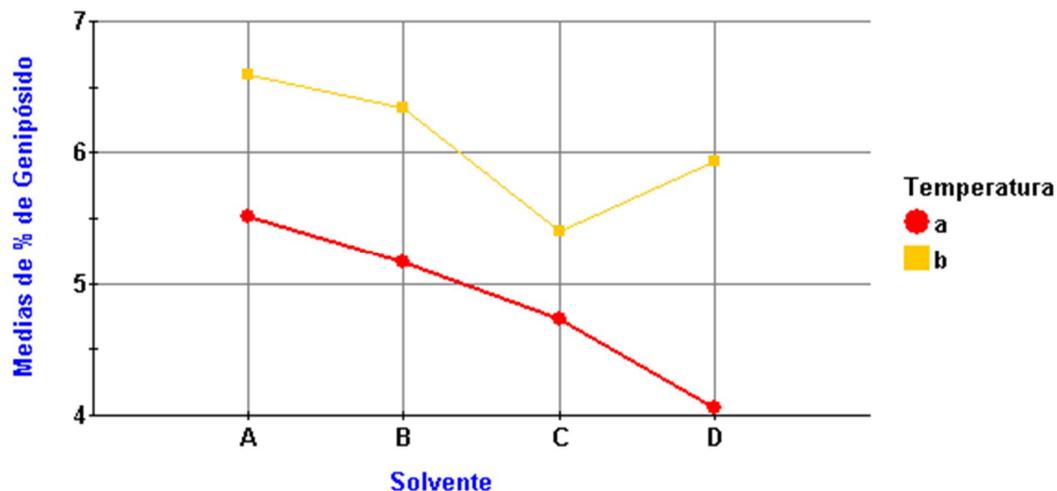


GRÁFICO No. 4 INTERACCIÓN DE LAS VARIABLES SOLVENTE POR TEMPERATURA EN EL ANÁLISIS DE EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN DE GENIPÓSIDO. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. FEBRERO DE 2012

3.3.3.3 Análisis de la muestra

Es evidente que la variable relación sólido-solvente influye de forma directamente proporcional en el porcentaje de Genipósido extraído, concluyendo que la relación eficaz es 1 de sólido y 30 de solvente. En cuanto a la variable solvente no existe gran diferencia en el porcentaje de Genipósido obtenido, y al igual que la variable temperatura no presenta una tendencia para determinar con exactitud una condición eficaz.

3.3.3.4 Análisis de la población

Según el análisis ANOVA (cuadro No 11) a un nivel de confianza del 95%, se concluye que solo la variable relación sólido-solvente logra diferencias significativas en la extracción de Genipósido, y que tanto el tipo de solvente como la temperatura analizados, pueden usarse sin distinción.

CUADRO No 11. ANOVA FACTORIAL SIN INTERACCIONES DE LOS DATOS DE EXTRACCIÓN DE GENIPÓSIDO BAJO DISTINTAS CONDICIONES. FACULTAD DE CIENCIAS.EPOCH. RIOBAMBA. FEBRERO DE 2012

Variable Respuesta: % de Genipósido
Variable(s) Explicativa(s): Relación sólido-solvente, Solvente, Temperatura
Número de Casos: 24

Anova

	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	F-valor	p-valor
Relación sólido-solvente	74.1999	2	37.1000	16.3593	0.0001
Solvente	4.8811	3	1.6270	0.7175	0.5551
Temperatura	8.7242	1	8.7242	3.8470	0.0664
Residual	38.5529	17	2.2678		
Total (corr.)	126.3582	23			

Al utilizar como post prueba I.C. LSD se demuestra que hay diferencias significativas en la extracción de Genipósido entre los grupos gobernados por la variable relación sólido-solvente y que la relación es directamente proporcional, es decir incrementa el porcentaje de Genipósido obtenido de muestra húmeda cuando incrementa el volumen del solvente de extracción. Así la mejor extracción se logra con una razón sólido-solvente de 1:30.

CUADRO No 12. ANOVA FACTORIAL. COMPARACIONES MÚLTIPLES DE LOS ENSAYOS DE EFICIENCIA EN EXTRACCIÓN FACULTAD DECIENCIAS.ESPOCH. RIOBAMBA. FEBRERO DE 2012

Modelo sin interacciones

con I.C. LSD al 95.0%

Relación sólido-solvente	n	Media	Grupos Homogéneos
1	8	3.4475	X
2	8	5.2137	X
3	8	7.7325	X

Contraste	Diferencia	+/- Límite
1 VS 2	*-1.7663	*1.5886
1 VS 3	*-4.2850	*1.5886
2 VS 3	*-2.5187	*1.5886

* Diferencia estadísticamente significativa.

Al realizar un análisis ANOVA con interacciones a dos niveles (cuadro No 13), se determina que también la temperatura en conjunto con la variable relación sólido-solvente influye en la extracción de Genipósido.

CUADRO No 13. ANOVA FACTORIAL CON INTERACCIONES A DOS NIVELES DE LOS DATOS DE EXTRACCIÓN DE GENIPÓSIDO BAJO DISTINTAS CONDICIONES. ESPOCH. RIOBAMBA. FEBRERO DE 2012

	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	F-valor	p-valor
Relación sólido-solvente	74.1999	2	37.1000	22.6230	0.0016
Solvente	4.8811	3	1.6270	0.9921	0.4577
Temperatura	8.7242	1	8.7242	5.3199	0.0606
INTERACCIONES					
A*B	7.9641	6	1.3273	0.8094	0.5980
A*C	19.6243	2	9.8121	5.9833	0.0372
B*C	1.1250	3	0.3750	0.2287	0.8733
Residual	9.8395	6	1.6399		
Total (corr.)	126.3582	23			

NOTA: A = Relación sólido-solvente
 B = Solvente
 C = Temperatura

En este caso según el análisis I.C. LSD con interacción a dos niveles hay diferencia significativa solo entre los tratamientos 1,2 y 3, y al igual que en el análisis sin interacciones la condición 3 ofrece una extracción eficaz.

CUADRO No 14. ANÁLISIS I.C. LSD CON INTERACCIÓN A DOS NIVELES. ESPOCH. RIOBAMBA. FEBRERO DE 2012

Modelo con interacciones 2 niveles

con I.C. LSD al 95.0%

Relación sólido-solvente	n	Media	Grupos Homogéneos
1	8	3.4413	X
2	8	5.2200	X
3	8	7.7325	X

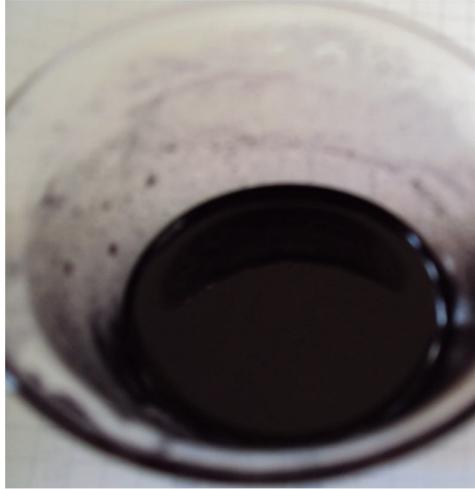
Contraste	Diferencia	+/- Límite
1 VS 2	-1.7787	2.7137
1 VS 3	*-4.2912	*1.9189
2 VS 3	*-2.5125	*1.9189

* Diferencia estadísticamente significativa.

3.4 FORMULACIÓN DE UN DELINEADOR SEMIPERMANENTE A BASE DE FRUTOS VERDES DE *Genipa americana* L.

3.4.1 FORMULACIÓN PARA UN DELINEADOR EN FORMA DE GEL

Se elaboró un delineador en forma de gel utilizando carbomer como agente gelificante, sin embargo la adición del extracto hidroalcohólico de los frutos verdes de *Genipa americana* no permite una formación adecuada del gel y tampoco aumenta la viscosidad con la adición de trietanolamina, por lo que el producto es muy líquido (Fotografía No. 10) y se difunde en la piel, sin lograr un trazo conciso y adecuado, por lo que se descartó esta formulación.



**FOTOGRAFÍA No 10. DELINEADOR EN FORMA DE GEL FACULTAD DE CIENCIAS.ESPOCH.
RIOBAMBA. MARZO DE 2012**

3.4.2 FORMULACIÓN PARA UN DELINEADOR EN FORMA DE EMULSIÓN O/W

Se ejecutaron varios ensayos preliminares para proponer la formulación de partida de un delineador en forma de emulsión O/W, antes de encontrarla, el principal inconveniente era que la fase grasa influía en la consistencia del delineador haciéndolo muy sólido, ello a pesar de que la fase acuosa constituía el mayor componente de la formulación; superado este problema se derivaron 3 formulaciones más, donde se variaron tanto alguna materia prima como su concentración.

TABLA No 9. FORMULACIONES PARA LA ELABORACIÓN DE UN DELINEADOR SEMIPERMANENTE EN FORMA DE EMULSIÓN O/W. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. MARZO DE 2012

Fase	Materia prima (INCI)	Porcentaje Formulación 1	Porcentaje Formulación 2	Porcentaje Formulación 3	Porcentaje formulación 4
A	Copernicia Cerifera Cera	0,6	0,3	0,3	0,3
	Cera Alba	2,8	1,4	1,4	1,4
	Stearic Acid	2,8	1,4	1,4	1,4
	Cetyl Alcohol	1,7	0,85	0,85	0,85
	Lanolin	1,7	-	-	-
	Theobroma Cacao Seed Butter	-	-	-	0,85
	Steareth-2	0,18	0,18	0,18	0,18
	Steareth-20	0,8	0,8	0,8	0,8
	Aqua	46,1	40	-	-
	Etanol 50%	-	-	40	-
B	Etanol 40%	-	-	-	40
	Propylene glycol	-	6.1	6.1	6.1
	Carbomer	0,6	0,6	0,6	0,6
	Triethanolamine	0,1	0,1	0,1	0,1
	Kaolin	0,4	0,4	0,8	0,4
C	Propylene glycol	5	5	5	5
	Propylparaben	0,1	0,1	0,1	0,1
	Methylparaben	0,1	0,1	0,1	0,1
D	Extracto de <i>Genipa americana</i>	37	37	37	37
	Total	100	100,0	100,0	100,0

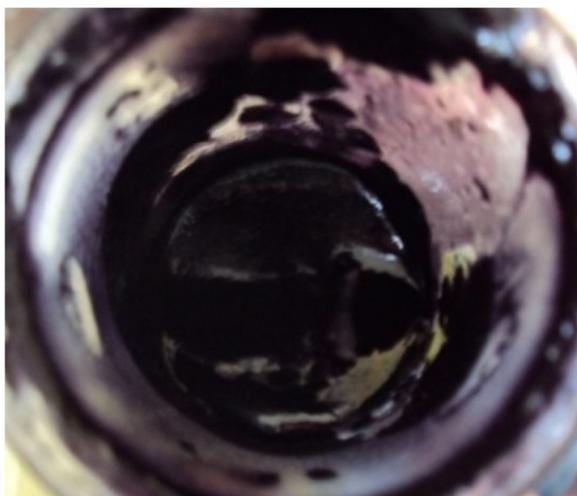
En la formulación 2 se excluye la lanolina y los demás componentes de la fase grasa se reducen a la mitad, además se aumenta la concentración de propilenglicol de 5% a 11.6%, se lo utiliza como agente humectante y para evitar la disminución en la propiedad conservante de los parabenos bajo la acción de los emulsionantes no iónicos.

La fórmula No 3 es una modificación de la fórmula No 2 en la cual se aumenta al doble el porcentaje de caolín (de 0.1% a 0,2%), para mejorar la consistencia del producto y se sustituye el agua por una mezcla hidroalcohólica al 50% para acelerar el tiempo de secado del delineador en la piel.

La fórmula No 4 es una modificación de la fórmula No 1, donde se utiliza cera de cacao en lugar de lanolina, se aumenta la concentración de propilenglicol de 5% a 11.6% y se sustituye el agua por una mezcla hidroalcohólica al 40%.

La fórmula No 2 fue líquida y no logró un trazo consistente, mientras que la fórmula No 4 se desplazó a formar una emulsión muy consistente que no tenía buena extensibilidad.

La fórmula No 3 fue aceptable ya que mejoró su extensibilidad en la piel, el tiempo de secado y el trazo fue consistente, consecuentemente se trabajó en determinar las especificaciones del producto.



FOTOGRAFÍA No 11. FORMULACIÓN No 3 PARA LA ELABORACIÓN DE UN DELINEADOR EN FORMA DE EMULSIÓN O/W. FACULTAD DE CIENCIAS.ESPOCH. RIOBAMBA. MARZO DE 2012

Al aplicar la formulación No. 3 en los párpados (Fotografía No. 12) se observa buenos resultados ya que logra intensificar la mirada sin causar irritación, al inicio el color es negro brillante, luego cuando el cosmético se ha absorbido por la piel se torna negro azul, que es un indicativo de la reacción del Genipósido con grupos aminos primarios presentes en el colágeno de la piel, lo que permite que se fije por un tiempo aproximado de 5 días



**FOTOGRAFÍA No 12. APLICACIÓN DEL DELINEADOR SEMIPERMANENTE PROPUESTO
FACULTAD DE CIENCIAS.EPOCH. RIOBAMBA. MARZO DE 2012**

3.4.3 ESPECIFICACIONES DEL DELINEADOR SEMIPERMANENTE PROPUESTO A BASE DE FRUTOS VERDES DE *Genipa americana* L.

Se evaluaron las características físico-químicas y microbiológicas del delineador semipermanente propuesto y se compararon los resultados obtenidos con especificaciones de referencia encontrados en la resolución 1418 de la Comunidad Andina, Notes of Guidance for Testing of Cosmetic Ingredients and Their Safety Evaluation by the SCCNFP de la Comisión Europea y en el Reglamento Técnico Centroamericano 71.03.45:07.

Se destaca que se ajustó el pH de la formulación con aproximación al pH fisiológico del líquido lacrimal que es de 7.4 para evitar molestias en los ojos. Además se realizó el recuento total de Aerobios Mesófilos y Hongos y levaduras para asegurar que el producto cumple con los requisitos microbianos de referencia con el fin de preservar la salud del consumidor.

TABLA No 10 ESPECIFICACIONES DEL DELINEADOR SEMIPERMANENTE PROPUESTO A BASE DE FRUTOS VERDES DE *Genipa americana* L. FACULTAD DE CIENCIAS.ESPOCH. RIOBAMBA. MARZO DE 2012

Especificación del producto			
Producto No: 001	No de fórmula: 3	Fecha de revisión: 2012-02	
Ensayo	Método	Especificaciones	Valores encontrados
Color	Observación visual	-	Negro
Olor	Observación olfatoria	-	Agradable
Aspecto	Observación visual	-	Homogéneo
Densidad (25 °C)	USP 30	-	1.1877 g/ml
Viscosidad 25 °C Brookfield L3 100rpm	USP 30	-	100.3 cp
pH (25°C)	USP 30	Máx. 10 Min. 3 Comunidad Andina	7.06
Recuento Total de Aerobios Mesófilos	Bacteriological Analytical Manual	< 100 UFC/G CTFA	<1
Recuento Total Hongos y Levaduras	Bacteriological Analytical Manual	< 100 RTCA	<1

3.5 EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL GENIPÓSIDO

Las muestras acondicionadas a los diferentes tratamientos de estudio de estabilidad, mostraron un descenso en la absorbancia a 240 nm debido a la degradación del Genipósido (Cuadro No 15), la absorbancia de partida para todas las muestras fue de 0,722 que corresponde a una concentración de Genipósido de 59,35 ppm. La muestra destinada a la degradación oxidativa no arrojó valores coherentes ya que el peróxido de hidrógeno también muestra absorbancia a 240 nm en el espectro ultravioleta.

CUADRO No 15 ABSORBANCIA OBSERVADA EN LAS MUESTRAS SOMETIDAS A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS DE ESTUDIO DE ESTABILIDAD. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. MARZO DE 2012

Tiempo (Días)	Absorbancia a 240 nm			
	Sin Tratamiento	Luz	NaOH	HCl
0	0,722	0,722	0,432	0,624
1	0,722	0,708	0,392	0,216
3	0,722	0,693	0,388	0,216
4	0,722	0,605	0,361	0,131

Se observa una caída drástica en la concentración de Genipósido cuando se lo somete a una hidrólisis alcalina, inmediatamente después de la adición de hidróxido de sodio 20% la concentración disminuyó desde 59.35 ppm a 37.38 ppm. (Cuadro No 16)

El tratamiento de la muestra de Genipósido con HCl 20%, no mostró un descenso drástico inmediato en la concentración del compuesto así como sucedió con el NaOH porque disminuyó desde una concentración de 59.35 ppm a 51.92 ppm. (Cuadro No 16)

CUADRO Nº 16 CONCENTRACIÓN DE GENIPÓSIDO EN LAS MUESTRAS SOMETIDAS A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS DE ESTUDIO DE ESTABILIDAD. FACULTAD DE CIENCIAS.ESPOCH.RIOBAMBA. MARZO DE 2012

Tiempo (días)	Concentración de Genipósido (ppm)		
	Luz	NaOH	HCl
0	59,35	37,38	51,92
1	58,29	34,35	21,02
3	57,15	34,05	21,02
4	50,48	32,00	14,58

En el gráfico No 5 se observa el descenso en la concentración de Genipósido de 37,38 a 32 ppm en un tiempo de 4 días por acción de una hidrólisis alcalina a una temperatura de 50 °C, cabe resaltar que a pesar de que esta variación en la concentración de Genipósido no es grande comparado con el descenso inmediato, la condición si representa una de las rutas de degradación del Genipósido.

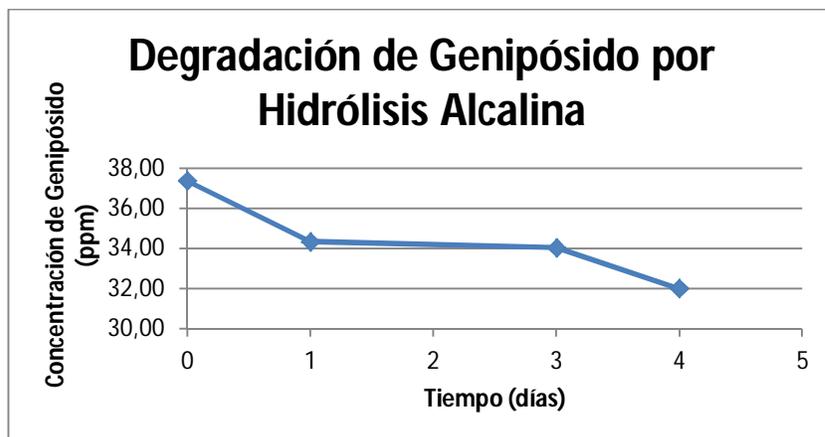


GRÁFICO No. 5 DEGRADACIÓN DE GENIPÓSIDO POR HIDRÓLISIS ALCALINA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. MARZO DE 2012

En el gráfico No 6 se evidencia una gran disminución de la concentración de Genipósido desde 51.92 a 14.58 ppm por tratamiento con HCl 20 %, en un tiempo de 4 días y a una temperatura de 50 °C.

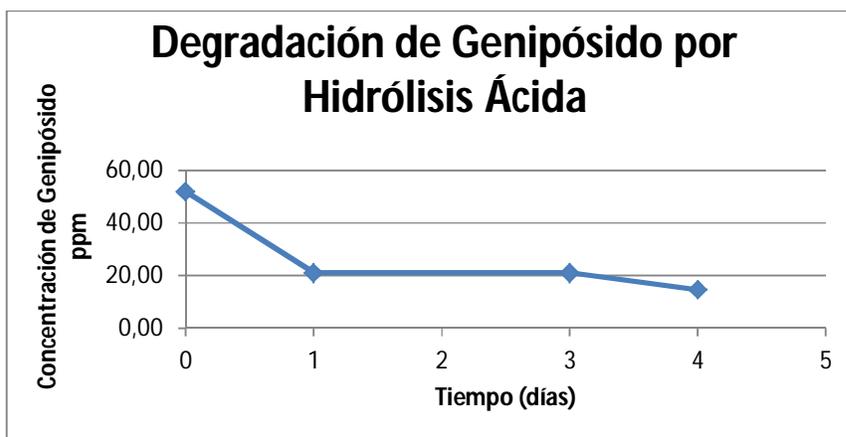


GRÁFICO No. 6 DEGRADACIÓN DE GENIPÓSIDO POR HIDRÓLISIS ÁCIDA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. MARZO DE 2012

La exposición de la muestra de Genipósido a la luz influye en el descenso de la concentración del compuesto desde 59.35 a 50.48 ppm en un tiempo de 4 días a temperatura ambiente. Se evidencia que la degradación no es marcada como en los casos anteriores por hidrólisis alcalina y ácida.

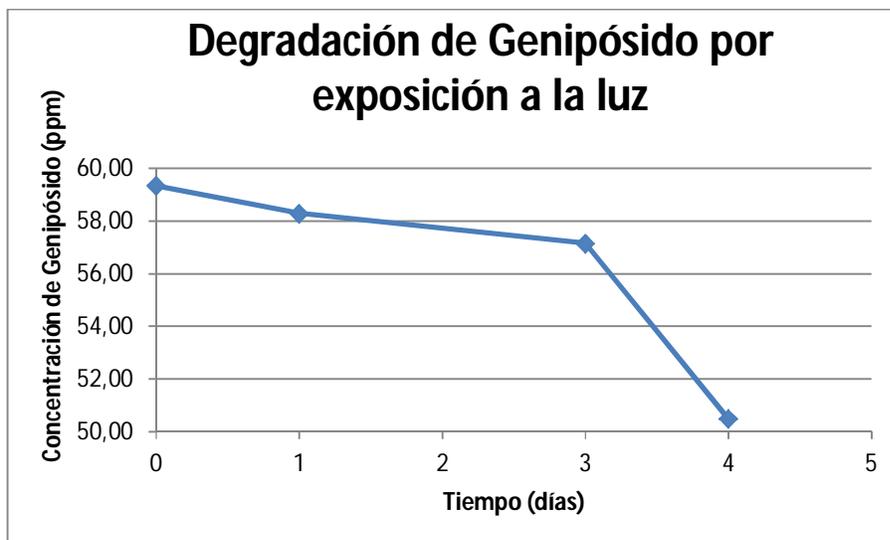


GRÁFICO No. 7 DEGRADACIÓN DE GENIPÓSIDO POR EXPOSICIÓN A LA LUZ. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. MARZO DE 2012

Bajo estos resultados se argumenta que el Genipósido que se encuentra en el extracto de frutos verdes de *Genipa americana* L. se degrada de forma drástica por hidrólisis alcalina e hidrólisis ácida, por tanto se sugiere evitar pH extremos en la formulación cosmética donde se lo utilice y acercarse a la neutralidad para asegurar su compatibilidad con la piel.

CAPITULO IV

4 CONCLUSIONES

1. Se aisló 3,5 mg de Genipósido de los frutos verdes de *Genipa americana* L., basados en el método descrito por Endo y Taguchi, así como en el método empleado por L'Empereur y Stermitz para el análisis de iridoides; consecuentemente se determinó la pureza del compuesto mediante análisis HPLC, para ello se utilizó las condiciones descritas por Barbosa con pequeñas modificaciones y se verificó la elución de un solo pico a un tiempo de retención de 5,072 min y área de 1715,35.
2. Mediante un diseño experimental 3*2*4, donde las variables fueron el tipo de solvente, la temperatura y la relación sólido-solvente, se determinó bajo un nivel de confianza del 95 % que solamente la variable relación sólido- solvente genera diferencias significativas en la extracción de Genipósido a estas condiciones y que se logra una óptima extracción con etanol 50%, a una relación sólido solvente (1:30) y a 20 °C.
3. Para la elaboración de un delineador semipermanente a partir de frutos verdes de *Genipa americana* L se ensayaron varias formulaciones, de las cuales la que mejor se ajustó a las características deseadas del producto como fácil aplicación, extensibilidad sin dejar grumos, tiempo de secado moderado y fijación continua fue un delineador tipo emulsión O/W que combina 1% de emulsionantes, 9.6% de componentes grasos, 37 % de extracto de *Genipa americana* L, 0.2 % de conservantes, 0.4 % de componente mineral y 51,8 % de componentes hidrofílicos. Además el delineador no causó irritación durante su uso y se fijó en la piel por un tiempo de 5 días

4. Se determinaron las características físico-químicas y microbiológicas del delineador propuesto y se observó que cumplen con los parámetros de referencia establecidos en la resolución 1418 de la Comunidad Andina, Notes of Guidance for Testing of Cosmetic Ingredients and Their Safety Evaluation by the SCCNFP de la Comisión Europea y en el Reglamento Técnico Centroamericano 71.03.45:07; cabe destacar que se encontraron los siguientes valores pH 7.06, densidad 1.1877 g/ml, viscosidad 100.3 cp, recuento de total de aerobios mesófilos y recuento total de hongos y levaduras < 1.

5. Se analizó la estabilidad del Genipósido bajo condiciones de hidrólisis ácida, hidrólisis alcalina y exposición a la luz y se encontró que es muy inestable a pH extremos, estos resultados concuerdan con los encontrados por Slusarewicz y colaboradores para su aglicona, la Genipina; por otro lado la degradación de Genipósido por exposición a la luz no es marcado como para las condiciones anteriores, finalmente se argumenta que el pH final de cosméticos que utilicen extracto de frutos verdes de *Genipa americana* L deben ser cercanos a la neutralidad tanto para asegurar la inocuidad del producto como para asegurar la estabilidad del Genipósido.

CAPITULO V

5 RECOMENDACIONES

1. En el aislamiento del Genipósido para mejorar el porcentaje de compuesto recuperado es necesario recurrir a una elución a gradiente, de esta forma se eliminaría los compuestos interferentes y sería mayor la concentración de Genipósido aislado.
2. Se considera óptimo para aislar el Genipósido aplicar cromatografía en columna con un sistema de solventes $\text{CH}_3\text{OH} - \text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{COOH}$ (3:7:1, v/v), en lugar del sistema de solventes $\text{CH}_3\text{OH} - \text{CHCl}_3$ (3:7, v/v), para mejorar la separación de los compuestos presentes en el extracto metanólico de *Genipa americana* L. debido a una mayor espaciamiento entre los tiempos de elución de los mismos.
3. Se puede continuar con esta investigación al proponer el uso de otras materias primas para la elaboración de un delineador semipermanente que mejore en el tiempo de secado en la piel.
4. Es factible desarrollar otros cosméticos del extracto de frutos verdes de *Genipa americana* L. como tintes de cabello, lacas de uñas, máscaras de pestañas, etc.
5. Para la elaboración de cosméticos que use extracto de frutos verdes de *Genipa americana* L. evitar que el producto final tenga pH extremos tanto ácidos como alcalinos para asegurar su estabilidad.
6. En la presente investigación también se estudió la posible formulación de un tinte capilar a base de frutos de *Genipa americana* L. sin embargo no se lo pudo

establecer debido a que primero se requiere encontrar las condiciones adecuadas para que el colorante se fije al cabello, como la influencia de los demás componentes del fruto en la tinción, la temperatura y pH adecuados, la concentración óptima de Genipósido para asegurar una coloración homogénea, y un vehículo que permita la difusión del colorante al interior de las fibras del cabello.

CAPITULO VI

6 RESUMEN

La elaboración de cosméticos decorativos a partir de frutos verdes de *Genipa americana* L. (huito), se realizó en los laboratorios de Productos Naturales, Análisis Instrumental y el departamento de Investigación y Desarrollo de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.

La sustancia de interés que se estudió fue el Genipósido porque es el responsable de desarrollar un color negro azul cuando reacciona con grupos aminos primarios presentes en el colágeno de la piel. Para ello se trabajó con frutos de huito recolectados en las provincias de Pastaza y Morona Santiago, se aisló el compuesto, se determinó su extracción eficaz bajo condiciones específicas, se analizó la estabilidad forzada y se lo acondicionó a una formulación mediante diseños experimentales basados en los métodos descritos por Endo y Taguchi, Barbosa, Rodrigues y en ICH 2000.

En esta investigación se aisló 3,5 mg de Genipósido, con una pureza aproximada del 100% ; se encontró que hay una óptima extracción del compuesto al usar etanol 50%, a 20°C y una relación sólido -solvente (1:30); se determinó que el Genipósido se degrada fácilmente mediante hidrólisis alcalina y ácida, además se elaboró un delineador semipermanente tipo emulsión O/W para el cual se encontraron los siguientes valores pH 7.06, densidad 1.1877 g/ml, viscosidad 100.3 cp, recuento de total de aerobios mesófilos y recuento total de hongos y levaduras < 1.

Se concluye que el delineador semipermanente presentó características deseables como fácil aplicación, inocuidad, extensibilidad sin dejar grumos, trazado conciso, fijación

continua durante 5 días y que cumple con los requisitos de referencia. Se recomienda que los cosméticos que incluyan extractos de *Genipa americana* L. tengan un pH final cercano a la neutralidad para asegurar su estabilidad y la afinidad del compuesto por la piel.

SUMMARY

The present investigation was carried out to elaborate ornamental cosmetics starting from green fruits *Genipa americana* L. (huito), in the laboratories Native substances Instrumental Analysis and Research and Development department from Sciences Faculty in the ESPOCH.

The substance that was studied was Geniposide because it is the responsible of developing a blue black color when reacts with groups amines primary present in collagen of the skin. Even it worked with huito fruits gathered in Pastaza and Morona Santiago province, it isolated it compound, its effective extraction was determined in specific conditions, the forced stability was analyzed and conditioned it to a formulation by means of experimental designs based on the methods described by Endo and Taguchi, Barbosa, Rodrigues and in ICH 2000.

The 3,5 mg Geniposide was isolated with an approximate purity to 100%; it was found that there is an optic extraction of made up to using ethanol 50%, to 20°C and a relationship solid-it pays (1:30); it was determined that the Geniposide demean easily by means of alkaline and sour hydrolysis, also a liner semi-permanent type emulsion O/W was elaborated the following value pH 7.06 density 1.1877 g/ml, viscosity 100.3 cp, recount total of aerobic mesophilic edges and fungi and yeasts <1.

It concludes that the liner semi-permanent presented characteristic desirable as easy application, innocuousness, extensibility without leaving clots, concise layout, continuous fixation during 5 days and that fulfills the reference requirements. It is recommended that cosmetics that include extracts of *Genipa americana* L. have a near final pH neutrality to assure their stability and the likeness of composed by the skin.

CAPITULO VII

7 BIBLIOGRAFÍA

1. **DRAELOS., Z.**, Cosmetic Dermatology Products and Procedures., Washington D. C.- Estados Unidos de América., Wiley-Blackwell Publishing Ltd., 2010., pp. 190
2. **GENNARO., A.**, Remington Farmacia., Trad. del inglés por Sebastián Bellucci y otros., 20 a. ed., Buenos Aires-Argentina., Editorial Médica Panamericana S.A., 2003., p. 1181
3. **PAZMIÑO., R.**, Principios de Biometría y Diseño Experimental. Riobamba-Ecuador., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., 2010., pp. 27-42.
4. **ROSEN., M.**, Delivery system handbook for personal care and cosmetic products: technology, applications, and formulations., Washington D. C. United States of America., William Andrew, Inc., 2005., pp. 548-567.
5. **SKOOG., D., HOLLER., J., y otros.**, Principios de análisis Instrumental., 6 a. ed., México, D.F.-México., CENGAGE Learning., 2008., pp 11-13.
6. **WAGNER., H.**, Plant Drug Analysis., 2 a. ed., Berlín-Alemania. Springer., 1996., pp.88-93

7. **WILKINSON., J. B., y MOORE., R. J.,** Cosmetología de Harry., Madrid-España., Díaz de Santos S. A., 1990., p. 825.
8. **CONVENCIÓN DE LA FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA.,** USP 30. Farmacopea de los Estados Unidos de América., Washington D. C.-Estados Unidos de América., Vol. 1., NF 25., 2007., p. 689.
9. **BENAIGES., A.,** Cosmética decorativa. Maquillajes, barras de labios y lacas de uñas., Madrid-España., OFFARM., Vol. 23 No. 3., 2004., p. 94
10. **BONET., R., y GARROTE., A.,** Belleza y cuidado de los ojos., Madrid-España., OFFARM., Vol. 25 No. 11., 2006., 5 p.
11. **BRASIL., AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA.,** Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos. Uma abordagem sobre os Ensaio Físicos e Químicos., Brasília-Brasil., 2 a. ed., Anvisa., 2008., 7 p.
12. **BRASIL., AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA.,** Guía de Estabilidad de Productos Cosméticos. Serie Calidad en Cosméticos., Brasil-Brasília., Anvisa., Vol. 1., 2005., 52 p.
13. **BUTLER., M. F., YIU-FAI., NG., PUDNEY., P. D.A.,** Mechanism and Kinetics of the Crosslinking Reaction between Biopolymers Containing Primary Amine Groups and Genipin., Washington D. C.-United States., Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry., Vol. 41., 2003., pp. 3941-3953.

14. **DJERASSI, C., GRAY, J., and KINCL., F.,** Naturally Occurring Oxygen Heterocyclics. IX. Isolation and Characterization of Genipin., Washington D. C. - United States., Journal of Organic Chemistry., Vol. 25 No. 12., 1960., pp. 2174–2177
15. **ENDO., T., and TAGUCHI., H.,** The constituents of *Gardenia jasminoides* Geniposide and Genipin-gentiobioside., Tokyo- Japan., Chemical and Pharmaceutical Bulletin., Vol. 21 No. 12., 1973., pp. 264-268
16. **FRANCIS., JK.,** *Genipa americana* L. Jagua, genipa., Department of Agriculture Forest Service, Southern Forest Experiment Station., SO-ÍTF-SM-58., New Orleans-USA., 1993., pp. 231-235.
17. **KIM., H. Y., and others.,** Studies on the Determination Method of Gardenia Yellow (*Gardenia augusta* MERR. var. *grandiflora* HORT.) in Foods., Seoul-South Korea., The Annual Report of Korea Food and Drug Administration., Vol. 2., 1998., pp.116-125.
18. **LEE., S. W.,** Colorimetric determination of amino acids using genipin From *Gardenia jasminoide.*, Seoul-South Korea, ., Analytica Chimica Acta 480., 2003., pp. 267–274
19. **MARTINEZ., E.,** Errores frecuentes en la interpretación del coeficiente de determinación lineal., Madrid-España., Anuario Jurídico y Económico Escurialense., Vol. 38., 2005., pp. 315-332
20. **ONO., M., and others.,** Iridoid Glucosides from the Fruit of *Genipa Americana.*, Tokyo- Japan., Chemical and Pharmaceutical Bulletin., Vol. 53 No. 10., 2005., pp. 1342-1344.

21. **PAIK., Y., and other.,** Physical Stability of the Blue Pigments Formed from Geniposide of Gardenia Fruits: Effects of pH, Temperature, and Light., California- United States., Journal of Agricultural and Food Chemistry., Vol. 49 No. 1., 2001., pp. 430–432
22. **SLUSAREWICZ., P., ZHUA., K., and HEDMANA., T.,** Kinetic Analysis of Genipin Degradation in Aqueous Solution., Fort Worth-United States., Natural Product Communications., Vol. 5 No. 12., 2010., pp.1853 – 1858
23. **STERMITZ., F., and L'EMPEREUR., K.,** Metabolism and sequestration by *Poladryas minuta* (Lepidoptera: Nymphalidae) feeding on *Penstemon virgatus* (Scrophulariaceae)., Colorado-United States., Journal of Chemical Ecology. Vol. 16 No. 5. 1990. pp. 1497-1498
24. **SUNG., H.W., HUANG., R., and others.,** In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation., Taipei-Taiwan., J. Biomater. Sci. Polym., Vol.10., 1999., pp 63-74.
25. **SUNG., H. W., and TU., J .,** Drug-loaded biological material chemically treated with genipina., Washington D. C.-United States Patent., Patent No. US 6624138 B1., 2003., p. 7
26. **TOUYAMA., R., and others.,** Studies on the Blue Pigments Produced from Genipin and Methylamine. II. On the Formation Mechanisms of Brownish-Red Intermediates Leading to the Blue Pigment Formation., Tokyo- Japan., Chemical and Pharmaceutical Bulletin., Vol.42 No. 8., 1994., pp. 1571-1578

27. **UENG., T., and others.,** An Overview of the Toxicology of Commonly Used Traditional Chinese Medicine., Tapei-Taiwan., Journal of Food and Drug Analysis., Vol. 5 No. 4., 1997., pp. 241-264.
28. **VISCASILLAS., A., y POZO., A.,** Máscara de pestañas (I)., Madrid-España., OFFARM., Vol. 24 No. 3., 2005., 4 p.
29. **ZHOU., T., and others.,** Large-scale isolation and purification of geniposide from the fruit of *Gardenia jasminoides* Ellis by high-speed counter-current chromatography., Pekín-China., Journal of Chromatography A., Vol. 1100., 2005., pp. 76–80
30. **REGLAMENTO TÉCNICO CENTROAMERICANO.,** Productos Cosméticos., Verificación de la Calidad., Managua-Nicaragua., RTCA 71.03.45:07., 2008., p. 4
31. **BARBOSA., D.,** Avaliação Fitoquímica e Farmacológica de *Genipa americana* L. (Rubiaceae)., Faculdade de Farmácia., Universidade Federal do Rio de Janeiro., Rio de Janeiro- Brasil., TESE., 2008., pp. 138
32. **EXPÓSITO., R.,** Quitosanto, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos., Facultad de Ciencias Biológicas., Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad Complutense de Madrid., Madrid-España., TESIS., 2010., p. 174
33. **MANQUE., L.,** Validación de técnica analítica por HPLC y estudio de estabilidad acelerado para comprimidos recubiertos de Minociclina de 50 mg y 100 mg., Facultad de Ciencias., Escuela de Química y Farmacia., Universidad Austral de Chile., Valdivia- Chile., TESIS., 2002., pp. 60-61

34. **RODRIGUES., I.**, Extração e estabilidade do corante azul de genipapo (Genipa americana L)., Universidade Federal de Viçosa., TESE., Viçosa- Brasil., 2008., 62 p.

Bibliografía de Internet

35. **GUÍA PARA LA EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD DE PRODUCTOS COSMÉTICOS**

<http://www.anvisa.gov.br/esp/cosmeticos/guia/guia.pdf>

2011/12/09

36. **COSMÉTICA NATURAL Y ECOLÓGICA. REGULACIÓN Y CLASIFICACIÓN**

<http://www.macroestetica.com/articulos/cosmetica-natural-y-ecologica-regulacion-y-clasificacion/>

2012/03/28

37. **DIRECTIVA 2006/65/CE DE LA COMISIÓN DE 19 DE JULIO DE 2006 POR LA QUE SE MODIFICA LA DIRECTIVA 76/768/CEE DEL CONSEJO**

<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ>

2011/11/09

38. **RESOLUCIÓN 1418. ADICIONES A LA RESOLUCIÓN 797**

http://www.comunidadandina.org/normativa/res/res_agro.htm

39. **NORMA QUE DEFINE LOS PRODUCTOS COSMÉTICOS ORGÁNICOS Y NATURALES**

<http://www.ecocert.com/sites/default/files/u3/estandar-cosmeticos-naturales-ecologicos.pdf>

2012/04/04

40. BAM: MICROBIOLOGICAL METHODS FOR COSMETICS.

<http://www.fda.gov>

2012/03/25

41. REAL DECRETO 1599/1997, DE 17 DE OCTUBRE, SOBRE PRODUCTOS COSMÉTICOS.

http://www.boe.es/aeboe/consultas/bases_datos

2012/03/05

42. EL MERCADO DE LOS COSMÉTICOS EN ECUADOR

<http://www.icex.es/FicherosEstaticos/auto/0307/cosmeticos%2007>

2011/11/05

43. MARKET BRIEF IN THE EUROPEAN UNION FOR SELECTED NATURAL INGREDIENTS DERIVED FROM NATIVE SPECIES *Genipa americana* JAGUA, HUITO.

<http://www.biotrade.org/ResourcesPublications/biotradebrief-genipaamericana.pdf>

2011/11/05

CAPÍTULO VIII

8 ANEXOS

ANEXO No 1. SECUENCIA DE FOTOS DEL AISLAMIENTO DE GENIPÓSIDO. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. DICIEMBRE 2011- ENERO DE 2012



Extracción en CHCl_3



Extracción en CH_3OH



Cromatografía flash en carbón activado



Cromatografía flash en silicagel



Cromatografía en columna de silicagel

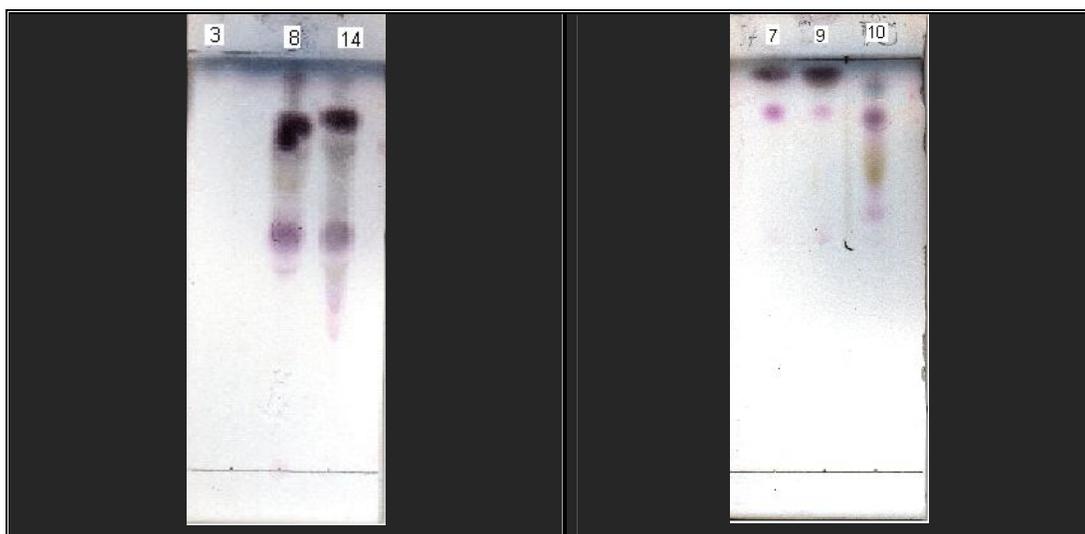


Fracción 4 que contiene el Genipósido aislado

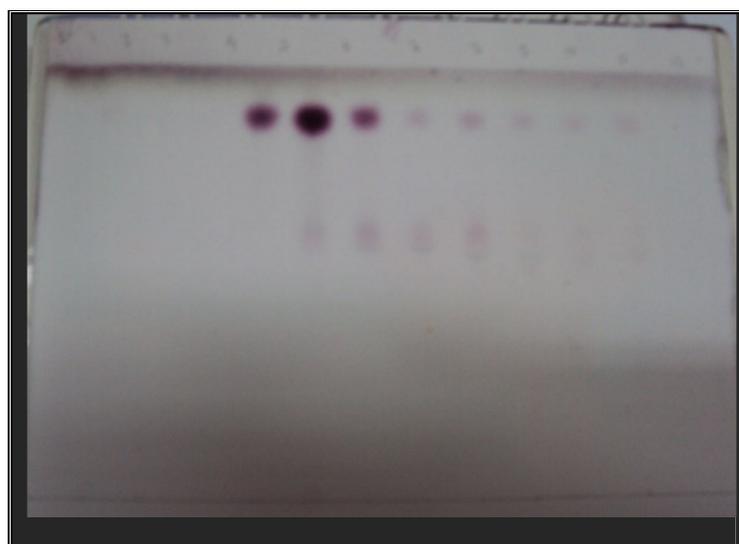


Cristales de Genipósido

ANEXO No. 2 TLC DE LAS FRACCIONES 3-14 OBTENIDOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA FLASH DE SILICAGEL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. DICIEMBRE 2011



ANEXO No. 3. TLC DE LAS FRACCIONES 1 A 14 OBTENIDOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA DE SILICAGEL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO DE 2012



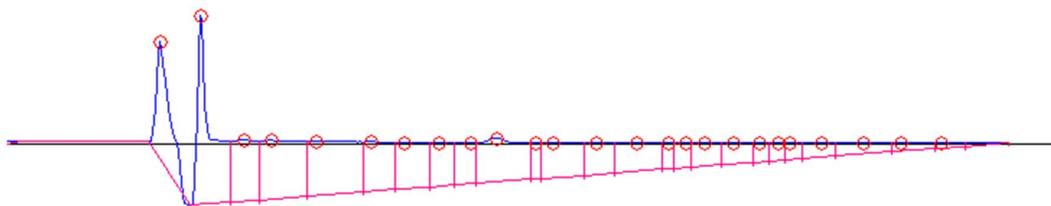
ANEXO No 4. FOTOGRAFÍA DEL EQUIPO DE HPLC LC-10Ai SHIMADZU



**ANEXO No 5. PICOS IDENTIFICADOS EN EL SOLVENTE METANOL-AGUA MEDIANTE HPLC.
ENSAYO 1. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO DE 2012**

Componente	Tiempo de retención	Área	Altura
1	1,783	171,811	18,862
2	2,2	284,981	29,443
3	2,616	159,067	9,546
4	2,9	254,5365	9,07
5	3,333	392,159	8,335
6	4,2	181,878	7,156
7	4,583	104,562	6,65
8	5,133	233,175	6,665
9	5,5	75,891	5,483
10	5,766	96,6265	5,163
11	6,05	33,7165	4,809
12	6,166	90,672	4,667
13	6,533	82,578	4,223
14	6,866	74,361	3,805
15	7,3	56,7875	3,275
16	7,45	30,596	3,084
17	7,6	44,721	2,899
18	7,95	39,56	2,477
19	8,15	17,8	2,229
20	8,383	42,478	1,96
21	8,816	42,573	1,455
22	9,216	18,836	0,955

**ANEXO 6. CROMATOGRAMA DEL SOLVENTE METANOL-AGUA OBTENIDO MEDIANTE HPLC.
FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO DE 2012**



**ANEXO 7. PICOS IDENTIFICADOS EN EL SOLVENTE METANOL-AGUA MEDIANTE HPLC.
ENSAYO 2. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO DE 2012**

Componente	Tiempo de Retención	Área	Altura
1	1,766	184,809	17,61
2	2,183	295,296	30,229
3	2,6	132,484	9,624
4	2,866	145,767	9,189
5	3,133	139,419	8,724
6	3,35	125,7635	8,449
7	3,7	144,76	8,009
8	3,9	138,268	7,775
9	4,2	151,9445	7,392
10	4,55	82,514	6,925
11	4,85	98,97	6,552
12	5,133	195,503	6,9
13	5,666	153,072	5,501
14	6,083	136,64	4,973
15	6,5	119,928	4,446
16	6,916	71,6785	3,895
17	7,233	47,95	3,488
18	7,45	34,8295	3,22
19	7,6	43,352	3,032
20	7,95	45,689	2,585
21	8,183	18,104	2,287
22	8,333	35,769	2,1
23	8,816	47,8735	1,5
24	9,183	14,041	1,014

**ANEXO No 8. PICOS IDENTIFICADOS EN LA MUESTRA DE GENIPÓSIDO MEDIANTE HPLC.
ENSAYO 1. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO DE 2012**

Componente	Tiempo de retención	Área	Altura
1	1,766	155,726	16,074
2	2,166	318,008	39,503
3	2,6	159,629	9,452
4	2,983	223,8375	8,926
5	3,316	275,8355	8,583
6	3,75	55,186	7,897
7	3,966	152,11	7,643
8	4,333	129,588	7,169
9	4,683	150,296	6,794
10	5,083	1153,817	110,052
11	5,55	131,724	5,7
12	6,133	208,9915	5,389
13	7,1	191,29	3,667
14	7,45	62,5555	3,191
15	7,85	18,738	2,669
16	8,25	60,74	2,177
17	8,583	60,0475	1,783
18	9,216	36,314	1,055

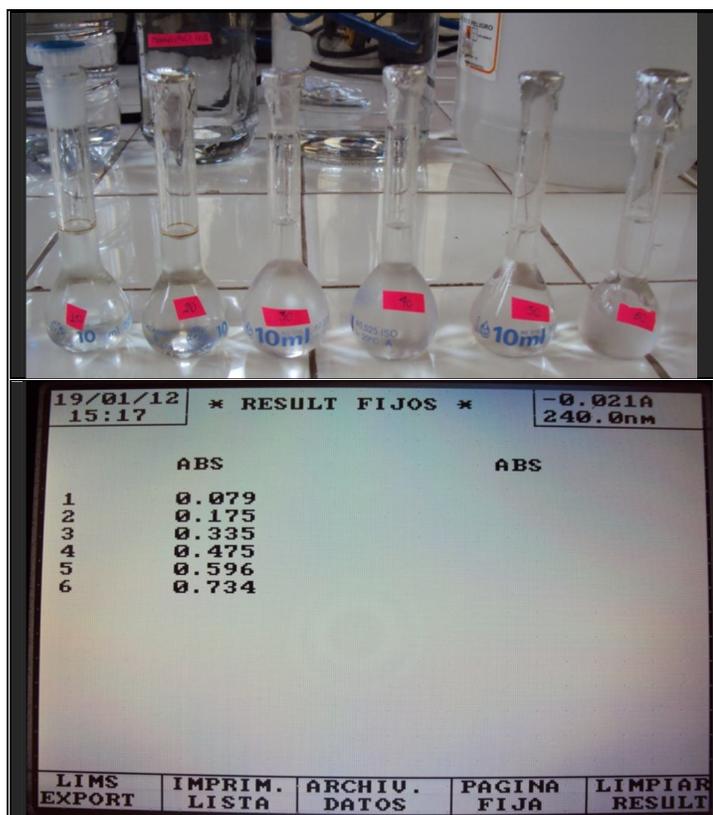
**ANEXO No 9. PICOS IDENTIFICADOS EN LA MUESTRA DE GENIPÓSIDO MEDIANTE HPLC.
ENSAYO 2. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO DE 2012**

Componente	Tiempo de retención	Área	Altura
1	1,733	347,498	32,935
2	2,2	349,364	50,537
3	2,616	167,932	9,402
4	2,933	204,5195	8,937
5	3,316	227,7685	8,634
6	3,65	102,946	7,979
7	3,95	195,69	7,644
8	4,316	112,941	7,137
9	4,6	113,6505	6,744
10	5,05	1976,8585	199,809
11	5,533	128,462	5,812
12	6,1	236,744	5,908
13	6,7	56,2	4,062
14	7,05	80,634	3,689
15	7,3	42,592	3,315
16	7,55	36,128	2,993
17	7,666	83,6055	2,848
18	8,516	69,36	1,841
19	9,166	44,038	1,182

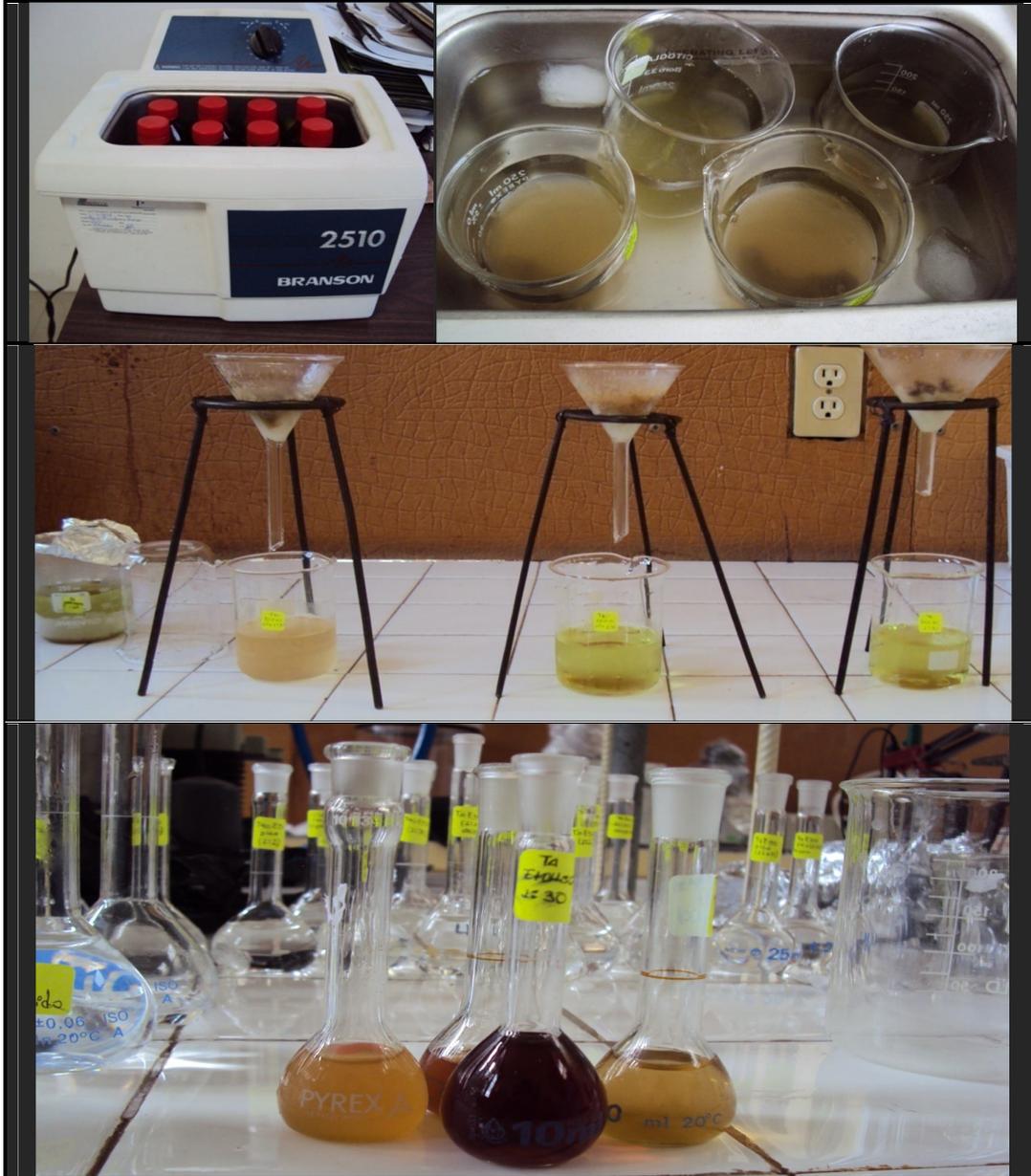
**ANEXO No 10. PICOS IDENTIFICADOS EN LA MUESTRA DE GENIPÓSIDO MEDIANTE HPLC.
ENSAYO 3. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO DE 2012**

Componente	Tiempo de retención	Área	Altura
1	1,766	309,063	31,451
2	2,216	347,369	52,498
3	2,65	170,712	9,536
4	2,966	224,9898	9,045
5	3,333	301,157	8,747
6	3,966	205,7885	7,717
7	4,366	235,846	7,162
8	5,083	2015,398	204,203
9	5,55	129,7855	5,894
10	6,116	229,505	6,064
11	7,066	149,508	3,922
12	7,35	79,5665	3,543
13	7,966	82,362	2,786
14	8,133	18,02	2,567
15	8,5	86,689	2,154
16	9,2	54,633	1,312

ANEXO No 11. FOTOGRAFÍAS DE LA DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL GENIPÓSIDO. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. FEBRERO DE 2012



ANEXO No 12. FOTOGRAFÍAS DE LA DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA EN EXTRACCIÓN DE GENIPOSIDO BAJO CONDICIONES ESPECÍFICAS. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. FEBRERO DE 2012



ANEXO No 13. FOTOGRAFÍAS DE LA DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA EN EXTRACCIÓN DE GENIPÓSIDO BAJO CONDICIONES ESPECÍFICAS (CONTINUACIÓN). FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. FEBRERO DE 2012

31/01/12 10:48		* RESULT FIJOS *			0.729A 240.0nm	
		ABS				ABS
1		1.154				
2		0.638				
3		1.167				
4		0.985				
5		0.929				
6		0.730				
7		0.776				
8		0.366				
9		0.729				
LIMS EXPORT	IMPRIM. LISTA	ARCHIU. DATOS	PAGINA FIJA	LIMPIAR RESULT		

31/01/12 11:50		* RESULT FIJOS *			0.402A 240.0nm	
		ABS				ABS
1		0.315				
2		0.693				
3		0.591				
4		0.887				
5		0.890				
6		0.738				
7		0.574				
8		0.416				
9		0.402				
LIMS EXPORT	IMPRIM. LISTA	ARCHIU. DATOS	PAGINA FIJA	LIMPIAR RESULT		

31/01/12 12:11		* RESULT FIJOS *			0.706A 240.0nm	
		ABS				ABS
1		0.508				
2		0.707				
LIMS EXPORT	IMPRIM. LISTA	ARCHIU. DATOS	PAGINA FIJA	LIMPIAR RESULT		

31/01/12 14:34		* RESULT FIJOS *			0.646A 240.0nm	
		ABS				ABS
1		0.218				
2		0.163				
3		0.176				
4		0.214				
5		0.647				
6		0.333				
7		0.286				
8		0.391				
9		0.733				
10		0.647				
LIMS EXPORT	IMPRIM. LISTA	ARCHIU. DATOS	PAGINA FIJA	LIMPIAR RESULT		

ANEXO No 14 DATOS EXPERIMENTALES DE LA DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA EN EXTRACCIÓN DE GENIPÓSIDO BAJO CONDICIONES ESPECÍFICAS. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. FEBRERO DE 2012

Condiciones			P1 (g)	P2 (g)	% E	VD1 (ml)	VA1 (ml)	VD2 (ml)	VA2 (ml)	VD3 (ml)	A	C Genpd en D3 (ppm)	% de Genpd en muestra fresca.
Solv	S/Solv	T											
A	1	a	5,0720	0,4248	8,4	10	0,09	25	5	10	0,333	29,8788	3,27
B	1	a	5,1466	0,3332	6,5	10	0,11	25	5	10	0,286	26,3182	2,32
C	1	a	5,1224	0,2771	5,4	10	0,14	25	5	10	0,315	28,5152	1,99
D	1	a	5,1995	0,3407	6,6	25	0,28	25	6,67	10	0,366	32,3788	2,08
A	1	b	5,0661	0,3487	6,9	10	0,11	25	5	10	0,513	43,5152	3,90
B	1	b	5,2118	0,5258	10,1	10	0,07	25	5	10	0,591	49,4242	6,77
C	1	b	5,0319	0,3416	6,8	10	0,11	25	5	10	0,402	35,1061	3,17
D	1	b	5,0520	0,3137	6,2	10	0,12	25	5	10	0,591	49,4242	4,08
A	2	a	5,2697	0,6473	12,3	25	0,15	25	4	10	0,218	21,1667	4,18
B	2	a	5,2410	0,7539	14,4	25	0,12	25	4	10	0,163	17,0000	4,22
C	2	a	5,0046	0,6712	13,4	25	0,14	25	4	10	0,176	17,9848	4,01
D	2	a	4,9869	0,3949	7,9	25	0,24	25	4	10	0,214	20,8636	2,72

ANEXO No 15 DATOS EXPERIMENTALES DE LA DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA EN EXTRACCIÓN DE GENIPÓSIDO BAJO CONDICIONES ESPECÍFICAS (CONTINUACIÓN). FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. FEBRERO DE 2012.

Condiciones			P1 (g)	P2 (g)	% E	VD1 (ml)	VA1 (ml)	VD2 (ml)	VA2 (ml)	VD3 (ml)	A	C Genpd en D3 (ppm)	% de Genpd en muestra fresca.
Solv	S/Solv	T											
A	2	b	5,0927	0,5540	10,9	25	0,17	25	5	10	0,647	53,6667	7,75
B	2	b	5,1641	0,5571	10,8	25	0,17	25	6,67	10	0,73	59,9545	6,40
C	2	b	5,3571	0,5117	9,6	25	0,18	25	5	10	0,693	57,1515	7,41
D	2	b	5,0071	0,5176	10,3	25	0,18	25	5	10	0,416	36,1667	5,02
A	3	a	5,0025	0,4964	9,9	10	0,08	25	4	10	0,707	58,2121	9,40
B	3	a	5,2639	0,4916	9,3	10	0,08	25	4	10	0,733	60,1818	8,66
C	3	a	5,0633	0,7878	15,6	25	0,12	25	6,67	10	0,638	52,9848	8,17
D	3	a	5,1428	0,4839	9,4	10	0,08	25	5	10	0,738	60,5606	7,36
A	3	b	5,1503	0,4830	9,4	10	0,08	25	4	10	0,647	53,6667	8,14
B	3	b	5,1410	0,4867	9,5	10	0,08	25	5	10	0,574	48,1364	5,85
C	3	b	5,2558	0,4943	9,4	25	0,19	25	6,67	10	0,729	59,8788	5,62
D	3	b	5,1653	0,4987	9,7	10	0,08	25	3	10	0,508	43,1364	8,70

**ANEXO No 16 SECUENCIA DE FOTOGRAFÍAS DE LA ELABORACIÓN DEL DELINEADOR
PROPUESTO. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. MARZO DE 2012**



ANEXO No 17 SECUENCIA DE FOTOGRAFÍAS DEL ESTUDIO DE ESTABILIDAD FORZADA DE GENIPÓSIDO. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. MARZO DE 2012

