

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD
CATÓLICA DEL PERÚ**

Escuela de Posgrado



**ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS BIOPRODUCTOS A PARTIR DE
JENGIBRE PERUANO (*ZINGIBER OFFICINALE*) OBTENIDOS USANDO
TECNOLOGÍA SUPERCRÍTICA**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN QUÍMICA

QUE PRESENTA:

Hugo Lenin Arcos Alcívar

Asesora:

Dra. Juana Rosa Maria Robles Caycho

Lima, 2024

Informe de Similitud

Yo, **Juana Rosa María Robles Caycho**, docente de la Escuela de Posgrado de la Pontificia Universidad Católica del Perú, asesora de la tesis/el trabajo de investigación titulado “Análisis y caracterización de los bioproductos a partir de jengibre peruano (*Zingiber officinale*) obtenidos usando tecnología supercrítica#, del autor **Hugo Lenín Arcos Alcívar**, dejo constancia de lo siguiente:

- El mencionado documento tiene un índice de puntuación de similitud de 20 %. Así lo consigna el reporte de similitud emitido por el software Turnitin el 24 / septiembre / 2024.
- He revisado con detalle dicho reporte y confirmo que cada una de las coincidencias detectadas no constituyen plagio alguno.
- Las citas a otros autores y sus respectivas referencias cumplen con las pautas académicas.

Lugar y fecha:

Lima, 25 de septiembre de 2024

Dra. Robles Caycho Juana Rosa María	
DNI: 07330821	Firma:
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3130-4077	

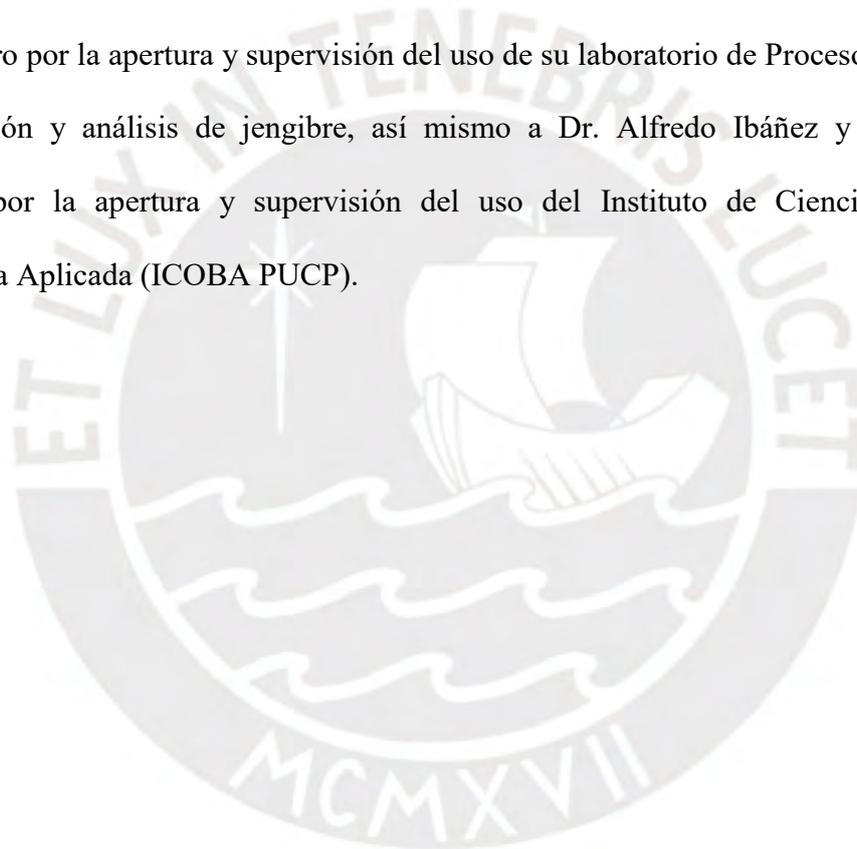
Dedicatoria

A mi hija Luciana Arcos.



Agradecimiento

Este trabajo de investigación es un producto del proyecto del Proceso integrado de obtención de bioproductos a partir de jengibre peruano (*Zingiber officinale*) utilizando tecnología supercrítica y su aplicación como aditivo en la industria alimentaria en el marco del contrato N° 156-2020 - FONDECYT, financiado por PROCIENCIA-CONCYTEC por tal motivo agradezco a la Pontificia Universidad Católica, a la Dra. Juana Robles Caycho por su supervisión y para discusiones productivas. Un agradecimiento especial para la Dra. Fiorella Cárdenas Toro por la apertura y supervisión del uso de su laboratorio de Procesos Industriales para extracción y análisis de jengibre, así mismo a Dr. Alfredo Ibáñez y Dra. Madina Mansurova por la apertura y supervisión del uso del Instituto de Ciencias Ómicas y Biotecnología Aplicada (ICOBA PUCP).



Resumen

El jengibre peruano (*Zingiber officinale*) es utilizado con propósitos medicinales, por sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antivirales y mejora la respuesta inmune inespecífica de los gingeroles y shogaoles entre otros, obtenidos por procesos de deshidrogenación y reducción. El objetivo de este trabajo es desarrollar un método basado en cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) para determinar las condiciones óptimas de extracción de los compuestos de interés, tales como el gingerol, que se encuentran presentes en el jengibre. De esta manera ofrecer una solución técnica para mejorar la identificación de gingeroles (y diferenciar sus productos de descomposición) utilizando diferentes fuentes de ionización. Donde se llegó a la conclusión de que las mejores condiciones para la extracción de hidrocarburos fenólicos sesquiterpénicos, como los gingeroles (6-, 8-, y 10-), del jengibre utilizando la tecnología de fluidos supercrítico, es a las condiciones de 45 °C y 200 psi, así como 50 °C y 150 psi; siendo esta última la que permite extraer con mayor facilidad 6-Shogaol. Este resultado fue confirmado por ESI-MS, APPI-MS, LC-APPI-MS/MS, y por absorbancia UV. Se identificaron, entre numerosas fracciones obtenidas de la extracción, aquellas ricas en los aceites esenciales deseados (T45P200 y T50P150), las cuales fueron caracterizadas con éxito. Este trabajo de investigación es un producto del proyecto del Proceso integrado de obtención de bioproductos a partir de jengibre peruano (*Zingiber officinale*) utilizando tecnología supercrítica y su aplicación como aditivo en la industria alimentaria en el marco del contrato No. 156-2020- FONDECYT, financiado por PROCENCIA-CONCYTEC.

ÍNDICE

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Planteamiento y justificación del tema	1
CAPÍTULO II: FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	3
2.1 Problema de la investigación	3
CAPÍTULO III: OBJETIVO DE INVESTIGACIÓN	7
3.1 Objetivo General	7
3.2 Objetivos Específicos	7
CAPÍTULO IV: MARCO DE REFERENCIA	8
4.1 El jengibre (<i>Zingiber officinale</i>)	8
4.1.1 El jengibre en el Perú	11
4.2 Bioproductos	11
4.3 Aceites esenciales	12
4.4 Oleorresinas	12
4.5 Técnica verde	13
4.6 Extracción de fluidos supercríticos	13
4.7 Métodos de extracción	14
4.7.1. Extracción por Soxhlet	14
4.7.2 Hidrodestilación	14
4.7.3 Hidrodifusión asistida	15
4.7.4 Destilación a vapor	15
4.7.5 Fluidos supercríticos	16
4.7.6 DPPH	16
4.7.7 Polifenoles totales	17
4.8 Técnicas de análisis	18
4.8.1 Cromatografía líquida	18

4.8.2 Espectrómetro de masas	20
CAPÍTULO V: METODOLOGÍA	21
5.1 Extracción por Hidrodestilación	21
5.1.1 Preparación de muestras	21
5.1.2 Extracción de aceites esenciales de kion	22
5.2 Extracción por Fluidos Supercríticos (EFS)	23
5.2.1 Materiales empleados	24
5.2.2 Preparación de muestras	24
5.3 Ensayo DPPH	29
5.3.1 Materiales empleados	29
5.3.2 Curva de calibración	29
5.3.3 Análisis del aceite de jengibre comercial	30
5.4 Determinación de Polifenoles totales	32
5.4.1 Materiales empleados	32
5.4.2 Curva de Calibración	32
5.4.3 Procedimiento	32
5.4.4 Análisis aceite comercial de jengibre	34
5.5 Análisis por cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas (LC-MS)	35
5.5.1 Materiales empleados	35
5.5.2 Cromatografía líquida	36
5.5.3 Espectrometría de masas (MS)	37
5.5.4 Análisis de datos	38
CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN DE RESULTADOS	40
6.1 Resultados de extracción por hidrodestilación	40
6.2 Resultados de la Extracción por Fluidos Supercríticos	42
6.3 Resultados ensayo por DPPH	44
6.4 Polifenoles Totales	46

6.5 Análisis por espectrometría de masas tandem (MS/MS)	47
6.6 Validación de MS utilizando análisis UV	63
7. CONCLUSIONES	70
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71



Índice de figuras

Figura 1. Compuestos activos de extractos de jengibre.....	5
Figura 2. Fórmula para cálculo de eficiencia antirradical.....	17
Figura 3. Diagrama Básico de un cromatógrafo líquido.....	19
Figura 4. Muestra de kion liofilizado.....	21
Figura 5. Medidor de humedad.....	22
Figura 6. Equipo de hidrodestilación.....	23
Figura 7. Hornilla.....	23
Figura 8. Equipo de EFS.....	24
Figura 9. Viales usados en EFS.....	25
Figura 10. Saco de extracción.....	26
Figura 11. Tapa del reactor.....	27
Figura 12. Reactor más saco de extracción.....	28
Figura 13. Reactor más saco de extracción vista superior.....	28
Figura 14. Ensamble de los viales.....	28
Figura 15. Ensayo DPPH.....	30
Figura 16. Equipo espectrofotómetro.....	31
Figura 17. Soluciones y equipos usados en Polifenoles totales.....	33
Figura 18. Ensayo Polifenoles totales	34
Equipo 19. Equipo UHPLC-MS.....	37
Figura 20. Ensayo de hidrodestilación.....	40
Figura 21. Aceite esencial de jengibre obtenido por EFS.....	42
Figura 22. Ensayo de DPPH.....	44
Figura 23. Ensayo de Polifenoles totales.....	46
Figura 24. Muestras obtenidas por EFS.....	49

Figura 25. ESI MS.....	50
Figura 26. ESI MS de la muestra T50P150.....	51
Figura 27. Primer ensayo de estadística multivariable.....	53
Figura 28. Cromatograma y espectro MS de muestra T50P150.....	54
Figura 29. Cromatograma y espectro MS de muestra T50P150.....	54
Figura 30. Conversión de 6-Gingerol a 6-Shogaol.....	55
Figura 31. Espectro MS de muestra T50P150.....	56
Figura 32. Análisis de muestra T50P150 y T45P200 por fuente APPI.....	57
Figura 33. Análisis de muestra T50P150 y T45P200 por fuente APPI.....	58
Figura 34. Análisis de hidrocarburos fenólicos sesquiterpénicos.....	59
Figura 35. Análisis de hidrocarburos fenólicos sesquiterpénicos.....	59
Figura 36. Análisis de hidrocarburos fenólicos sesquiterpénicos.....	60
Figura 37. Análisis de hidrocarburos fenólicos sesquiterpénicos.....	60
Figura 38. Análisis de hidrocarburos fenólicos sesquiterpénicos.....	61
Figura 39. Análisis de hidrocarburos fenólicos sesquiterpénicos.....	61
Figura 40. Análisis de hidrocarburos fenólicos sesquiterpénicos.....	62
Figura 41. Análisis de hidrocarburos fenólicos sesquiterpénicos.....	62
Figura 42. Estudio de multivariable PCA.....	63
Figura 43. Correlación de datos obtenidos por UV.....	64
Figura 44. Correlación de datos obtenidos por UV.....	65
Figura 45. LC-MS/MS de muestras T45P200R2.....	66
Figura 46. LC-MS/MS de muestras T50P150R2.....	66
Figura 47. LC-MS/MS de muestras T50P250R1.....	67

Índice de Tablas

Tabla 1. Composición sistemática del jengibre.....	8
Tabla 2. Composición fitoquímica del jengibre.....	9
Tabla 3. Preparación de las soluciones para curva ensayo DPPH.....	29
Tabla 4. Diluciones para ensayo de DPPH.....	31
Tabla 5. Preparación de las soluciones para curva ensayo Polifenoles totales.....	33
Tabla 6. Identificación de las muestras para EFS.....	35
Tabla 7. Cálculos de rendimientos para hidrodestilación.....	41
Tabla 8. Parámetros para EFS.....	43
Tabla 9. Masa de aceite esencial de kion.....	43
Tabla 10. Cálculo de rendimiento para EFS.....	43
Tabla 11. Curva para DPPH.....	44
Tabla 12. Datos ensayos de DPPH.....	45
Tabla 13. Análisis por DPPH.....	45
Tabla 14. Curva para Polifenoles totales.....	46
Tabla 15. Análisis de Polifenoles totales.....	46
Tabla 16. Condiciones de presión y temperatura (MS/MS)	47
Tabla 17. Compuestos de interés de los extractos de jengibre.....	50
Tabla 18. UV absorbancias de muestras extraídas.....	64
Tabla 19. UV absorbancias de muestras extraídas de todas las muestras.....	69

ABREVIATURAS

APPI	Fotoionización a presión atmosférica (Atmospheric Pressure PhotoIonization)
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EC50	Concentración necesaria para obtener un efecto antioxidante del 50%
tEC50	Tiempo necesario para alcanzar el equilibrio a la concentración de EC50
EFS	Extracción por fluidos supercríticos
HESI	Ionización por electro spray calentado (Hot ElectroSpray Ionization)
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas en tándem
MeOH	Alcohol metílico
PCA	Análisis de componentes principales (Principal Component Analysis)
PSI	Libras por pulgada cuadrada
UHPLC-MS	Cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplado a un equipo de espectrometría de masas.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento y justificación del tema

El jengibre peruano (*Zingiber officinale*) o también conocido como kion, es utilizado con propósitos curativos desde hace miles de años según afirma Tay (2001) citado en Méndez (2013). La parte esencial de la planta la constituyen los rizomas, que son gruesos, carnosos y nudosos; poseen un olor fuerte aromático, sabor agrio y picante; son de color cenizo por fuera y blanco amarillento por dentro, de un sabor muy intenso, lo que se traduce en mejores atributos organolépticos y en la mayoría de los casos, cuenta con producción orgánica certificada.

La estructura del cuerpo del jengibre posee rizomas que se utilizan como fuente tanto de aceite esencial como de oleorresina y estos bioproductos son utilizados en la industria de alimentos y farmacéutica como aromatizantes y saborizantes, como afirma Méndez (2013), indica que la composición química de los rizomas contiene aceite esencial (0,5 a 3 %) con derivados terpénicos; resina (5 a 8 %); principios amargos cetónicos y fenólicos (zingerona, gingerol, shogaol) y otras sustancias.

Los microclimas húmedos están presentes en el departamento de Junín, donde se cultiva más del 90% de la producción nacional, hacen posible que las provincias de Chanchamayo y Satipo se conviertan en los principales centros de producción del jengibre peruano. El jengibre es ampliamente usado en la industria tanto de alimentos como en el rubro farmacéutico por sus propiedades aromatizante y saborizante, pero, lo más interesante con respecto al jengibre peruano es que se le atribuye propiedades antivirales, antioxidantes y fortalece el sistema inmunológico, lo que se traduce en el aumento de su consumo tanto en el mercado local peruano, así como en el mercado internacional.

Ante el creciente interés de los consumidores por productos naturales, elaborados mediante métodos ecológicos y limpios, libres de impactos negativos en el medio ambiente, se busca una alternativa a las técnicas tradicionales de producción. Actualmente, la elaboración de productos como el kion implica el uso de métodos convencionales, como el arrastre de vapor y el empleo de solventes orgánicos. Estos métodos tradicionales no solo generan impactos ambientales, sino que también provocan la degradación de los componentes bioactivos esenciales del kion.

Por lo expuesto, el objetivo de la presente investigación es el obtener los bioproductos del jengibre peruano a través de técnicas verdes como es la extracción por fluidos supercríticos (EFS) lo cual evita la contaminación con otras sustancias orgánicas, de esta forma se logra obtener una extracción amigable con el medio ambiente, libre de residuos tóxicos en el producto final y disminuir los tiempos de extracción de los bioproductos del jengibre peruano o kion (Velásquez, 2008).

Esta propuesta posibilita una comprensión más completa de la información existente sobre la técnica de extracción mediante fluidos supercríticos. Esto se logra al emplear temperaturas bajas y utilizar dióxido de carbono como solvente (a partir de 31 °C y 74 bar), lo que facilita la separación de los componentes bioactivos sin degradación y sin dejar residuos de solvente. La elección adecuada de la presión y la temperatura de extracción permitirá obtener un extracto enriquecido en aceite esencial y otro enriquecido en oleorresina.

Este trabajo de investigación es un producto del proyecto del Proceso integrado de obtención de bioproductos a partir de jengibre peruano (*Zingiber officinale*) utilizando tecnología supercrítica y su aplicación como aditivo en la industria alimentaria en el marco del contrato No. 156-2020- FONDECYT, financiado por PROCENCIA-CONCYTEC.

CAPÍTULO II: FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

2.1 Problema de la investigación

En la actualidad se ha visto un crecimiento a nivel mundial de productos naturales en fresco o productos procesados que contengan componentes naturales como el jengibre. Según Mao, et al. (2019), en las últimas décadas se ha descubierto en el campo de la medicina, que este rizoma provee de actividades de índole biológica en el campo de los anticancerígenos (Citronberg,2013) antimicrobianos (Kumar,2014), antioxidantes (Ji 2017; Nile 2015), antiinflamatorias (Zhang,2016), etc.

Los complementos alimenticios a base de extractos de jengibre son de potencial interés por sus propiedades antiinflamatorias y antieméticas; sin embargo, se necesita la estandarización química de estos productos para un mejor control de calidad y para pasar los controles asociados con medicamentos para su potencial aplicación a pacientes (Abd El-Kareem et al., 2016; Asamenew et al., 2019; Fouda et al., 2020; Hong et al., 2021; Tao et al., 2009; Zhang et al., 2018).

Por otro lado, gracias a los avances de la medicina moderna tanto en lo científico como en lo tecnológico, se ha podido difundir el potencial curativo del jengibre para prevenir y tener bajo control a enfermedades más complejas y de actualidad, como lo son las enfermedades neurodegenerativas, diabetes, cardiovasculares y muchas más, en comparación con el uso tradicional de este vegetal que era empleado desde hace 2000 años para combatir enfermedades ordinarias de índole gastrointestinal, gripe, vómitos y tos (Abd El-Kareem et al, 2016; Bhattarai et al., 2007; Bhattarai et al., 2001; Ko et al., 2019; Kou et al., 2018; Kou et al, 2017; Mao et al., 2019; Montalvo et al., 2020; Ok et al., 2012; Park et al., 2012).

Sin embargo, los métodos tradicionales de extracción empleados a nivel industrial, así como de laboratorios, ocasionan el aumento de la degradación de los componentes bioactivos del jengibre peruano (*Zingiber officinale*) cambiando su estructura o lo que da lugar a la

formación de otros metabolitos. Esto es causado por el empleo de altas temperaturas y solventes orgánicos que inciden en la salud humana y al mismo tiempo nocivos para el medio ambiente, al ser tanto tóxicos como costosos (Velásquez, 2008). Lo que ocasiona una problemática en la salud de las personas y un impacto negativo en el medio ambiente, los cuales se pueden evitar mediante la técnica de extracción de fluidos supercríticos (EFS) propuesta en esta investigación, ya que mediante la elección adecuada de temperatura y presión se obtendrá un extracto rico, ya sea en aceite esencial como en oleorresina. Utilizar como solvente el CO₂ supercrítico, los componentes bioactivos que se obtengan, no se degradan y no tiene la presencia de solvente residual.

El grupo de Innovación de la Pontificia Universidad Católica de Perú, liderado por la Doctora Fiorella Cárdenas Toro proponen una etapa de extracción a temperaturas entre 35 °C y 60 °C y presiones entre 150 y 250 bar, seguido de varias etapas de separación a fin de obtener diferentes fracciones de aceite esencial y oleorresina (Cárdenas,2024). Los extractos ricos en aceite esencial se obtienen a bajas condiciones de presión y temperatura y los extractos ricos en oleorresina, a altas presiones.

Como resultado de este trabajo se espera desarrollar un proceso que ofrezca una producción sin contaminantes, recurrir a una técnica limpia que emplea CO₂ supercrítico como solvente inofensivo versus otros reactivos orgánicos disponibles. En consecuencia, no se generan residuos perjudiciales y los aceites que se obtienen en cuanto a calidad, son mejores en comparación con los tradicionales al emplear menos energía usando temperaturas en un intervalo de 40 y 50 grados Celsius.

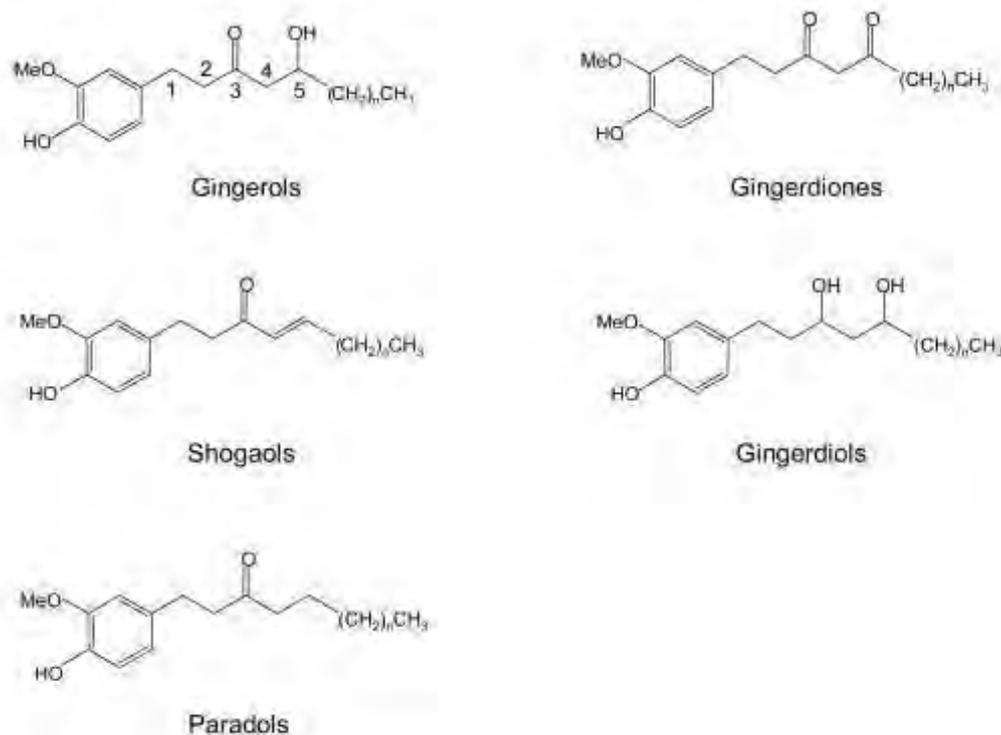
En general, el jengibre es una conocida fuente de hidrocarburos fenólicos sesquiterpénicos, los cuales son con una caracterización clave de los extractos y los más importantes se clasifican como:

- a) 6-, 8-, 10- gingeroles que son componentes activos de jengibre fresco,

- b) 6-, 8-, 10- shogaoles que son productos de deshidratación de los gingeroles,
- c) paradoles que son productos de la desoxigenación de la posición 5 del gingerol,
- d) gingerdionas que son productos de deshidrogenación de hidroxilo de β -cetona de gingeroles y,
- e) gingerdiols que son productos de reducción de cetonas en posición 5 de los gingeroles

Figura 1

Compuestos activos de extractos de jengibre.



Nota. Tomado de Afzal et al. (2001), Charles et al. (2000) y Jolad et al. (2005).

Uno de los principales retos de desarrollar un método basado en cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) para evaluar la presencia de hidrocarburos fenólicos sesquiterpénicos, como los gingeroles, es su baja estabilidad. Éstos pueden descomponerse en shogaoles, paradoles, gingerdionas y/o gingerdiols. Por ejemplo, el incremento de la temperatura con condiciones ligeramente ácidas puede favorecer la

reacción de deshidratación, es decir la pérdida del grupo hidroxilo en posición 5 de los gingeroles, transformándolos en shogaoles (Kou et al., 2017).

En esta investigación, se va a desarrollar un método (LC-MS/MS) para determinar las condiciones óptimas de extracción de los principales compuestos de interés que se encuentran presentes en el jengibre, tales como el 6-gingerol, comúnmente conocido como gingerol, presente en diversos suplementos dietéticos producidos a partir de rizomas de jengibre (Jiang et al., 2005; Yoonus et al., 2015; Vázquez et al., 2001).

Es interesante que la cantidad pérdida de gingeroles es siempre mucho mayor que el aumento de la cantidad de shogaoles, lo que indica que pueden ocurrir posibles reacciones secundarias durante el proceso de deshidratación, generando a su vez otros productos (paradoles, gingerdionas, y/o gingerdioles). En este trabajo buscaremos una solución técnica para mejorar la identificación de gingeroles (y diferenciar sus productos de descomposición) utilizando la fuente de ionización denominada APPI (por las letras de inglés, Atmospheric Pressure PhotoIonization).

CAPÍTULO III: OBJETIVO DE INVESTIGACIÓN

3.1 Objetivo general:

- Obtener los bioproductos del jengibre peruano (*Zingiber Officinale*) a través de la técnica verde como lo es la EFS.

3.2 Objetivos específicos:

- Reducir el tiempo de extracción y favorecer el escalamiento del proceso.
- Analizar los extractos obtenidos por espectrometría de masas.
- Caracterizar por los métodos de DPPH y polifenoles totales los extractos obtenidos tanto oleorresinas como aceites esenciales.
- Evaluar los bioproductos obtenidos como aditivos en el desarrollo de nuevos productos como por ejemplo un chocolate con aroma a jengibre, aceite de oliva enriquecido con oleorresina de jengibre y harina de trigo enriquecida con harina de jengibre.

CAPÍTULO IV: MARCO DE REFERENCIA

4.1 El jengibre (*Zingiber officinale*)

Zingiber officinale pertenece a la familia Zingiberácea y tiene su origen en la India o el Sudeste Asiático, y se extiende a lo largo de todas las regiones tropicales del mundo, donde se aprovechan tanto sus rizomas con fines medicinales como alimenticios, su aroma y uso en la cocina (Zambrano-Blanco, 2015; Huaccho-Rojas et al., 2021). Esta planta, cultivada en regiones cálidas, presenta una forma curva y similar a una mano, conocida como rizomas; su aroma es fuerte y aromático, mientras que su sabor se distingue por ser picante y agrio, siendo utilizada en la gastronomía como aromatizante y saborizante, así como en el ámbito medicinal, donde ha sido apreciada por sus efectos beneficiosos sobre la salud (Castillo, 2019). A continuación, se presenta su composición sistemática:

Tabla 1

Composición sistemática del jengibre

Denominación científica	<i>Zingiber officinale</i>
Seudónimo corriente	<i>Gengibre, Ginger, Ajengibre o kion.</i>
Reino	<i>Plantae</i>
Clase	<i>Monocotyledoneas</i>
Estructura	<i>Zingiberales</i>
Linaje	<i>Zingiberaceae</i>
Subfamilia	<i>Zingiberoideae</i>
Especie	<i>Zingiber</i>
Género	<i>Officinale</i>

Nota. Tomado de Tarazona y Turco (2021).

En lo que concierne a su composición podemos identificar la presencia de antioxidantes, en particular; los polifenoles, los cuales constituyen el grupo más amplio de compuestos no calóricos que se encuentran en alimentos de origen vegetal; y, estudios recientes han indicado que una alimentación que sea rica en polifenoles puede tener beneficios significativos para la salud (Platinetti et al., 2016). Asimismo, contiene tanto compuestos volátiles como no volátiles que poseen propiedades farmacológicas significativas, como funciones antioxidantes, antiinflamatorias, antieméticas y antivirales. Entre estos compuestos fenólicos que se encuentran en el aceite de jengibre, destaca su capacidad sinérgica para actuar como agentes antioxidantes y antiinflamatorios, entre estos componentes, se destacan el gingerol, el shogaol, la zingerona y las gingerdionas (Montalvo et al., 2020). A continuación, se presenta su composición fitoquímica:

Tabla 2

Composición fitoquímica del jengibre

Clasificación Fitoquímica	Compuestos Principales	Descripción
Fenoles	Gingeroles, Shogaoles	Compuestos activos que poseen propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antivirales
Aceites esenciales	Zingibereno, Bisaboleno, Felandreno, Cineol	Componentes volátiles responsables del aroma característico del jengibre
Flavonoides	Quercetina, Kaempferol	Antioxidantes que ayudan a reducir el estrés oxidativo y la inflamación
Alcaloides	Capsaicina	Compuesto que contribuye al efecto analgésico y antiinflamatorio del jengibre
Terpenoides	Zingibereno, Bisaboleno, Farneseno	Contribuyen a las propiedades antimicrobianas y antiinflamatorias.

Vitaminas	Vitamina C, Vitamina B6	Nutrientes esenciales que apoyan el sistema inmunológico y la salud general
Sales	Potasio, Magnesio, Manganeso	Minerales que son esenciales para diversas funciones biológicas y el bienestar general

Nota. Adaptado a partir de Farmiciencia (2021)

Montalvo et al. (2020) también señalan que el jengibre al tener propiedades farmacológicas, (los extractos etanólicos y metanólicos que son abundantes en fenoles totales como gingeroles y shogaoles), ha permitido ser de gran ayuda para la prevención y tratamiento de los síntomas de la COVID-19 en el contexto de la pandemia, permitiendo aliviar malestares asociados a las vías respiratorias, a través de su acción antiviral, tiene la capacidad de inhibir los sitios activos de la proteína S del virus, así como las proteínas 3CLpro y PLpro de SARS-CoV-2, impidiendo su ingreso a las células de los neumocitos y la subsiguiente replicación del virus.

Respecto al requerimiento edafoclimáticos, el cultivo de esta planta requiere condiciones climáticas de tipo tropical o subtropical, con temperaturas que oscilen entre los 25°C y los 30 °C, por lo que es esencial contar con una precipitación anual que supere los 2 milímetros, distribuida a lo largo de todo el año, ya que no tolera períodos secos, y requiere una humedad relativa, aproximadamente del 80 % para permitir un desarrollo vegetativo óptimo, adicionalmente en lo que concierne al establecimiento del cultivo su propagación se realiza mediante divisiones del rizoma en un proceso asexual, ya que es infrecuente que produzca semillas (Ministerio de Economía Familiar, Comunitaria, Cooperativa y Asociativa, 2022).

4.1.1 El jengibre en el Perú

Del mismo modo, TradeMap (2020) citado en Camargo et al. (2021) considera al jengibre peruano como el más valorado debido a su alta calidad, alcanzando un valor de 1,76 USD por unidad vendida en comparación con el jengibre chino, que se comercializa a 1,03 USD por unidad, lo cual se atribuye debido a la acumulación de gingerol en el rizoma y a su origen orgánico, en contraste con China, donde aproximadamente el 95 % de la producción es convencional. Como resultado, la presencia de Perú en el mercado de exportación de jengibre ha experimentado un aumento significativo, llegando a ocupar el cuarto lugar en valor de exportaciones en 2019.

Es importante destacar que el cultivo del jengibre peruano se inicia típicamente en los meses de agosto a septiembre, y la cosecha se realiza entre mayo y junio, por lo que este proceso requiere un período de desarrollo que oscila entre 6 y 8 meses, mientras que, para lograr su máximo sabor, se recomienda un período de maduración de al menos 9 a 10 meses, en ocasiones incluso llegando a los 14 meses (Wong, 2023). En su esencia, el jengibre peruano se muestra accesible para la cosecha a lo largo de la mayor parte del año, lo que resalta su constante disponibilidad a lo largo de varias estaciones. No obstante, es imperativo señalar que su cultivo conlleva una serie de desafíos técnicos y logísticos que requieren atención y cuidado.

4.2 Bioproductos

Los bioproductos o bioinsumos son sustancias derivadas de organismos vivos o sus componentes, como hongos, bacterias, material vegetal y enzimas que, gracias a la aplicación de herramientas biotecnológicas, tienen la capacidad de desempeñar una amplia gama de funciones que anteriormente se lograban mediante la síntesis química de productos artificiales. La idea detrás de estos bioproductos es que puedan replicar los efectos de los productos

químicos de una manera "natural", promoviendo una relación más cercana con los principios de la vida misma, especialmente en el contexto de la agricultura (Fillipone et al., 2017).

Los bioproductos ofrecen ventajas notables, ya que suelen ser competitivos tanto en términos de sus características como en lo que respecta a su coste. La tecnología y la investigación que respaldan su desarrollo avanzan de manera veloz; y estos productos gozan de una amplia aceptación en la comunidad científica (Bustamante y Pérez, 2016).

4.3 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son compuestos líquidos altamente concentrados que se extraen de plantas aromáticas, los cuales contienen una variedad de compuestos químicos, tanto volátiles como no volátiles, que les confieren sus propiedades únicas. Los aceites esenciales se obtienen a partir de las partes aromáticas de las plantas, como las flores, hojas, cortezas, raíces o frutos. Se utilizan varios métodos de extracción, como la destilación al vapor, la extracción con disolventes, con fluidos supercríticos, etc. Cada método tiene sus ventajas y puede ser más apropiado para ciertos tipos de plantas (Aziz et al., 2018).

En resumen, ciertos aceites esenciales son extractos líquidos de plantas aromáticas que contienen una amplia variedad de compuestos químicos con propiedades terapéuticas. Estas propiedades hacen que los aceites esenciales sean útiles en diversas aplicaciones, desde la aromaterapia hasta la medicina natural y la industria de la belleza. Sin embargo, es importante utilizarlos con precaución y consultar a un profesional de la salud antes de su uso, especialmente en aplicaciones médicas.

4.4 Oleorresinas

Se obtienen a partir de partes de las plantas mediante la extracción con disolventes orgánicos, los cuales se eliminan posteriormente a través de la destilación. Se producen al diluir

los aceites esenciales en etanol o propilenglicol. Los extractos se generan a partir de vegetales mediante procesos de maceración, percolación, destilación y otros métodos diseñados para extraer los compuestos aromatizantes y saborizantes activos (Badui, 1993).

4.5 Técnica verde

Las tecnologías ecológicas se definen como un conjunto de conocimientos, dispositivos y soluciones de alto rendimiento diseñados para abordar y reducir los desafíos ambientales y riesgos asociados; además, la conservación de recursos se vincula con las estrategias de minimización, reutilización y reciclaje, prácticas que ganan aprecio tanto en el ámbito empresarial como entre los empleados, al reconocer su contribución al cuidado del medio ambiente (Martínez-Rubio et al., 2021). Asimismo, se caracterizan por su enfoque en la preservación del medio ambiente al ser menos perjudiciales, emplear recursos de manera más sostenible, aumentar la proporción de reciclaje de sus desechos y productos y, gestionar de manera más adecuada los residuos remanentes en comparación con las tecnologías tradicionales (Prieto, 2020).

Es importante recalcar, que, en la literatura, se encuentran otros términos afines a la innovación verde, como tecnología verde, tecnologías medioambientales, tecnologías relacionadas con el clima, así como tecnologías que fomentan la adaptación y mitigación del cambio climático, la eficiencia energética, la prevención de la contaminación, el reciclaje de residuos y el diseño de productos respetuosos con el medio ambiente (Aponte, 2021).

4.6 Extracción de fluidos supercríticos

La extracción con fluidos supercríticos (SFE) es una tecnología ecológica en la cual el dióxido de carbono (CO_2) en estado supercrítico (SC-CO_2) es el fluido más utilizado debido a su naturaleza no tóxica, no inflamable, no corrosiva y su facilidad de manejo, permitiendo operaciones a presiones relativamente bajas y cerca de la temperatura ambiente; además, el

CO₂ supercrítico es económico, disponible en grandes cantidades y de alta pureza, lo que garantiza una alteración mínima de los compuestos bioactivos, preservando así sus propiedades curativas o funcionales, y tiene la capacidad de disolver sustancias lipofílicas mientras que se elimina fácilmente de los productos finales (Artica et al., 2021).

4.7 Métodos de extracción

4.7.1. Extracción por soxhlet

Velasco, Villada y Carrera (2007) definen a la extracción con soxhlet como un proceso utilizado en química y laboratorios para extraer compuestos de una muestra sólida con un solvente. En este proceso, se tienen en cuenta factores como la selección, ya que se debe elegir una apropiada función de su capacidad para disolver el compuesto deseado, su estabilidad química, baja toxicidad y otros factores; las características de la matriz, puesto que la eficacia de la extracción depende del tamaño de las partículas en la muestra sólida, con partículas más pequeñas que favorecen una extracción más eficiente y las condiciones de operación, dado que la temperatura es crítica, ya que puede afectar la calidad del producto final. La recuperación y estabilidad del solvente es esencial para minimizar costos.

En resumen, la extracción con soxhlet es un proceso que involucra la elección adecuada del solvente, las características de la muestra sólida y las condiciones de operación para lograr una extracción eficiente y de alta calidad de los compuestos deseados. Cada uno de estos factores debe ser considerado cuidadosamente para obtener resultados óptimos.

4.7.2 Hidrodestilación

La hidrodestilación (HD) es el método estándar de extracción de aceite esencial de material vegetal, que a menudo se utiliza para aislar productos naturales no solubles con alto punto de ebullición, este proceso implica la inmersión completa de los materiales de plantas en agua, seguido por ebullición; asimismo el vapor que lleva al aceite esencial se condensa en una

fracción acuosa. En cierto grado, este método protege a los aceites esenciales ya que el agua actúa como una barrera para evitar el sobrecalentamiento. La ventaja de esta técnica es que el material requerido se puede destilar a una temperatura por debajo de 100 °C (Tongnuanchan y Soottawat, 2014)

La hidrodestilación es un proceso conocido y difundido mundialmente para obtener el aceite esencial de una planta aromática. Sin embargo, existen escasos estudios sistemáticos para conocer los fenómenos controlantes del proceso y permitan entenderlo física o químicamente, con los propósitos de controlar, simular y optimizar eficientemente.

4.7.3 Hidrodifusión asistida

La técnica de extracción es a través de microondas y gravedad se caracteriza por no necesitar disolventes añadidos y por llevarse a cabo a presión atmosférica, es así como, al elevar la temperatura de las moléculas de agua que se encuentran en el insumo mismo, produce efectos idénticos a los descritos en la hidrodifusión asistida, permitiendo que el agua eliminada transporte metabolitos bioactivos en su posición original, por efecto de la gravedad, la fase acuosa se escurre y se separa del equipo, en contraste con los métodos convencionales de calentamiento en los métodos asistidos por microondas, el calor se genera en el interior del material y luego se propaga hacia el exterior (Rodríguez, 2021).

4.7.4 Destilación a vapor

La destilación es una técnica que se utiliza para diversas finalidades; como a) separar una mezcla de líquidos que contiene solo una sustancia volátil o, en caso de múltiples sustancias volátiles, cuando el punto de ebullición de la sustancia más volátil difiere en al menos 80 °C de los demás componentes; b) para aislar sustancias insolubles en agua y ligeramente volátiles de otros productos no volátiles; c) separar dos líquidos, siempre que la temperatura de ebullición de ambos esté por debajo de la temperatura de descomposición química del producto y d)

separar líquidos volátiles con diferentes puntos de ebullición, aunque la diferencia entre ellos sea menor de 80 °C

4.7.5 Fluidos supercríticos

Un fluido en estado supercrítico se refiere a una sustancia que se encuentra en condiciones de temperatura y presión que superan su punto crítico termodinámico, y tienen la capacidad de comportarse de manera similar a un gas al difundirse a través de sólidos, al mismo tiempo que muestran la habilidad de disolver materiales como lo haría un líquido, además su densidad puede experimentar cambios notables con variaciones mínimas en la temperatura o la presión (Velasco et al., 2007). Estas características hacen que los fluidos supercríticos sean una opción atractiva como sustitutos de los solventes orgánicos en procesos de extracción.

Por dicha razón, se han considerado como un medio alternativo para la extracción de aceite esencial; puesto que, el dióxido de carbono (CO₂) es el fluido supercrítico más utilizado **debido a sus condiciones críticas; ya que, en condiciones de alta presión, el dióxido de carbono** se convierte en líquido, que puede ser utilizado como un medio muy inerte y seguro para extraer las moléculas aromáticas de materia prima (Tongnuanchan y Benjakul, 2014).

4.7.6 DPPH

El ensayo de eliminación de radicales DPPH 2,2-difenil-1-picrilidracilo fue introducido en 1958 por Blois y desde entonces ha sido ligeramente ajustado por varios investigadores lo que ha permitido que se convierta en uno de los métodos antioxidantes más comúnmente empleados en el análisis de muestras de plantas ya que el DPPH es un radical libre estable que reacciona con sustancias que pueden donar un átomo de hidrógeno y este procedimiento se fundamenta en la capacidad de eliminar el DPPH al añadir una especie radical o un antioxidante lo que lleva a la decoloración de la solución de DPPH (Bernal et al., 2020).

Es así como Sánchez-Moreno et al (1998) citado en Pérez (2007) fueron quienes posteriormente modificaron e introdujeron parámetros cinéticos como la EC50 que se refiere a la cantidad de antioxidante necesaria para reducir en un 50% la cantidad inicial de radical por otro lado el tEC50 se define como el tiempo necesario para que esa misma concentración reduzca en un 50% la cantidad inicial de radical y finalmente la eficiencia antirradicálica como se indica en la figura 2, AE se calcula como 1 dividido entre el producto de EC50 y tEC50 considerando ambos factores de manera conjunta lo cual es importante ya que a mayor AE el antioxidante ejercerá su acción con una menor concentración y en un tiempo reducido lo que resulta particularmente beneficioso en sistemas biológicos no obstante cuando los antioxidantes se utilizan como aditivos alimentarios el objetivo puede cambiar hacia mantener su acción durante un período prolongado de tiempo por lo que en estos casos sería necesario considerar ambos factores de forma independiente.

Figura 2

Fórmula para cálculo de eficiencia antirradical.

$$EA = 1/EC_{50} TE_{C50}$$

Nota. La figura muestra la fórmula para calcular la eficiencia antirradical (EA) que combina tanto EC50 como TEC50 tomado de Perez,2007.

4.7.7 Polifenoles totales

Los polifenoles son un conjunto de compuestos químicos presentes en las plantas y se distinguen por contener múltiples grupos fenol en su estructura molecular. La mayoría de los polifenoles se encuentran en los alimentos en formas que no se pueden absorber como ésteres glucósidos o polímeros su capacidad para modular la actividad de diferentes enzimas e interferir en mecanismos de señalización y en distintos procesos celulares puede atribuirse al

menos en parte a las características fisicoquímicas de estos compuestos que les permiten participar en diversas reacciones metabólicas celulares de óxido-reducción las propiedades antioxidantes de los polifenoles explican muchos de sus efectos beneficiosos esta revisión proporciona información sobre el origen la estructura y la distribución de los polifenoles además se incluyen algunos datos actuales sobre la biodisponibilidad de estos compuestos y se recopilan los estudios más recientes que respaldan sus efectos beneficiosos a nivel cardiovascular (Quiñones et al., 2012)

4.8 Técnicas de análisis

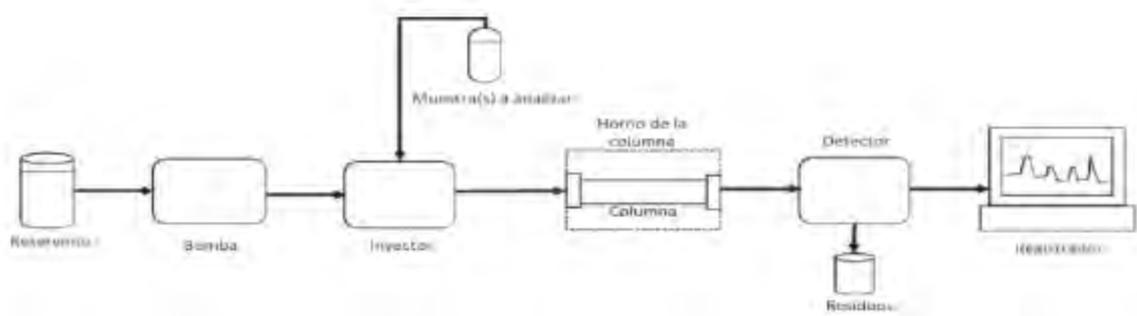
4.8.1 Cromatografía líquida

La HPLC es una de las técnicas ampliamente utilizadas, debido a que es capaz de separar componentes de diferente naturaleza en una mezcla, es por ello que sus aplicaciones industriales abarcan campos como la farmacéutica, la bioquímica, la industria alimentaria, la química industrial, la medicina clínica y la química forense; sin embargo, debido a la diversidad de aplicaciones, la elección de un proceso de separación HPLC puede ser desafiante, especialmente para aquellos que se están familiarizando con esta técnica por primera vez (Suarez y Morales, 2018) pero tiene un alto costo, requiere utilizar una gran cantidad de disolventes orgánicos caros, la dependencia de una fuente de energía y la necesidad de mantenimiento regular (Kumar,2023).

De la misma forma, Samaniego et al. (2021) enfatiza que esta técnica ofrece una amplia gama de aplicaciones y, al ser una técnica automatizada, permite un análisis rápido y eficaz de la separación, medición y detección de las muestras al identificar picos en los cromatogramas. Estos picos pueden ser optimizados al ajustar varias variables del método, como el pH de la fase móvil, la concentración del buffer, el flujo, la temperatura de la columna y la longitud de onda del detector, entre otros.

Figura 3

Diagrama básico de un cromatógrafo líquido de alto rendimiento



Nota. Tomado de Suarez y Morales (2018)

En la HPLC, se emplea un reservorio para contener el disolvente, que consiste en una mezcla de componentes líquidos, tanto polares como no polares, cuyas proporciones varían en función de la muestra analizada; una bomba, utilizada para succionar el disolvente desde el reservorio y forzar su paso a través del sistema, incluyendo la columna y el detector; el inyector de muestra, que puede ser manual o automático, tiene la tarea de inyectar el disolvente con alta precisión y reproducibilidad; las columnas, generalmente fabricadas en acero inoxidable, varían en longitud entre 50 y 300 mm y tienen un diámetro interno de 2 a 5 mm. Están rellenas de una fase estacionaria con partículas de 3 a 10 μm ; el detector, ubicado al final de la columna, detecta los analitos a medida que salen de la columna y puede ser de varios tipos, como UV, fluorescencia, espectrometría de masas y electroquímicos. Por último, el registrador, recopila las señales del detector que pueden variar en complejidad, desde registradores gráficos hasta integradores electrónicos, y finalmente, se procesan y presentan en un cromatógrafo fácil de leer e interpretar (Suarez y Morales, 2018).

4.8.2 Espectrómetro de masas

La espectrometría de masas es una técnica utilizada para determinar las estructuras químicas de compuestos orgánicos. su uso se extiende a áreas como la Química Inorgánica, la

Biología, la Bioquímica, la Medicina, entre otras. Cuando se combina con técnicas de separación, como cromatografía o electroforesis, se puede analizar mezclas de componentes separados previamente (Pomilio et al., 2011).



CAPÍTULO V: METODOLOGÍA

5. Metodología

Se emplearon dos técnicas de extracción, las cuales son: a) Extracción por Hidrodestilación, b) Extracción por Fluidos Supercríticos (EFS). Se caracterizó con dos ensayos los cuales son c) DPPH y d) Polifenoles Totales. A continuación, se detallarán cada una de ellas:

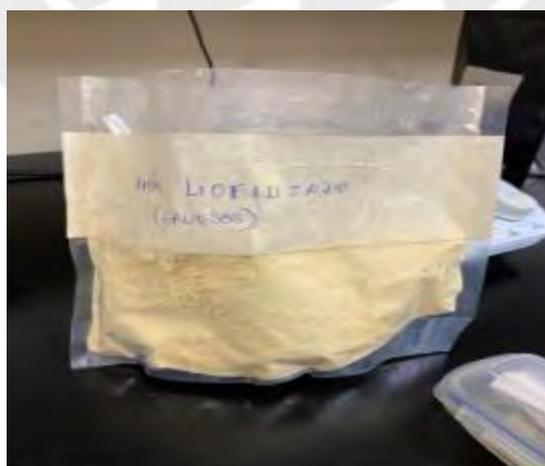
5.1 Extracción por Hidrodestilación

5.1.1 Preparación de muestras

Las muestras estaban preparadas por protocolo establecido por Laboratorio de Procesos Industriales, que consiste de: los rizomas de kion estuvieron liofilizados (Figura 4), filtradas y almacenadas congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Figura 4

Muestra de kion liofilizado.

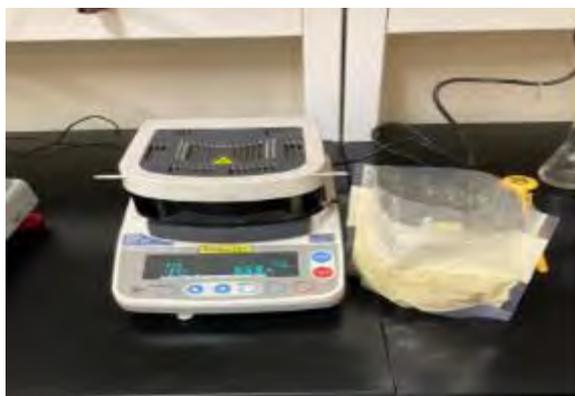


Nota. La figura enseña la muestra liofilizada de kion, así mismo, se ve su color blanquecino amarronado y tamizado.

Para extracción de los aceites se empleó los siguientes equipos: medidor de humedad (Figura 5) para controlar la humedad de las muestras.

Figura 5

Medidor de humedad.



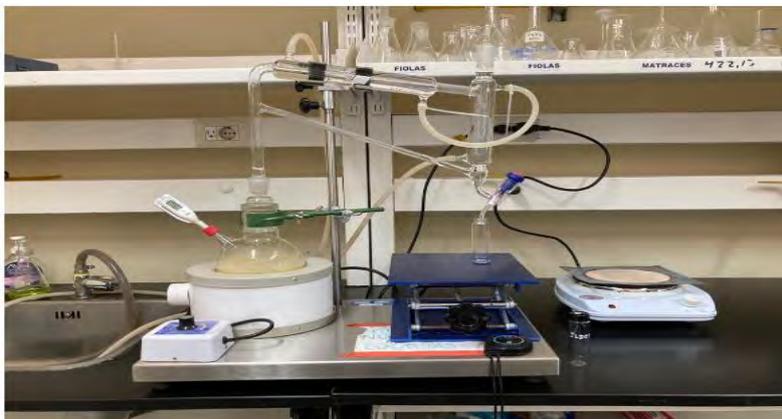
Nota. La figura enseña el equipo de análisis de humedad con el cual se trabajó en el laboratorio de procesos industriales.

5.1.2 Extracción de aceites esenciales de kion

Cada muestra de kion liofilizada (15 gramos) se mezclaron con 400 mL de agua bidestilada y perlas de vidrio y se permitió destilar durante 4 horas (Figura 6). Durante la extracción se recolecta agua cada cierto tiempo en el vial donde se va a recuperar el aceite esencial. Dicho vial se lo coloca en la hornilla (Figura 7) para que no pierda su temperatura y después de unos minutos se lo vuelve a introducir al balón de destilación. Este procedimiento se repite hasta obtener el producto final que es el aceite esencial. Las fracciones de aceites se observaron a temperatura de 99 °C.

Figura 6

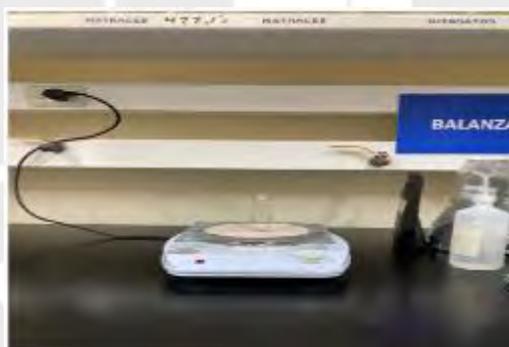
Equipo de hidrodestilación.



Nota. La figura enseña el sistema ensamblado para realizar el procedimiento de arrastre de vapor en donde se puede observar el calefactor, muestra, termómetro digital, refrigerante y colector de muestra. Y cuando alcanza una temperatura de 99 °C.

Figura 7

Hornilla.



Nota. La figura enseña la hornilla con la cual se trabajó en el laboratorio de procesos industriales.

El ensayo de hidrodestilación se repitió tres veces para obtener mejor rendimiento de producto final.

5.2 Extracción por Fluidos Supercríticos (EFS)

EFS se realizó en el equipo extractor de fluido supercrítico de la marca SUPERCRITICAL FLUID TECHNOLOGIES, INC. Modelo SFT – 150 SFE SYSTEM (mirar Figura 8).

5.2.1 Materiales empleados:

- 1) Balanza analítica.
- 2) Equipo de Fluidos supercríticos
- 3) Tanque de CO₂
- 4) 2 viales transparentes
- 5) 1 vial ámbar
- 6) Saco de extracción
- 7) Tela para asegurar el saco de extracción
- 8) Grasa especial

5.2.2 Preparación de la muestra

Las muestras estaban preparadas por protocolo establecido por Laboratorio de Procesos Industriales, que consiste de: los rizomas de kion estuvieron liofilizadas (Figura 4), filtradas y almacenadas congeladas a -80 °C. Para extracción de los aceites por este método se empleó los siguientes equipos: Equipo de Fluidos Supercríticos (Figura 8), Balanza analítica (Figura 9), tanques de CO₂, tres viales (Figura 10), saco de extracción (Figura 5) y grasa especial (Figura 5).

Figura 8

Equipo EFS



Nota. Las figuras muestran el equipo extractor de fluido supercrítico de la marca SUPERCritical FLUID TECHNOLOGIES, INC. Modelo SFT – 150 SFE SYSTEM.

Cada muestra de kion liofilizada (1 g, 30 g en total), bajo condiciones de humedad reportado en el capítulo 5.1.1 se les realizó EFS. Se rotularon 3 viales (principal, trampa y limpieza) de los cuales 1 es de color ámbar (trampa) y están rotulados para efectos de este ensayo de la siguiente manera (Figura 11):

1. JL01R2 (Jengibre Liofilizado 1 replica 2)
2. L2J (Limpieza 2 jengibre)
3. T2 de color ámbar (Trampa 2 Jengibre)

Figura 9

Viales usados en EFS.



Nota. La figura muestra los viales que se usan en la extracción por fluidos supercríticos que de izquierda a derecha consta vial de limpieza, vial para jengibre liofilizado y vial color ámbar trampa.

Para pesar el saco de extracción (Figura 9) primero se limpia y se pesa un biquel pequeño el cual se encera, luego se procede a colocar dentro del biquel el saco de extracción y se procede a pesar aproximadamente 30 gramos de muestra de jengibre liofilizado. La muestra dentro del saco de extracción debe ser manualmente compactada y homogeneizada con presión manual. El saco de extracción debe estar cerrado de forma segura. Para ensayo I se utiliza una presión de 80 bar y una temperatura de 45°C. Para ensayo II se utiliza una presión 100 bar y una temperatura de 45°C. Para ensayo III se utiliza una presión 100 bar y una temperatura de 45°C. Es importante tener la precaución de limpiar bien las piezas lo cual puede realizarse con alcohol y la tapa rosca del reactor donde va colocada la muestra debe colocarse una grasa especial para que al final de corrida (3 horas) pueda desarmarse el reactor o contenedor de la muestra. Así

mismo tener la precaución de limpiar el interior del reactor con una varilla metálica envuelta en papel toalla. Se debe lubricar la tapa del reactor (aprox. 1 cm desde abajo hacia arriba) se procede a introducir la muestra en esta oportunidad se coloca con el lazo con el que se hizo el nudo del saco de extracción hacia arriba y se cierra el reactor.

Figura 10

Saco de extracción



Nota: La figura muestra saco de extracción con 30 gramos de muestra de jengibre liofilizado debidamente asegurado con un retazo de tela antes de introducirlo en el reactor del extractor de EFS.

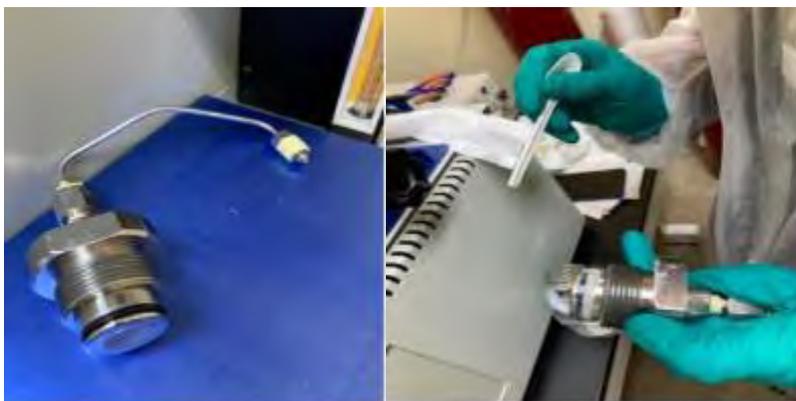
Se procede a cerrar el reactor de forma hermética cuya tapa ha sido previamente engrasada y se toma la precaución de colocar cinta de teflón en el otro extremo de la tubería que conecta el reactor con el equipo de EFS. La compuerta del equipo se cierra la válvula DINAMIC STATIC VALVE.

El vial principal y la vial trampa se adaptan al equipo y se colocan en un baño de hielo. Después de 5 minutos se procede a abrir las válvulas de aire y de CO₂ del equipo.

Al inicio se obtuvo una extracción estática y luego dará inicio la extracción dinámica en base a los parámetros de presión y temperatura establecidos.

Figura 11

Tapa del reactor



Nota. Las figuras muestran cómo se debe engrasar la tapa del reactor para poder realizar un cierre hermético. La grasa empleada para este efecto se llama meets mil-prf907e jet-lube white knight food grade anti-seize.

Se establece la temperatura en base a las condiciones que se desean analizar (Tabla de resultados 8 en capítulo 6). El flujo de CO₂ se regula con las válvulas VESSEL PRESSURE REGULATOR y el RESTRICTOR VALVE. Se establece las condiciones deseadas de presión y temperatura abriendo la válvula DINAMIC STATIC VALVE y se inicia el cronometro para proceder con la primera pesada a los 10 minutos. Es importante durante el proceso, al pesar el vial, tener la precaución de secarlo bien antes de retirar el vial del equipo y llevarlo a la balanza, así como cerrar la válvula (DINAMIC STATIC VALVULE) y cuando se vuelva a colocar el vial para que continúe la extracción hay que abrir la válvula antes mencionada.

El flujo de CO₂ se ajusta con la ayuda del VESEL PRESSURE REGULATOR y el RESTRICTOR VALVE sobre todo con este último. Para apagar el equipo y finalizar el ensayo se cierran las válvulas desde el equipo las cuales son AIR SUPPLY VALVE, CO2 SUPPLY VALVE, VESSEL PRESURE REGULATOR y posteriormente las válvulas de aire (pared) y CO2 (tanque). Para despresurizar se debe abrir la válvula DYNAMIC STATIC VALVE y la válvula RESTRICTOR VALVE. Finalmente se apaga el equipo.

El ensayo de EFS se repitió tres veces para obtener mejor rendimiento de producto final.

Figura 12

Reactor más saco de extracción.



Nota. La figura muestra la forma correcta de introducir el saco de extracción con muestra de kion liofilizado en el reactor del extractor del equipo de EFS.

Figura 13

Reactor más saco de extracción vista superior.



Nota: La figura muestra una vista superior del reactor y el saco de extracción.

Figura 14

Ensamble de los viales.



Nota. La figura muestra cómo debe colocarse los viales en el equipo de extracción por EFS y recibir el extracto a bajas temperaturas para evitar pérdidas del aceite esencial de kion.

5.3 Ensayo DPPH

5.3.1 Materiales empleados:

1. Acido gálico
2. Metanol
3. Solución DPPH
4. Aceite comercial de kion marca EOP
5. Espectrofotómetro Genesys 105 UV-VIS

5.3.2 Curva de calibración:

Para este ensayo se realizó una solución de ácido gálico en metanol, concentración 0.05 mg/mL, para lo cual se disolvieron 0.005 g de ácido gálico en 100 mL de metanol y así obtenemos nuestra solución madre. A partir de esta solución realizamos diluciones sucesivas tal como se explica en la tabla 3.

Tabla 3.

Preparación de las soluciones curva DPPH.

	mg /mL Solución madre	Volumen solución madre (mL)	Metanol (mL)	Volumen total (mL)
C1	0,005	1	9	10
C2	0,010	2	8	10
C3	0,015	3	7	10
C4	0,020	4	6	10
C5	0,025	5	5	10
C6	0,030	6	4	10
C7	0,035	7	3	10
C8	0,040	8	2	10
C9	0,045	9	1	10
C10	0,050	10	0	10

Nota. La tabla muestra las diluciones realizadas a partir de la concentración de 0.05 mg/mL.

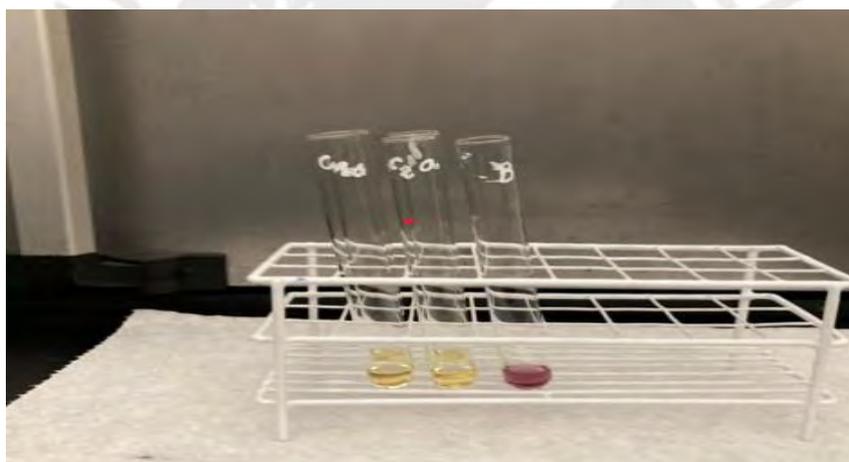
A continuación, se procedió a la preparación de una solución de DPPH en metanol de concentración 0.05 mM, para lo cual se disolvió 0.0197 g de DPPH en 100 mL de metanol. Para este ensayo es importante proteger los tubos de ensayos con papel de aluminio.

La solución de DPPH (0.4 mL, este caso corresponde a C1 y C2, Tabla 3) en metanol se agregó a la solución standard (2 mL) de ácido gálico. Como blanco se utilizó metanol puro. La mezcla se agitó en vórtex y se dejó reposar durante 30 minutos.

Las soluciones C1 y C2 (por duplicado, Figura 15) se midió en el espectrofotómetro a 517 nm. Los resultados obtenidos para muestras C1a, C1b, C2a, C2b se presentan en la tabla 11 en capítulo VI.

Figura 15

Ensayo DPPH



Nota. La figura muestra decoloración de las soluciones C1 y C2 de DPPH con ácido gálico. La medición se realizó por duplicado.

5.3.3 Análisis del aceite de jengibre comercial.

Para la prueba de DPPH se realizaron tres ensayos con aceite de kion comercial marca EOP para lo cual se pesaron 0.1900 g, 0,1902 g y 0.1900 g y cada una fue diluida en 10 mL de metanol. En cada ensayo se realizó las diluciones que se detallan en la tabla 4.

Tabla 4

Diluciones para ensayo DPPH.

	mg/ml	Volumen ml	Metanol ml	Volumen total
C1	19			
C2	9.50	2.5	2.5	5 ml
C3	4.75	1.25	3.75	5 ml
C4	2.375	0.625	4.375	5 ml
C5	1.117	0.315	4.685	5 ml

Nota. La tabla enseña las diluciones del aceite esencial comercial EOP de kion en metanol.

En cada prueba se realizaron las siguientes diluciones en tubos de ensayo en donde se colocaron 0.4 mL DPPH en metanol, luego se añadió 2 mL de las soluciones muestras de aceite esencial comercial diluidas en metanol. Trabajamos con C1, C2, C3, C4 y C5 se agitó en vórtex y se dejó en reposo de 30 minutos. La lectura se la realizó en el espectrofotómetro a 517 nm por duplicado (Figura 16). El blanco empleado fue metanol.

Figura 16

Equipo espectrofotómetro.



Nota. La figura muestra el espectrofotómetro Genesys 105 UV-VIS usado en el ensayo de DPPH.

Observaciones: para la muestra de jengibre liofilizada (0.096 g) se recomienda usar papel de aluminio para proteger los tubos de vidrio o de plástico.

El rendimiento de inhibición se calculó por medio de la siguiente formula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Abb blanco} - \text{Abb muestra}}{\text{Abb blanco}} \times 100$$

5.4 Determinación de polifenoles totales.

5.4.1 Materiales empleados

1. Acido gálico
2. Agua ultra pura
3. Solución de Na₂CO₃ 7.5%
4. Solución de Foling (1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sodio)
5. Espectrofotómetro Genesys 105 UV-VIS

5.4.2 Curva de calibración:

0,1250 g de ácido gálico se disuelven en agua ultrapura (100 mL) hasta una concentración de 1250 µg/mL. Se agregó la solución de Na₂CO₃ (7.5%, 2 mL) seguido de la solución de Foling (10 veces diluida, 2.5 mL).

5.4.3 Procedimiento:

En un tubo de ensayo cubierto con papel de aluminio se agregó 0.5 mL de la solución standard / agua UP (Blanco). Preparación de soluciones se muestra en tabla 5. A continuación, se agregó la solución de Foling (2.5 mL). Después de agitar en un vórtex se agregó la solución de carbonato de sodio (7.5%, 2.0 mL). La mezcla resultante se agitó en un vórtex y se calentó en el baño termostático a 45 °C por 15 minutos seguido se procedió a enfriar a 30 °C y a filtrar

(Figura 17). Todas las muestras fueron analizadas en el espectrofotómetro a 765 nm. (Los resultados se muestran en tabla 14 capítulo VI)

Tabla 5

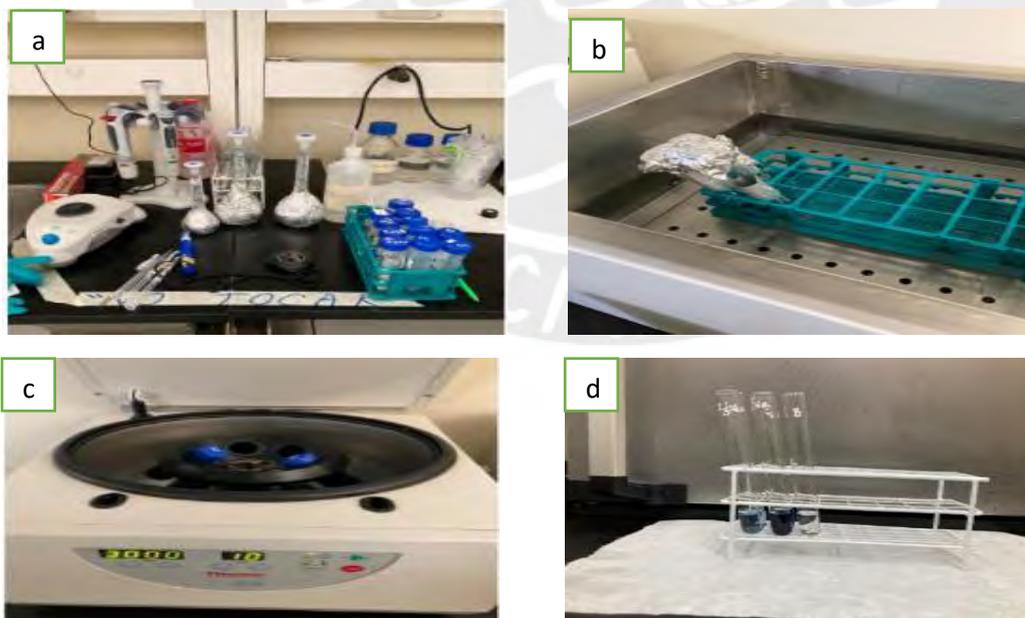
Preparación de soluciones curva Polifenoles totales

Conc.	µg/mL.	VOL SOL MADRE mL.	AGUA UP mL.
C ₁	2	0.016	9.94
C ₂	10	0.080	9.92
C ₃	25	0.200	9.80
C ₄	50	0.400	9.60
C ₅	75	0.600	9.40
C ₆	100	0.800	9.20
C ₇	150	1.200	8.80
C ₈	200	1.600	8.40

Nota. Cada una de las soluciones preparadas fueron llevadas a un volumen total de 10 mL y posteriormente agitadas en un vórtex.

Figura 17

Soluciones y equipos empleados en Polifenoles totales.



Nota. 17a) Reactivos empleados para polifenoles totales, 17b) Baño termostático marca Thermo Scientific, 17c) Centrifuga Thermo Scientific CL 10 y 17d) Ensayo para curva de calibración.

5.4.4 Análisis aceite comercial de jengibre

Se disuelve el aceite comercial de jengibre (0.0040 gramos) en etanol al (70%, 3 mL), resultando 1.3 mg /mL. La mezcla resultante se agitó en vórtex seguido de centrifugarse (3000 rpm por 10 minutos). A el sobrenadante (0.5 mL) se adiciona solución de Folin (2.5 mL) y se agita en un vórtex. Se adiciona la solución de carbonato de sodio (2.0 mL) y se agita nuevamente en el vórtex. La mezcla resultante se calienta en baño termostático a 45°C por 15 minutos. Seguido enfriar a 30°C y filtrar (Figura 18). Como blanco se utilizó agua UP. Todas las muestras fueron analizadas en el espectrofotómetro a 765 nm. (Los resultados se muestran en tabla 15 capítulo VI).

Figura 18

Ensayo de polifenoles totales.



Nota. La figura muestra el ensayo de polifenoles totales realizado a una muestra de aceite esencial comercial de kión.

5.5 Análisis por cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas (LC-MS)

Los aspectos clave para la configuración instrumental, preparación de muestras y procesamiento de datos se detallan a continuación.

5.5.1 Materiales empleados

Para este análisis por LC-MS se analizaron 86 muestras obtenidas de extracción bajo diferentes condiciones de presión y temperatura en la etapa de extracción supercrítica (Tabla 6). Todas las muestras fueron diluidas en un factor de 1:1000 en mezcla metanol - agua (1:1) a partir de su solución madre (2mg), con excepción de la muestra de mezcla de estándares comerciales (6-shogaol y 10-gingerol, 1:1) cual se analizó diluida a 1:10000.

Los lotes de muestras obtenidas se colocarán en viales de vidrios, sellados y protegidos de la luz para evitar fotosensibilidad y almacenaron en el ultracongelador (-20 °C).

Los solventes para análisis de grado de pureza UHPLC-MS se adquirieron de Merck (Santiago, Chile). Se obtuvo agua ultrapura de un sistema de purificación de agua Millipore (Milli-Q Merck Millipore, Chile). El estándar 6-Shogaol y el estándar de 10-Gingerol fueron comprado de Merck Peruana S.A. (Lima, Perú).

Tabla 6

Identificación de las muestras para EFS.

Nombre de muestra	Temperatura de extracción, °C	Presión de extracción, bar	Número de repetición/Lote	Tipo de muestra
T40P80R1	40	80	½	Aceite esencial
T40P80R2	40	80	2/2	Aceite esencial
T40P80R3	40	80	3/2	Aceite esencial
T40P80R4	40	80	4/2	Aceite esencial
T40P100R1	40	100	½	Aceite esencial
T40P100R2	40	100	2/2	Aceite esencial
T40P100R3	40	100	3/2	Aceite esencial
T40P150R1	40	150	½	Oleoresina
T40P150R2	40	150	2/2	Oleoresina

T40P150R3	40	150	3/2	Oleoresina
T40P200R1	40	200	1/2	Oleoresina
T40P200R2	40	200	2/2	Oleoresina
T40P200R3	40	200	3/2	Oleoresina
T40P250R1	40	250	1/2	Oleoresina
T40P250R2	40	250	2/2	Oleoresina
T40P250R3	40	250	3/2	Oleoresina
T40P250R4	40	250	4/2	Oleoresina
T45P80R1	45	80	1/1	Aceite esencial
T45P100R1	45	100	1/1	Aceite esencial
T45P100R2	45	100	2/2	Aceite esencial
T45P100R3	45	100	3/2	Aceite esencial
T45P100R4	45	100	4/2	Aceite esencial
T45P150R1	45	150	1/1	Oleoresina
T45P150R2	45	150	2/2	Oleoresina
T45P150R3	45	150	3/2	Oleoresina
T45P200R1	45	200	1/1	Oleoresina
T45P200R2	45	200	2/2	Oleoresina
T45P200R3	45	200	3/2	Oleoresina
T45P250R1	45	250	1/1	Oleoresina
T45P250R2	45	250	2/2	Oleoresina
T45P250R3	45	250	3/2	Oleoresina
T50P100R1	50	100	1/1	Aceite esencial
T50P100R2	50	100	2/2	Aceite esencial
T50P100R4	50	100	4/2	Aceite esencial
T50P150R1	50	150	1/1	Oleoresina
T50P150R2	50	150	2/2	Oleoresina
T50P150R3	50	150	3/2	Oleoresina
T50P200R1	50	200	1/1	Oleoresina
T50P200R2	50	200	2/2	Oleoresina
T50P200R3	50	200	3/2	Oleoresina
T50P250R1	50	250	1/1	Oleoresina
T50P250R2	50	250	2/2	Oleoresina
T50P250R3	50	250	3/2	Oleoresina

Nota. La tabla enseña las condiciones de presión y temperatura a las cuales se trabajaron las muestras durante el proceso de extracción por EFS.

5.5.2 Cromatografía líquida

Los perfiles químicos de aceites y oleoresina de jengibre fueron analizados en el equipo de HPLC acoplado con espectrómetro de masas. Este equipo que se usó tenía el sistema UHPLC Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 combinado con equipo de espectrometría de masas tandem q-Exactive HF de Thermo Scientific (Figura 19).

Figura 19

Equipo UHPLC-MS.



Nota. La figura muestra el equipo de HPLC que tiene sistema UHPLC Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 combinado con equipo de espectrometría de masas tándem q-Exactiva HF de Thermo Scientific.

La cromatografía líquida se realizó utilizando una columna UHPLC C18 (Accucore, 150 mm × 4,6 mm ID, 2,5 μm , Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania) a 40 °C. Fases móviles fueron solución acuosa fórmica al 0.1% (A) y metanol (B). El programa de gradiente (tiempo (min), % B) fue: (0→3, 50); (3→33, 50→100); (33→38, 100), 38→43, 100→50), (43→48, 50) y 15 min para equilibrar la columna antes de cada inyección. Las condiciones de cromatógrafo LC se ajustó el flujo a 0,7 mL/min y la inyección el volumen fue de 10 μL . Los estándares y los extractos disueltos se mantuvieron a 10 °C durante el almacenamiento en el automuestreador. La muestra de control (blanco) se midió después de cada dos muestras de extracción para evitar la sobrecarga de la columna.

5.5.3 Espectrometría de masas (MS)

El equipo de espectrometría de masas tándem fue un q-Exactiva HF de Thermo Scientific (Figura 70) acoplado con una bomba de jeringa que introducía la muestra a un flujo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Para los ensayos se emplearon como fuente de ionización una fuente de HESI (Heated ElectroSpray) y una fuente APPI (fotoionización a presión atmosférica) que ha demostrado ser particularmente valiosa en análisis de compuestos no polares y aromáticos. Para preevaluar las muestras y definir tentativamente el mejor método de extracción (muestras que contienen la mayor cantidad de compuestos de interés) las muestras fueron introducidas sin tener una separación de cromatografía previa, utilizando método Direct Injection. Considerando el tamaño (rango de masas de las muestras) y su polaridad, se elegirá inicialmente la técnica de ionización de electrospray (HESI) para su detección. Sin embargo, debido a la baja estabilidad del 6-gingerol en condiciones de HESI, se utilizó adicional la fuente de ionización APPI (fotoionización a presión atmosférica ionización). Para optimizar las condiciones óptimas de visualizar los compuestos deseados las muestras se analizaron en modo positivo y modo negativo. Al final se realizó un primer estudio PCA (de inglés, principal component analysis) para ver qué condiciones de extracción contenían la mayor cantidad de 6-shogaol, y 6-gingerol. Aquellas muestras que tengan mayor cantidad de 6-shogaol y 6-gingerol, serán elegidas para analizarlas por LC-HESI-MS y LC-APPI_MS.

5.5.4 Análisis de datos

Se hizo un análisis no dirigido de los cromatogramas obtenidos, donde se buscaron todos los compuestos presentes en cada muestra. Después de obtener los cromatogramas y los espectros de cada muestra, las señales se integraron utilizando el software Xcalibur (Enhanced ChemStation, suministrado por la compañía Agilent Technologies) para extraer los tiempos de retención y las señales del espectro de masas para cada muestra seleccionada. En una hoja de cálculo de excel, se insertaron los datos de cada muestra, donde se especificaba el tiempo de retención (minutos), el área de integración de la señal, el compuesto según la librería NIST, el peso molecular y la fórmula molecular.

Para filtrar los compuestos presentes en las muestras se aplicó el siguiente algoritmo: (i) eliminar señales que estén asociadas con el ruido técnico (señales instrumentales no deseadas), y (ii) diferenciar señales de interés del ruido biológico (señales provenientes de las muestras que no estén relacionadas con la pregunta de interés).

Luego, se obtuvieron las intensidades relativas de cada fragmento molecular de cada compuesto marcador en el cromatograma de iones extraídos (EIC). Cada uno de los valores de las intensidades relativas eran divididos por la suma total de las intensidades de todos los fragmentos moleculares presentes en todo el espectro de masas de cada muestra medida. La suma total de estos fragmentos moleculares fue obtenida por el cromatograma de la corriente iónica total (TIC). Los valores obtenidos, luego de este primer paso de procesamiento de señales, fueron transformados a escala logarítmica porque los valores eran muy pequeños. Cada valor logarítmico era restado por el menor valor logarítmico de toda la matriz. Después se obtenía una nueva matriz con los datos que resultaron de la resta y, se sacó el promedio de estos datos por cada conjunto de muestras. Finalmente, se seleccionaron los valores de uno de los dos fragmentos moleculares, de cada compuesto marcador, que tenía una desviación estándar relativa menor y, con esos datos seleccionados se armó la matriz final de valores.

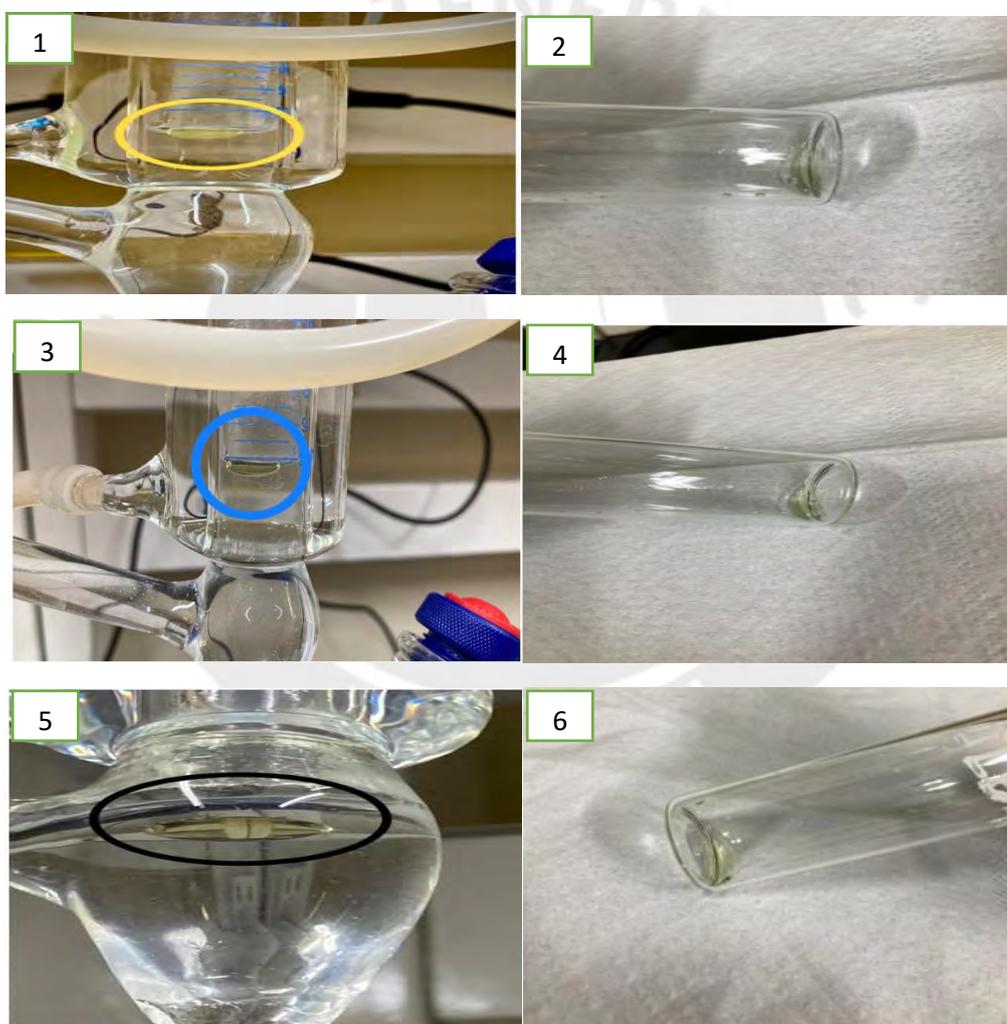
CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1. Resultados de extracción por hidrodestilación

En el ensayo de extracción por hidrodestilación resultó en aceite esencial de jengibre como líquido denso de color transparente hasta un color amarillo (Figura 20). Se observó que condiciones de ensayo 1 ofreció mejor rendimiento (Tabla 7) probablemente debido a condiciones del ambiente de trabajo.

Figura 20

Ensayos de hidrodestilación



Nota. Las figuras muestran: ensayo I (Figuras 1 y 2), ensayo II (Figuras 3 y 4) y ensayo III (Figuras 5 y 6) de hidrodestilación.

Tabla 7*Cálculos de rendimientos para hidrodestilación.*

JENJIBRE LIOFILIZADO DESTILACION (JLD)			
ENSAYOS	I	II	III
Masa muestra	15 gramos	15 gramos	15 gramos
Humedad 1	6,98 %	9,31 %	6,98 %
Humedad 2	7,53 %	7,16%	7,53 %
Humedad promedio MP	7,26 %	8,24 %	7,26 %
Relación muestra/agua	1:27	1:27	1:27
Tiempo de operación	4 hora	4 hora	4 hora
Masa del vial	22,3929 gramos	22,2538 gramos	22,3508 gramos
Masa de vial + aceite	22,5096 gramos	22,3263 gramos	22,4354 gramos
Rendimiento	0,84	0,53	0,61
Cálculos de rendimiento	Ensayo I	Ensayo II	Ensayo III
Muestra base húmeda	15 gramos	15 gramos	15 gramos
Masa de agua	1,089 gramos	1,236 gramos	1,089 gramos
Muestra en base seca	13,911 gramos	13,764 gramos	13,911 gramos
Rendimiento (%)	0,84	0,53	0,61 %

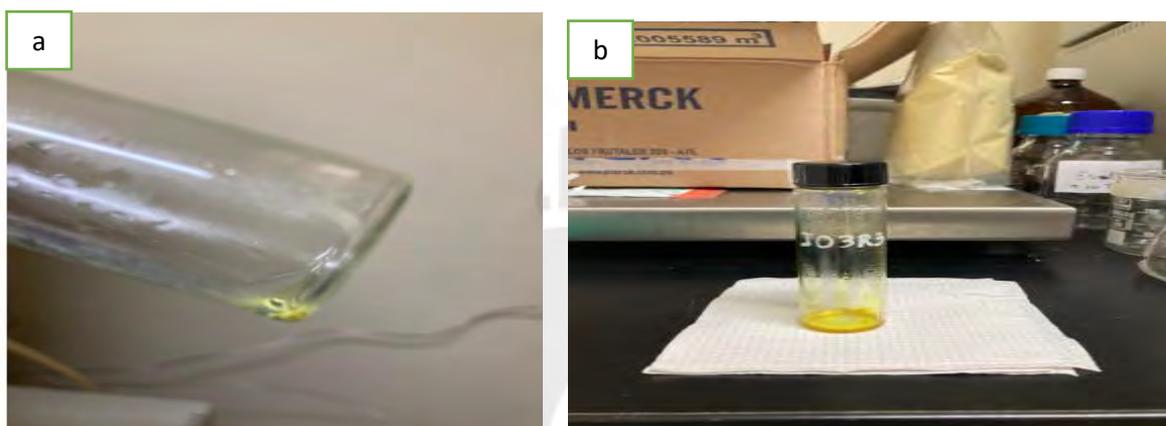
Nota. La tabla muestra los cálculos de rendimiento de los ensayos de hidrodestilación.

6.2 Resultados de la Extracción por Fluidos Supercríticos

En el ensayo de extracción por EFS resultó en aceite esencial de jengibre como líquido denso de color amarillo (Figura 21). Se observó que condiciones de ensayo 3 ofreció mejor rendimiento. Las condiciones de los ensayos se presentan en las tablas 8 y 9. Los resultados de los ensayos 1- 3 se presenta en tabla 10.

Figura 21

Aceite esencial de jengibre obtenido por EFS



Nota. La figura 17a y 17b muestra obtención final de aceite esencial de jengibre por EFS.

Tabla 8

Parámetros para EFS.

Jengibre Liofilizado	Ensayo I	Ensayo II	Ensayo III
Masa Vial	22,4216 g	22,8140 g	22,4533
Masa vial trampa CO ₂	26,5918 g	26,5941 g	26,6091
Masa vial Limpieza	22,4574	22,4576	22,4696
Humedad 1	5.30 %	6,91%	5,16 %
Humedad 2	6.74 %	6,06%	6,25 %
Humedad promedio MP	6.02 %	6,48%	5,71 %
Masa muestra	30,0048 g	30,0059 g	30,0035 g
Masa saco de extracción	2,6541 g	2,6717 g	2,7453
Presión	80 bar- 1160,3 psi	100 bar-1450,38 psi	150 bar- 2175,6 psi
Temperatura	45 °C	45 °C	45 °C
Tiempo inicial extracción	10 minutos	10 minutos	10 minutos
Flujo de CO ₂	2 ft/hr	2 ft/hr	2 ft/hr

Nota. La tabla muestra los parámetros con los cuales se realizaron las extracciones por fluidos supercríticos.

Tabla 9*Masa de aceite esencial de kion.*

EFS	Ensayo I	Ensayo II	Ensayo III
Tiempo de extracción (min)	Masa aceite de kion acumulado (g)	Masa aceite de kion acumulado (g)	Masa aceite de kion acumulado (g)
0	0	0	0
10	0,0206	0,0328	0,0338
20	0,0272	0,0400	0,0520
30	0,0309	0,0500	0,0753
40	0,0313	0,0553	0,0974
50	0,0329	0,0734	0,1209
60	0,0350	0,0734	0,1374
70	0,0366	0,0771	0,1561
80	0,0369	0,0830	0,1579
90	0,0384	0,0928	0,1772
100	0,0402	0,0978	0,1961
110	0,0394	0,1041	0,2105
120	0,0412	0,1084	0,2231
140	0,0415	0,1203	0,2521
160	0,0427	0,1293	0,2794
180	0,0451	0,1361	0,3011

Nota. La tabla muestra la cantidad de masa de aceite de kion acumulado durante el proceso por EFS.

Tabla 10

Cálculo de Rendimiento para EFS.

	Ensayo I	Ensayo II	Ensayo III
Masa base húmeda (g)	30,0048	30,0059	30,0035
Humedad (%)	6,02	6,48	5,71
Masa de agua (g)	1,8063	1,9444	1,7132
Masa base seca (g)	28,1985	28,0615	28,2903
Rendimiento %	0,16	0,49	1,06

Nota. La tabla muestra los datos para realizar el cálculo de rendimiento de los tres ensayos realizados por EFS.

6.3 Resultados de la extracción por DPPH.

Las soluciones C1 y C2 (por duplicado, Figura 15) se midió en el espectrofotómetro a 517 nm. Los resultados obtenidos para muestras C1a, C1b, C2a, C2b se presentan en la tabla 11

Tabla 11

Curva para DPPH

Medición de las absorbancias. $Abb_0 = 0.730$ (Absorbancia del blanco)

	a	b
C1	0.087	0.088
C2	0.091	0.091

Nota. Lectura en el espectrofotómetro Genesys 105 UV-VIS a 517 nm.

Figura 22

Ensayo de DPPH



Nota. Las figuras muestran la reducción del color púrpura intenso característico del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) ensayos a un color amarillo pálido de los ensayos a) I, b) II y c) III.

Cálculos:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Abb blanco} - \text{Abb muestra}}{\text{Abb blanco}} \times 100$$

Tabla 12

Datos ensayos de DPPH

	Ensayo I			Ensayo II			Ensayo III		
	Masa de aceite		0,1900 g	Masa de aceite		0.1902 g	Masa de aceite		0.1900 g
	Blanco (Ab)		0,706	Blanco (Ab)		1.109	Blanco (Ab)		0.517
	a	b	Promedio	a	b	Promedio	a	b	Promedio
C1	0.154	0.151	0,152	0.140	0.293	0,216	0.101	0.103	0.102
C2	0.170	0.170	0,170	0.244	0.219	0,231	0.101	0.102	0.101
C3	0,272	0,276	0,274	0.594	0.399	0,469	0.150	0.155	0.152
C4	0,419	0,399	0,409	0.899	1.077	0.988	0.254	0.279	0.266
C5	0,511	0,482	0.496	0.979	0.952	0.965	0.377	0.389	0.383

Nota. La tabla indica los datos de masa de aceite comercial de kion y absorbancias de los tres ensayos que se midieron por duplicado. Ensayo I masa del aceite 0.1900 gramos Absorbancia del blanco 0.706. Ensayo II masa del aceite comercial 0.1902 gramos. absorbancia del blanco 1,109. Ensayo III masa del aceite comercial 0,1900 gramos Absorbancia del blanco 0.517. Lecturas en absorbancia a 517 nm.

Para validar los datos obtenidos se realizó el análisis por DPPH de muestra del aceite comercial de kion. Se cálculo el porcentaje de inhibición de cada muestra y los resultados se presentan en tabla 13.

Tabla 13*Análisis por DPPH*

Porcentaje de inhibición	Ensayo I	Ensayo II	Ensayo III
Análisis del aceite comercial de kion	Porcentaje (%)	Porcentaje (%)	Porcentaje (%)
Porcentaje inhibición C1	78,47	80,52	80,27
Porcentaje inhibición C2	75,92	79,17	80,46
Porcentaje inhibición C3	61,19	57,71	70,60
Porcentaje inhibición C4	42,07	10,91	48,55
Porcentaje inhibición C5	29,74	12,98	25,92

Nota. La figura muestra los resultados obtenidos en una muestra de aceite comercial de jengibre.

6.4 Polifenoles Totales

El análisis de polifenoles totales se realizó para muestras de C3 y C6 y la presencia de polifenoles se registró empleando espectrofotómetro. Los resultados de absorbancia están presentados en tabla 14.

Tabla 14

Curva para Polifenoles totales.

Concentraciones	a	b
C3	0.340	0.338
C6	1.093	1.145

Nota. Análisis de espectrofotómetro de ensayo de determinación de Polifenoles Totales

Figura 23

Ensayo de Polifenoles Totales



Nota. La figura muestra reacción redox entre los polifenoles del aceite comercial de jengibre y el reactivo de Folin en condiciones alcalinas.

Para validar los datos obtenidos se realizó el análisis de Polifenoles Totales de muestra del aceite comercial de kion. Los resultados de inhibición se muestran en la tabla 15.

Tabla 15

Análisis de Polifenoles totales

MUESTRA	Masa gramos	C1a (Absorbancia)	C1b(Absorbancia)
ACEITE COMERCIAL	0.0040	0.099	0.109

Nota. La figura muestra los resultados obtenidos en una muestra de aceite comercial de jengibre.

6.5 Análisis por espectrometría de masas tándem (MS/MS)

Para poder determinar las mejores condiciones de la extracción de compuestos bioactivos, como son los hidrocarburos fenólicos sesquiterpénicos, se procedió a estudiar las muestras obtenidas en la etapa de extracción supercrítica a diferentes condiciones de presión y temperatura como se muestra en la Tabla 16.

Tabla 16

Condiciones de presión y temperatura (MS/MS)

Nombre de muestra	Temperatura de extracción, °C	Presión de extracción, bar	Número de repetición/ Lote	Tipo de muestra
T40P80R1	40	80	1/2	Aceite esencial
T40P80R2	40	80	2/2	Aceite esencial
T40P80R3	40	80	3/2	Aceite esencial
T40P80R4	40	80	4/2	Aceite esencial
T40P100R1	40	100	1/2	Aceite esencial
T40P100R2	40	100	2/2	Aceite esencial
T40P100R3	40	100	3/2	Aceite esencial
T40P150R1	40	150	1/2	Oleoresina
T40P150R2	40	150	2/2	Oleoresina
T40P150R3	40	150	3/2	Oleoresina
T40P200R1	40	200	1/2	Oleoresina
T40P200R2	40	200	2/2	Oleoresina
T40P200R3	40	200	3/2	Oleoresina
T40P250R1	40	250	1/2	Oleoresina
T40P250R2	40	250	2/2	Oleoresina
T40P250R3	40	250	3/2	Oleoresina
T40P250R4	40	250	4/2	Oleoresina
T45P80R1	45	80	1/1	Aceite esencial
T45P100R1	45	100	1/1	Aceite esencial
T45P100R2	45	100	2/2	Aceite esencial
T45P100R3	45	100	3/2	Aceite esencial

T45P100R4	45	100	4/2	Aceite esencial
T45P150R1	45	150	1/1	Oleoresina
T45P150R2	45	150	2/2	Oleoresina
T45P150R3	45	150	3/2	Oleoresina
T45P200R1	45	200	1/1	Oleoresina
T45P200R2	45	200	2/2	Oleoresina
T45P200R3	45	200	3/2	Oleoresina
T45P250R1	45	250	1/1	Oleoresina
T45P250R2	45	250	2/2	Oleoresina
T45P250R3	45	250	3/2	Oleoresina
T50P100R1	50	100	1/1	Aceite esencial
T50P100R2	50	100	2/2	Aceite esencial
T50P100R4	50	100	4/2	Aceite esencial
T50P150R1	50	150	1/1	Oleoresina
T50P150R2	50	150	2/2	Oleoresina
T50P150R3	50	150	3/2	Oleoresina
T50P200R1	50	200	1/1	Oleoresina
T50P200R2	50	200	2/2	Oleoresina
T50P200R3	50	200	3/2	Oleoresina
T50P250R1	50	250	1/1	Oleoresina
T50P250R2	50	250	2/2	Oleoresina
T50P250R3	50	250	3/2	Oleoresina

Nota. La tabla muestra las diferentes condiciones de presión y temperatura bajo las cuales estudiar las muestras obtenidas en la etapa de extracción supercrítica.

Figura 24

Muestras obtenidas por EFS.



Nota. La figura enseña muestras obtenidas por EFS que han sido diluidas con un factor de 1: 1000 (w:v), almacenadas a una temperatura -20 °C y empleadas para posteriores ensayos.

Para preevaluar las muestras y definir las condiciones de extracción (muestras que contienen la mayor cantidad de compuestos de interés, como se evidencia en la Tabla 17), todas 45 muestras con tres réplicas de cada una fueron analizadas, utilizando método Direct Injection. Considerando el tamaño y su polaridad así poder determinar que tipos de compuestos están presentes en los extractos obtenidos se eligió inicialmente la técnica de ionización de electrospray (ESI) para su detección (la presentación esquemática de la técnica ESI se muestra en la Figura 25).

Tabla 17

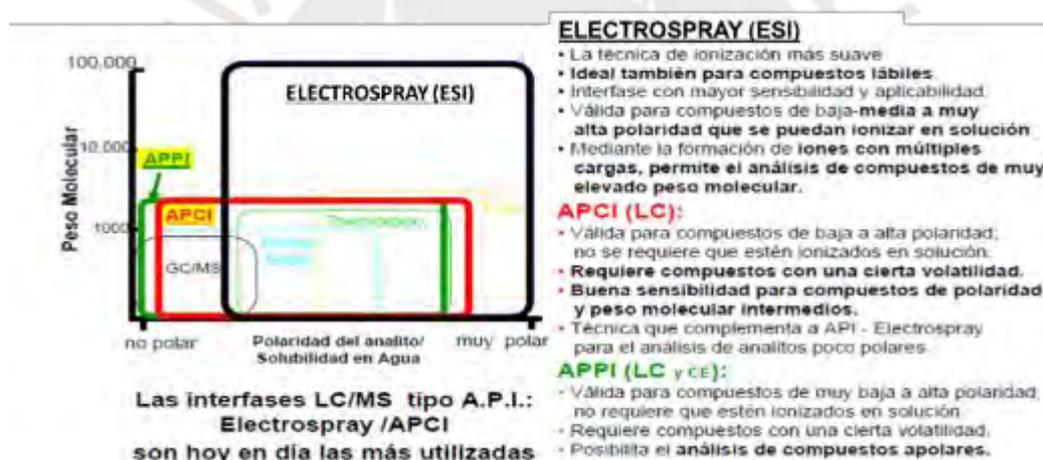
Compuestos de interés de los extractos de jengibre

Compuesto	MW	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
6-gingerol	294.38	295.190	293.176
8-gingerol	322.44	323.221	321.207
10-gingerol	350.49	351.252	349.238
6-shogaol	276.37	277.180	275.165
8-shogaol	304.42	305.211	303.197
10-shogaol	332.48	333.242	331.228
Paradol	278.39	279.195	277.181
Dehydrogingerdione	290.15	291.159	189.144

Nota: La tabla muestra los diferentes compuestos de interés tanto en modo positivo como en negativo.

Figura 25

ESI MS



Nota: la figura muestra las interfases LC/MS tipo API tanto Electropray como APCI que son la hoy en día las más empleadas. Tomado de Martínez y Alvarez (2012).

Inicialmente, las muestras fueron diluidas en una mezcla H₂O: acetonitrilo (1:1) + 0,1 % ácido fórmico; y se procedió a analizarlas tanto en modo positivo como en negativo. Se encontró que, en modo positivo, 6-shogaol era mejor detectado. Sin embargo, en modo negativo se podía observar una débil señal de 6-gingerol que no estuvo presente en modo positivo. En la Figura 26 se presentan las masas que corresponden a las muestras analizadas y modo seleccionado (positivo y negativo). Desafortunadamente, los resultados obtenidos no eran reproducibles. Esta falta de reproducibilidad se podría deber a: (a) la baja estabilidad de

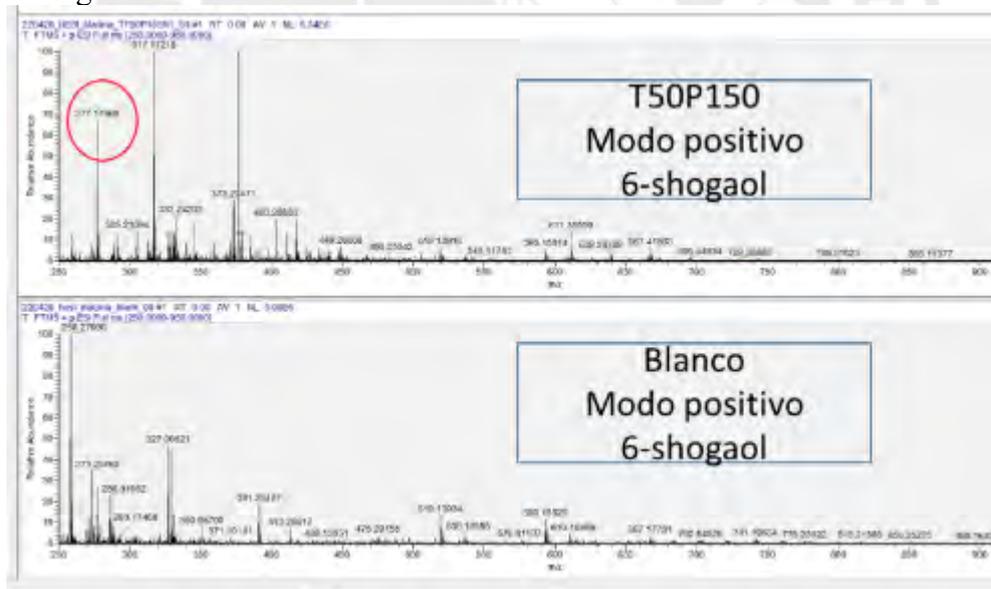
los gingeroles en condiciones de ESI, y/o (b) a la presencia de interferencias, es decir compuestos que poseen la misma fórmula química que el compuesto de interés (i.e., la misma relación masa carga).

Es interesante mencionar que el punto (b), el blanco mostraba señales de 6-shogaol y 6-gingerol (en modo positivo y negativo, respectivamente). Se pensó originalmente que las señales fantasmas provienen de una contaminación del equipo y era necesario limpiar entre corridas para reducir estas señales. Posteriormente, se descubrió que esta señal provenía de un compuesto que se encuentra en los solventes y en el sistema de gases que alimenta el equipo. Posiblemente, un producto de descomposición de las conexiones plásticas del equipo. La aplicación de los filtros de visualización de los espectros ayudó a nivelar este efecto.

Figura 26

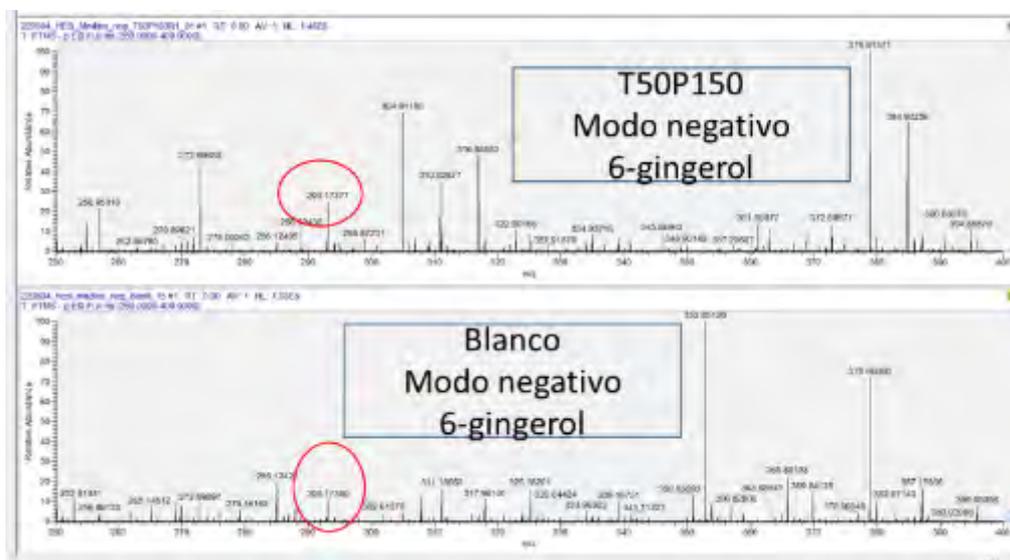
ESI MS de la muestra T50P150.

a) 6-shogaol



Nota. La figura enseña el análisis de 6-shogaol en modo positivo. La extracción de la muestra fue realizada a una temperatura de 50 °C y una presión de 150 psi.

b) 6-gingerol



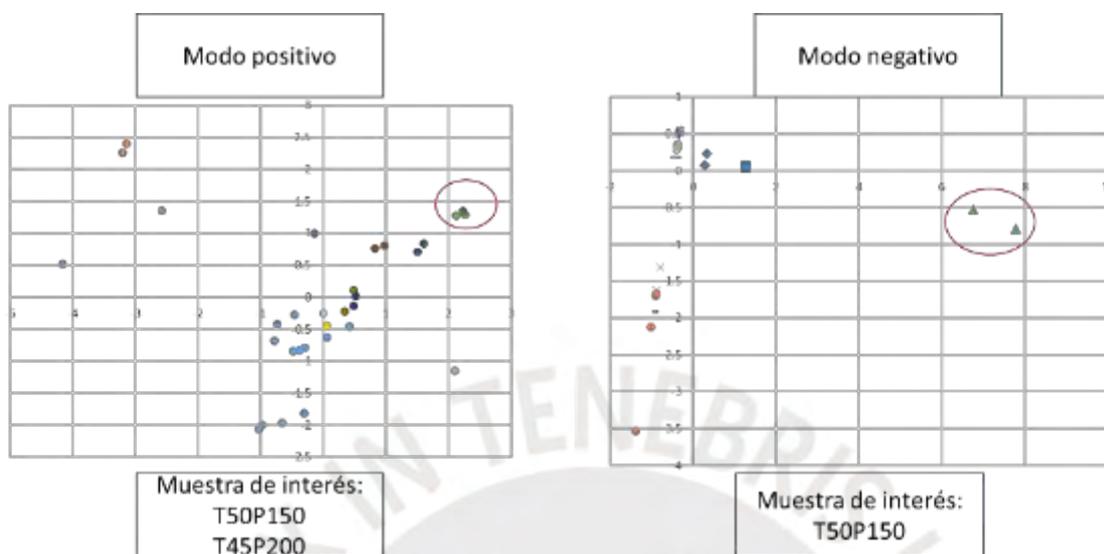
Nota. La figura enseña el análisis de 6-shogaol en modo negativo. La extracción de la muestra fue realizada a una temperatura de 50 °C y una presión de 150 psi.

El estudio de estadística multivariable (principal component analysis, PCA) definió las condiciones de extracción y seleccionó las muestras con mayor concentración de compuestos de interés. (6-shogaol y 6-gingerol)

Se encontró que las muestras T45P200 y T50P150 (Figura 27) eran los mejores candidatos para proceder con un análisis más profundo utilizar una separación previa (cromatografía líquida) para evitar las interferencias antes mencionadas.

Figura 27

Primer estudio de estadística multivariable.



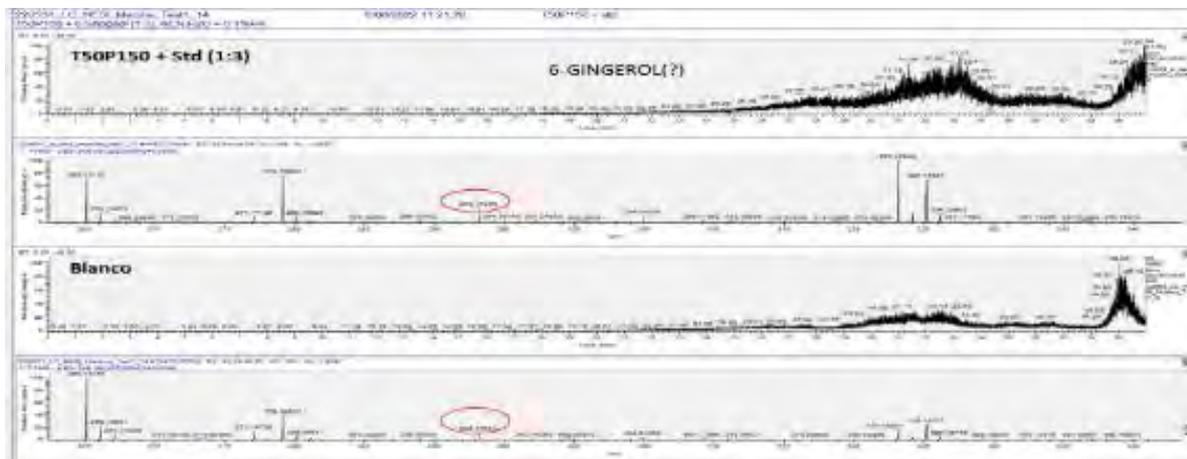
Nota. Primer estudio de estadística multivariable (principal component analysis, PCA) para ver qué condiciones de extracción contenían la mayor cantidad de 6-shogaol, y 6-gingerol.

A partir de los resultados del LC-MS de las muestras T45P200 y T50P150 se puede extraer la siguiente información:

- a) La señal atribuida a 6-gingerol en modo negativo era simplemente ruido y no el metabolito de interés (Figura 27).
- b) Adicionalmente, la señal observada en el blanco en el modo positivo corresponde a otro compuesto, posiblemente un aditivo o compuesto de descomposición de un plástico que se encuentra presente en las conexiones del instrumento. Este compuesto tiene la misma señal de masa que el metabolito de interés 6-shogaol, sin embargo, posee un tiempo de retención distinto – por lo que se pueden estudiar de manera independiente en el formato LC-MS/MS (Figura 28).
- c) Es interesante señalar que la muestra T50P150 también muestra una segunda señal similar a 6-shogaol que eluye a menor tiempo que este. Esta señal puede ser relacionada a 6-gingerol quien se descompone por una reacción de deshidratación en 6-shogaol en las condiciones de medición usando la técnica de electrospray (Figura 29).

Figura 28

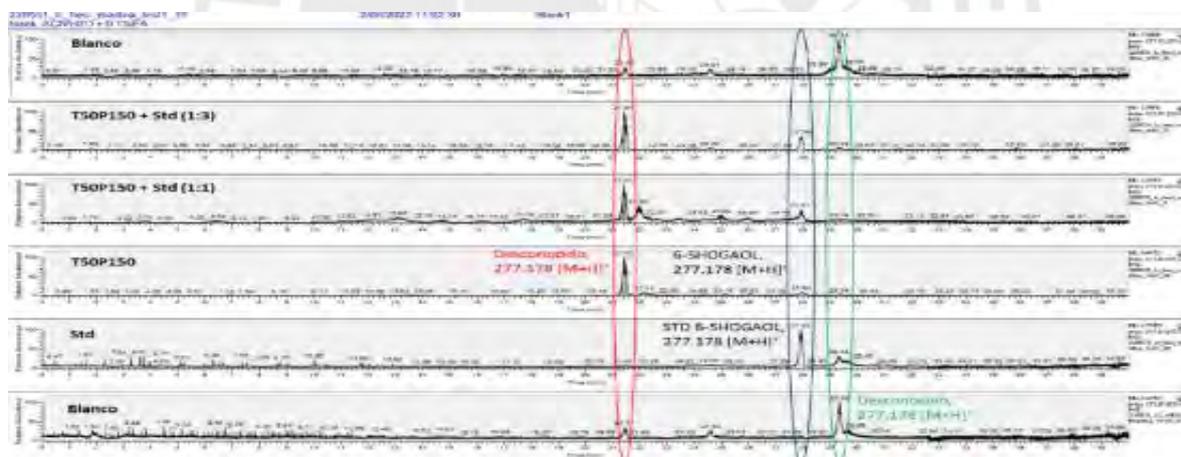
Cromatograma y espectro MS de muestra T50P150



Nota. Cromatograma y espectro MS de muestra T50P150 en modo negativo LC-MS.

Figura 29

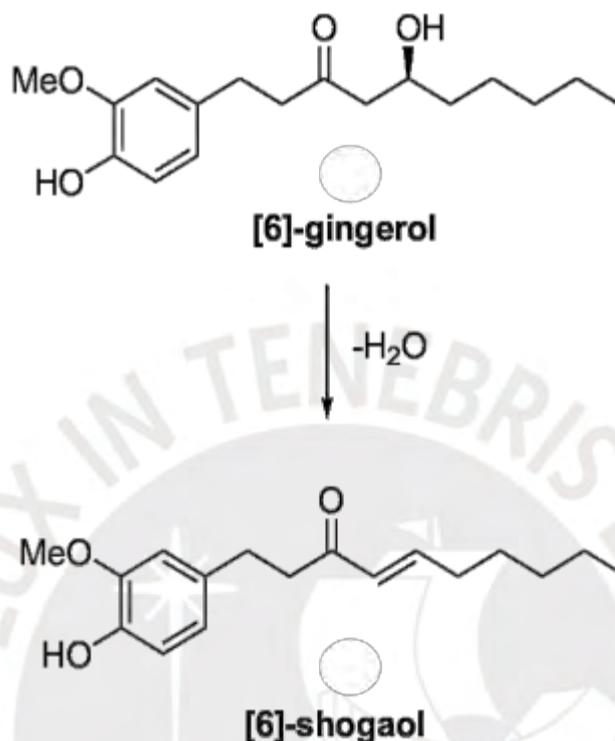
Cromatograma y espectro MS de muestra T50P150



Nota. Cromatograma de muestra T50P150 en modo positivo mostrando múltiples tiempos de elución para 6-Shogaol.

Figura 30

Conversión de 6-gingerol a 6-shogaol

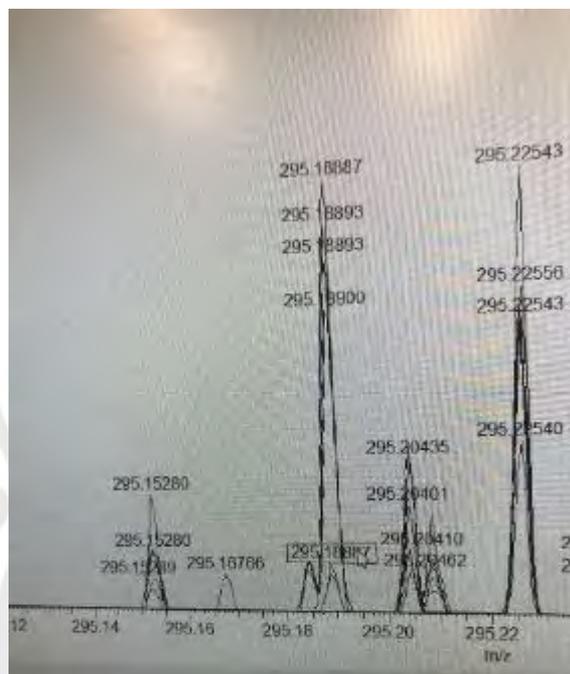


Nota. La figura muestra la reacción de deshidratación de 6-gingerol a 6-shogaol.

Para verificar; que las condiciones de temperatura de la fuente HESI (hot-electro spray ionization) eran las que inducían la descomposición de 6-gingerol (Figura 30), se disminuyó la temperatura de la fuente de ionización de 250 °C a 175 °C; y del tubo de transferencia de iones de 320 °C a 150 °C. Estas modificaciones permitieron incrementar la intensidad de la señal de 6-gingerol en el espectro (Figura 31), la cual co-eluye con unas de las señales de 6-shogaol. Condición necesaria para demostrar que 6-gingerol sufre de una descomposición en la fuente de ionización del espectrómetro de masas.

Figura 31

Espectro MS de muestra T50P150 en modo positivo LC-MS a diferentes temperaturas. Verificación de las condiciones de temperatura de la fuente HESI (hot-electro spray ionization) eran las que inducían la descomposición de 6-gingerol



Nota. Espectro MS de muestra T50P150 en modo positivo LC-MS a diferentes temperaturas. Se disminuyó la temperatura de la fuente de ionización 250 °C a 175 °C, y del tubo de transferencia de iones de 320 °C a 150 °C.

A partir de los resultados del LC-MS se puede extraer la siguiente información:

- La señal atribuida a 6-gingerol en modo negativo era simplemente ruido y no el metabolito de interés.
- Adicionalmente, la señal observada en el blanco en el modo positivo corresponde a otro compuesto, el cual tiene la misma señal de masa que el metabolito de interés 6-shogaol, sin embargo, posee un tiempo de retención distinto.
- Es interesante señalar que la muestra T50P150 también muestra una segunda señal similar a 6-shogaol que eluye a menor tiempo que este. Esta señal puede ser relacionada a 6-gingerol quien se descompone por una reacción de deshidratación en 6-shogaol en las condiciones de medición usando la técnica de electrospray (Figura

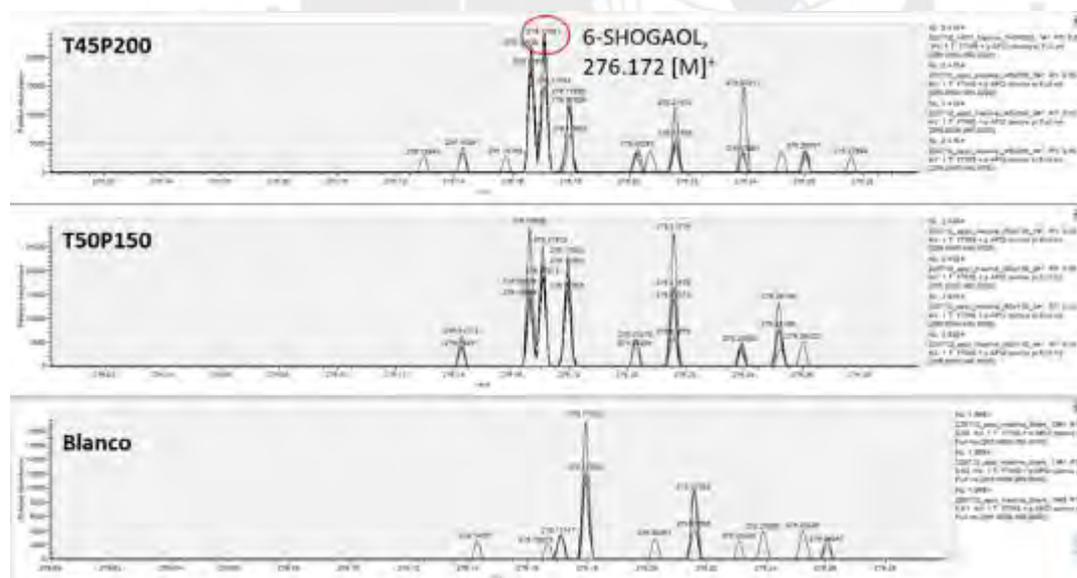
30).

Como consecuencia de los aditivos observados al monitorear los compuestos descritos en la Tabla 17, se decidió cambiar la metodología de análisis y utilizar la técnica de APPI (atmospheric pressure photo ionization) ya que compuestos de interés son compuestos aromáticos. En este caso, se decide cambiar el solvente para disolver las muestras a MeOH:H₂O para mejorar el sistema de medición usando APPI.

Como se puede ver en la Figura 32 y la Figura 33, en el método de inyección directa, las señales en el blanco han disminuido significativamente tanto para 6-gingerol y 6-shogaol. Un beneficio adicional es que la fuente APPI permite la detección de los analitos tanto en su forma radical $[M^*]^+$ como en su forma $[M+H]^+$. Esto significa que uno puede confirmar la presencia de un metabolito en base a dos y no solo una señal como era el caso de electrospray.

Figura 32

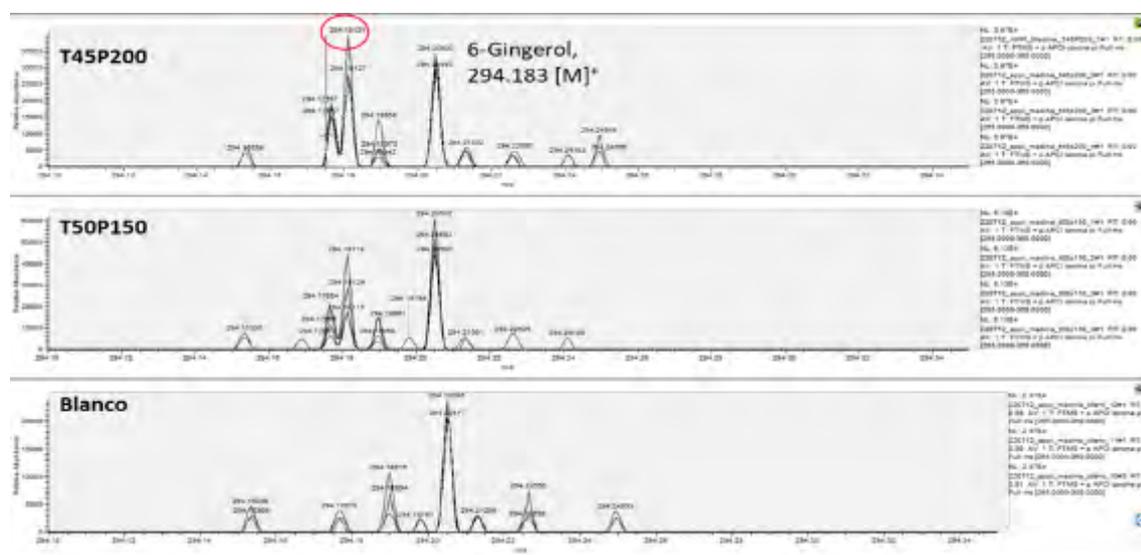
Análisis de muestras T50P150 y T45P200 por fuente APPI.



Nota. La figura muestra como la fuente APPI y por el método de inyección directa las señales en el blanco se reducen de forma importante tanto para 6-shogaol.

Figura 33

Análisis de muestras T50P150 y T45P200 por fuente APPI.

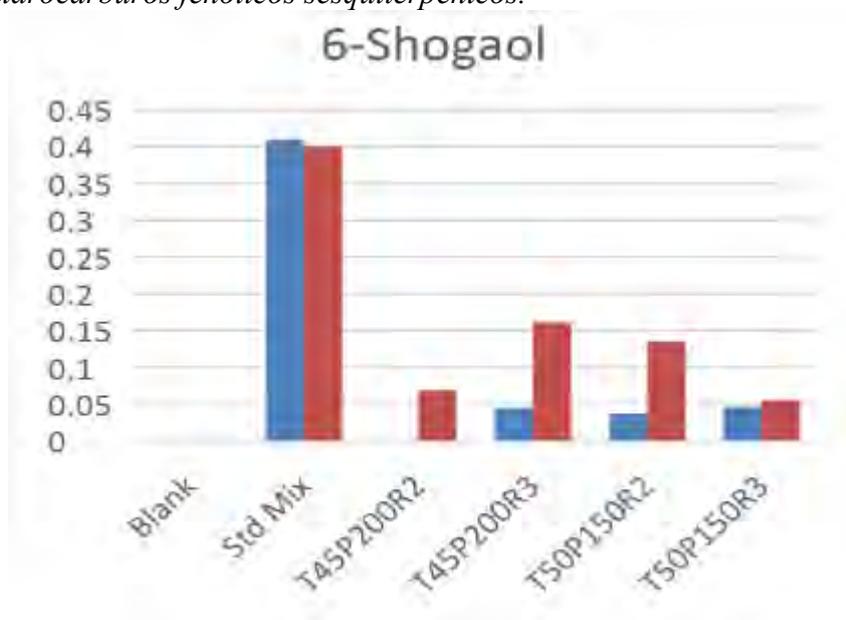


Nota. La figura muestra como la fuente APPI y por el método de inyección directa las señales en el blanco se reducen de forma importante tanto para 6-gingerol.

Para demostrar la reproducibilidad de este sistema de análisis se procedió a estudiar nuevas muestras de oleorresinas obtenidas a las condiciones de T50P150 y T45P200. Las figuras 34 hasta la figura 41 muestra la presencia de los diferentes hidrocarburos fenólicos sesquiterpénicos presentados en la Tabla 17. Es importante mencionar que el método de inyección directa sirve como un estudio previo al de cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas. Ya que es posible que los shogaoles detectados sean realmente productos de descomposición de sus respectivos gingeroles.

Figura 34

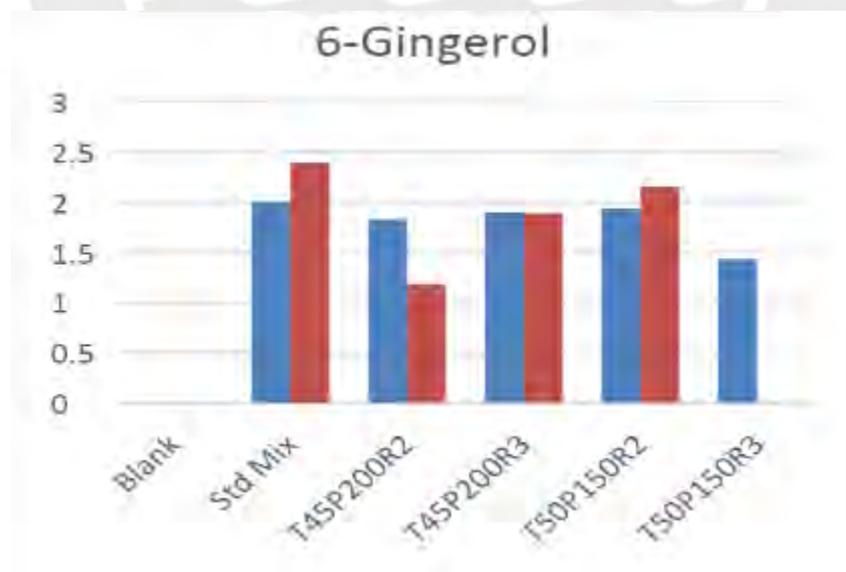
Análisis de hidrocarburos fenólicos sesquiterpénicos.



Nota. La figura muestra análisis de 6-shogaol en muestras.

Figura 35

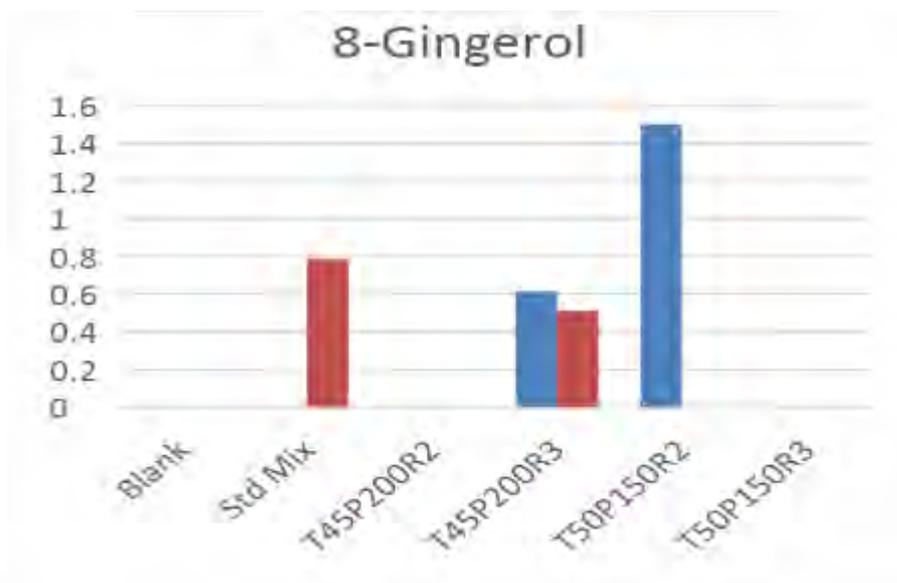
Análisis de hidrocarburos fenólicos sesquiterpénicos.



Nota. La figura muestra análisis de 6-gingerol

Figura 36

Análisis de hidrocarburos fenólicos sesquiterpénicos.



Nota. La figura muestra análisis de 8-gingerol

Figura 37

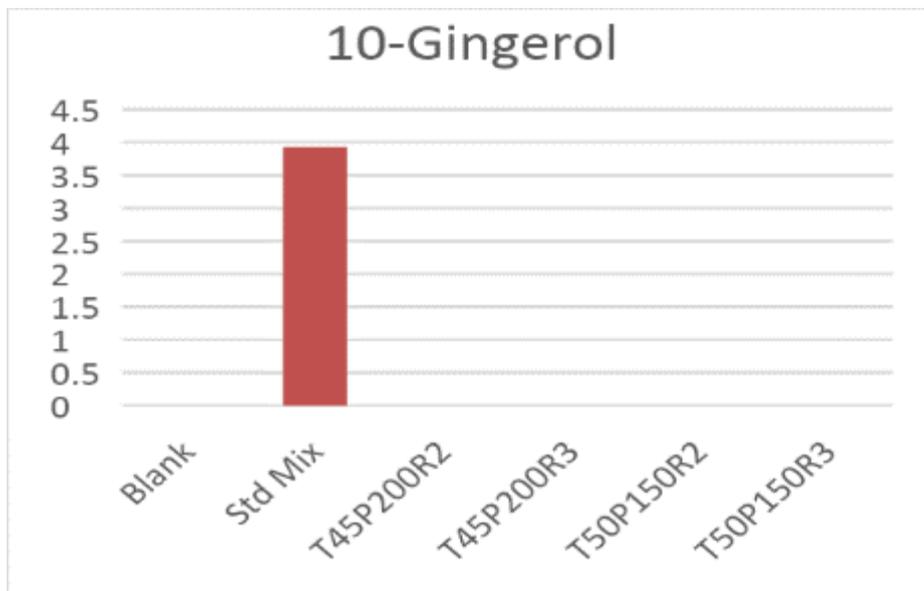
Análisis de hidrocarburos fenólicos sesquiterpénicos.



Nota. La figura muestra análisis de 8-shogaol en muestras.

Figura 38

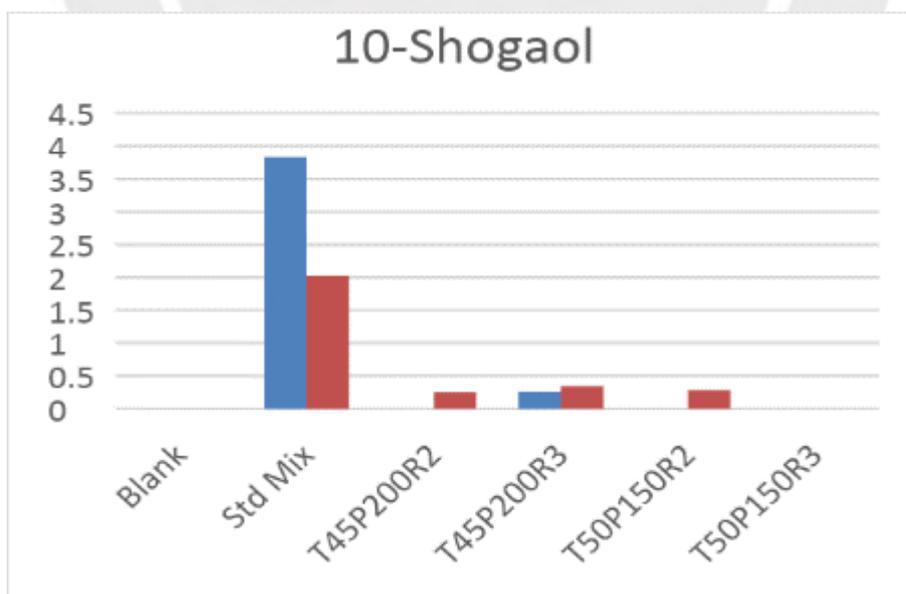
Análisis de hidrocarburos fenólicos sesquiterpénicos.



Nota. La figura muestra análisis de 10-gingerol en muestras.

Figura 39

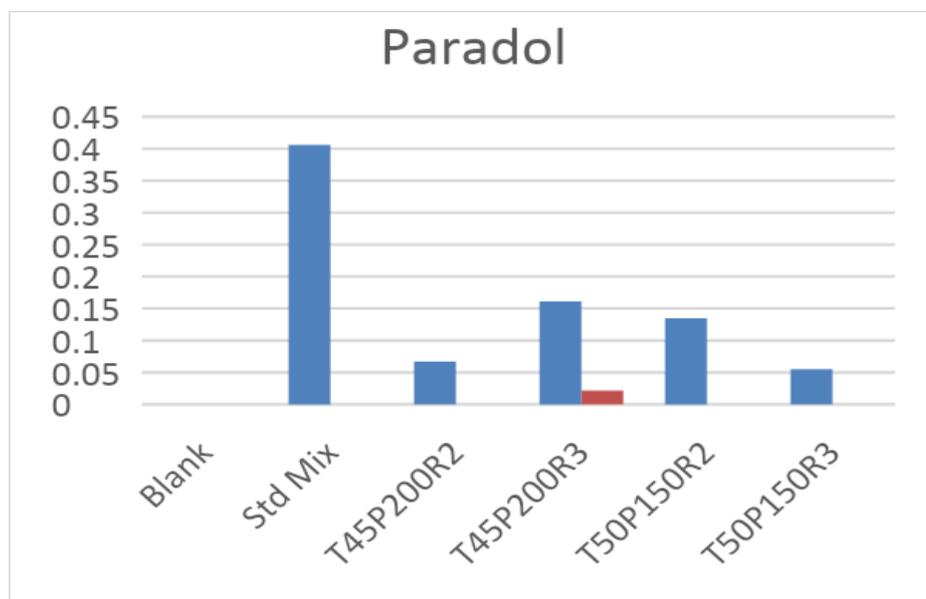
Análisis de hidrocarburos fenólicos sesquiterpénicos.



Nota. La figura muestra análisis de 10-shogaol en muestras.

Figura 40

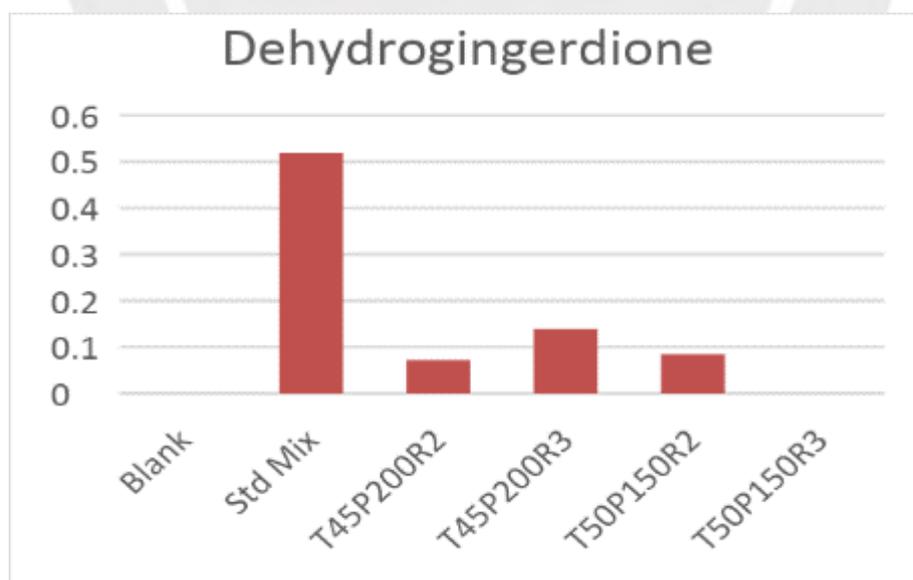
Análisis de hidrocarburos fenólicos sesquiterpénicos.



Nota. La figura muestra análisis de Paradol.

Figura 41

Análisis de hidrocarburos fenólicos sesquiterpénicos.

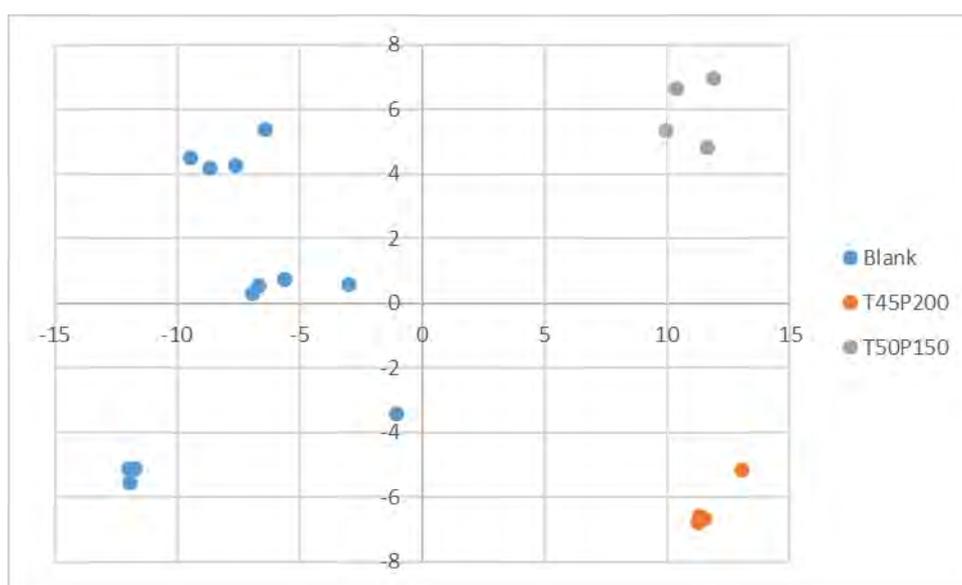


Nota. La figura muestra análisis de Dihidrogingerdiona

Los resultados obtenidos por el método de inyección directa acoplado con espectrometría de masas fueron nuevamente analizados utilizando un estudio de multivariable (Figura 42) y se nota claramente que las muestras se diferencian significativamente de los blancos por la presencia de los compuestos de interés reportados en la tabla 17.

Figura 42

Estudio de multivariables PCA sacado de análisis APPI LCMS.



Nota. La figura muestra el estudio de estadística multivariable (principal component analysis, PCA) con una mezcla de antiguas y nuevas muestras analizados por APPI LCMS.

6.6 Validación de MS utilizando análisis UV

Sin embargo, la falta de reproducibilidad entre muestras que fueron procesadas por el mismo usuario bajo condiciones similares de temperatura y presión llama la atención. Se procedió a validar la reproducibilidad de los diferentes procesos de extracción utilizando un espectrofotómetro de UV, ya que es una técnica para el control de calidad de las muestras.

En este caso, el análisis UV, se realizó en el espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop One™. La longitud de onda de detección se ajustó a 260 nm como una absorbancia UV típica de fenoles. Para mediciones de UV se usaron las muestras madres (Tabla 18, Figura 43). Muestras obtenidas en el rango de temperatura <45 C no proporcionan actividad de UV

a la concentración entregada por lo que se decide no estudiarlas con el sistema APPI-MS (inyección directa). Mientras que las muestras que pasaron 0.02 fueron analizadas por APPI-MS para determinar su composición química.

Tabla 18

UV absorbancias de muestras extraídas.

Muestras	Absorbancia a 260 nm			
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Repetición 4
T40P80	0,01	0,01	-	-
T40P100	0,03	0	0	-
T40P150	0	0	0	-
T40P200	0	0,02	0	-
T40P250	0	0	0	0
T45P100	0,01	0,01	0	0,02
T45P150	0	0	0	-
T45P200	0,05	0,04	0,02	-
T45P250	n/a	0,01	0,04	-
T50P100	0,01	0	-	0,01
T50P150	0,03	0,04	0,03	-
T50P200	n/a	0	0,03	-
T50P250	0,01	0,02	0,02	0,06
MixStd	0,19			

Nota. Medición de absorbancia UV a 260 nm de muestras obtenidas a diferentes condiciones de presión y temperatura por el método de extracción por EFS.

Figura 43

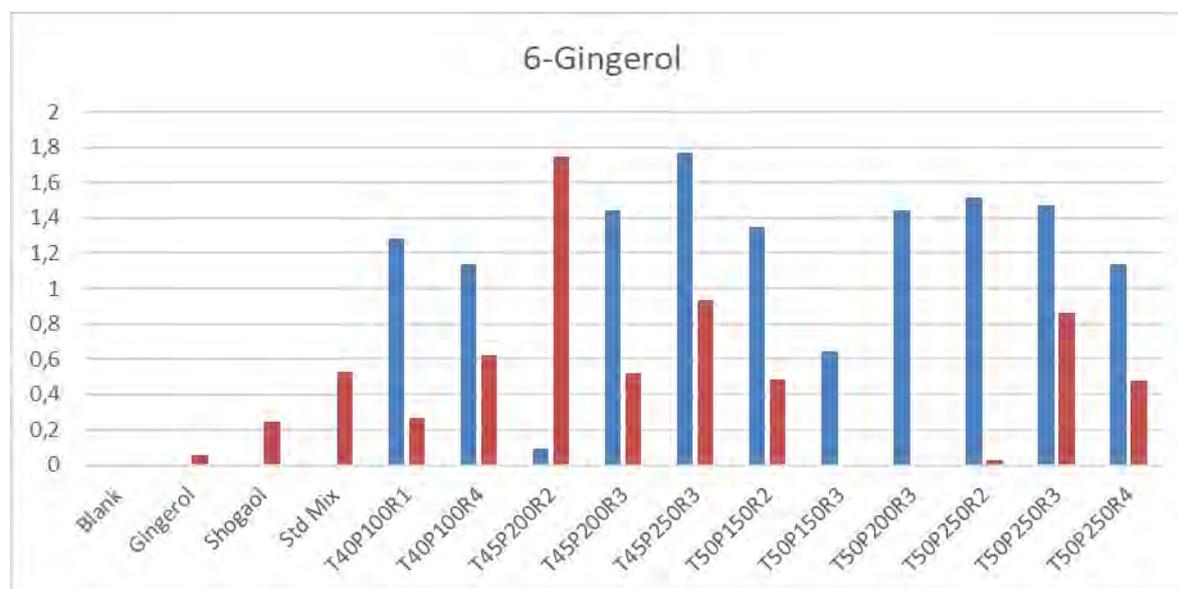
Correlacion de datos obtenidos por UV con análisis de Direct Injection APPI MS/MS. 6-Shogaol.



Nota. La figura muestra la detección de 6-shogaol usando el método de inyección directa por APPI MS/MS en muestras con intensidad de UV absorbancia más 0.02

Figura 44

Correlacion de datos obtenidos por UV con análisis de Direct Injection APPI MS/MS. 6- -Gingerol.



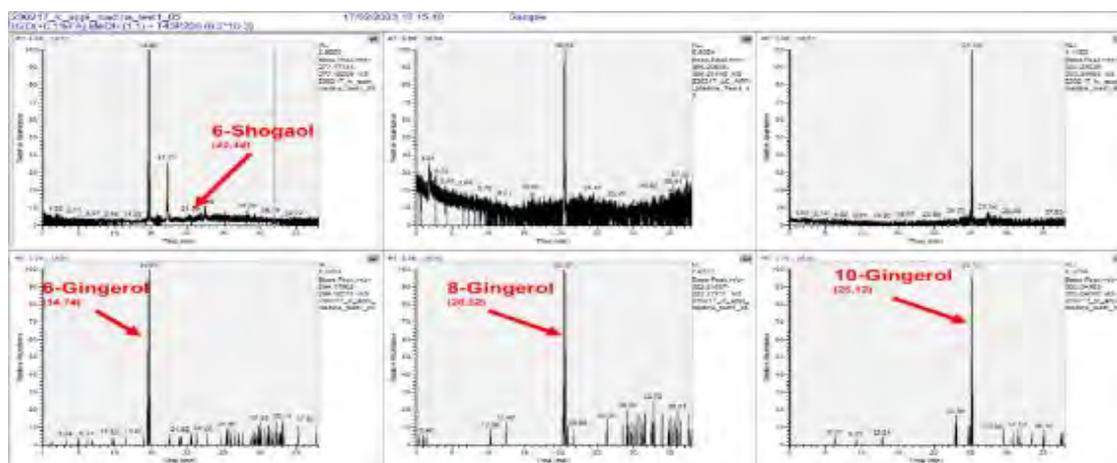
Nota. La figura muestra la detección de 6-gingerol usando el método de inyección directa por APPI MS/MS

Finalmente, y a consecuencia de los ensayos de inyección directa y de los resultados del espectrofotómetro UV, se eligen las muestras T45P200, T50P150, y T50P250 para el subsecuente análisis de cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas.

El resultado del sistema de LC-MS/MS confirma que las T45P200, T50P150, y T50P250 (Figura 45, 46, y 47, respectivamente) contienen principalmente los gingeroles (6-, 8; y 10-), y que los shogaoles detectados son productos de la descomposición de sus respectivos gingeroles. Con excepción de las muestras T50P150 y T50P250 que presentan una pequeña cantidad de 6-shogaol.

Figura 45

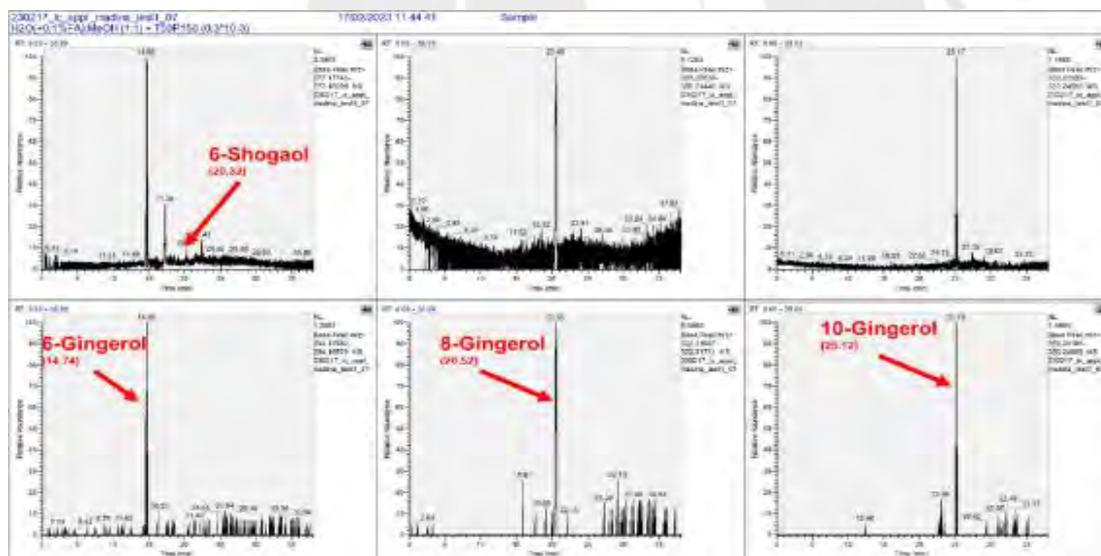
LC-MS/MS de muestra T45P200R2



Nota. El resultado del sistema de LC-MS/MS confirma que la muestra T45P200R2, contienen principalmente los gingeroles (6-, 8-, y 10-)

Figura 46

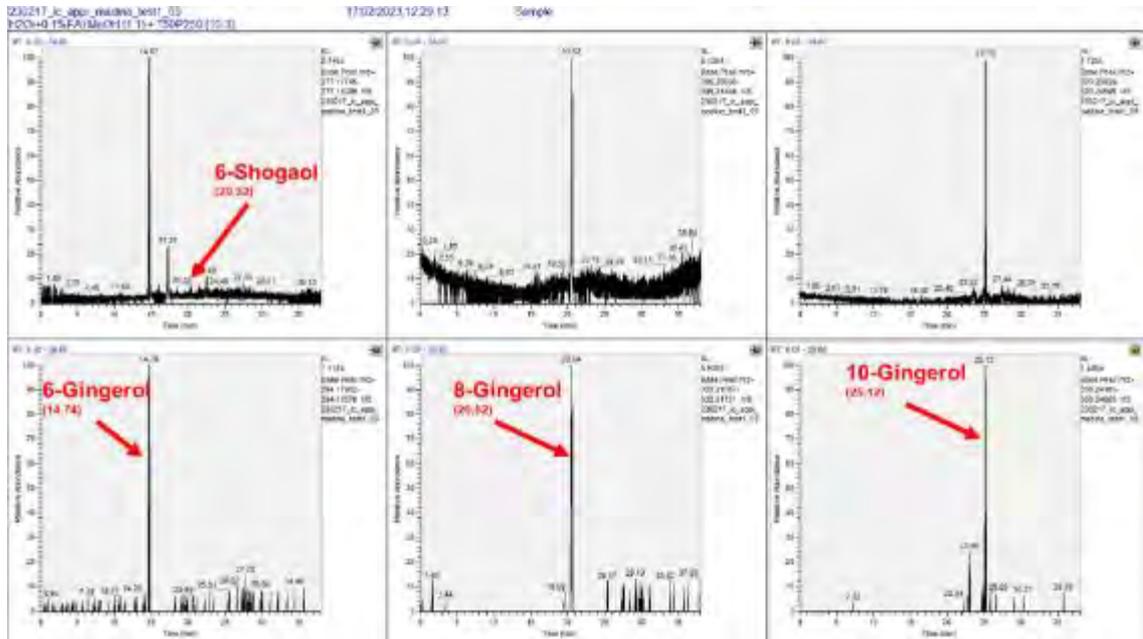
LC-MS/MS de muestra T50P150R2



Nota. El resultado del sistema de LC-MS/MS confirma que la muestra T50P150 contienen principalmente los gingeroles (6-, 8-, y 10-).

Figura 47

LC-MS/MS de muestra T50P250R1



Nota. El resultado del sistema de LC-MS/MS confirma que la muestra T50P250 contienen principalmente los gingeroles (6-, 8-, y 10-)

Las muestras T45P200 y T50P150 han mostrado el mayor contenido de gingeroles, la cuantificación relativa (usando 6-shogaol y 10-gingerol como estándares) de 6-, 8-, 10-gingeroles y shogaoles se demuestra en la tabla 48 y tabla 49.

Tabla 18

Cuantificación relativa

mg/100 g de Oleorresina

	T45P200R1	T45P200R2	T50P150R1(*)	T50P150R2	T50P250R4
Absorbancia (260nm)	0.05	0.04	0.03	0.04	0.06
6-Gingerol	16.06359	22.93533	2.43529	22.50899	20.83632
6-Shogaol	0.00879	0.64435	0.00879	1.48609	0.85648
8-Gingerol	2.81029	4.72952	0.06104	5.06428	4.45407
10-Gingerol	9.70386	1.52456	1.31909	10.34443	10.10982

Nota. La tabla enseña cuantificación relativa de muestras de interés.

*Muestra T50P150R1 de primer lote fue elegida como muestra de interés, pero el análisis comparativo con muestras de lote 2 mostró una pérdida de compuestos deseables, tal descomposición fue reportada también en literatura (Bhattarai,2001)

Tabla 19

Cuantificación relativa de todas muestras

	mg/100 g de Oleoresina											
	T40P80R1	T40P80R2	T40P100R1	T40P100R2	T40P100R3	T40P150R1	T40P150R2	T40P150R3	T40P200R1	T40P200R2	T40P200R3	T40P250R1
Absorbance (260nm)	0.01	0.01	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00
6-Gingerol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6-Shogaol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
8-Gingerol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
10-Gingerol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

	mg/100 g de Oleoresina											
	T40P250R2	T40P250R3	T40P250R4	T45P100R2	T45P100R3	T45P100R4	T45P150R2	T45P150R3	T45P200R1	T45P200R2	T45P200R3	T45P250R2
Absorbance (260nm)	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.02	0.00	0.01	0.05	0.04	0.01	0.03
6-Gingerol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	16.0635878	22.9353268	n.d.	n.d.
6-Shogaol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.00878507	0.64435382	n.d.	n.d.
8-Gingerol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.8102946	4.72951607	n.d.	n.d.
10-Gingerol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	9.7038622	1.52455878	n.d.	n.d.

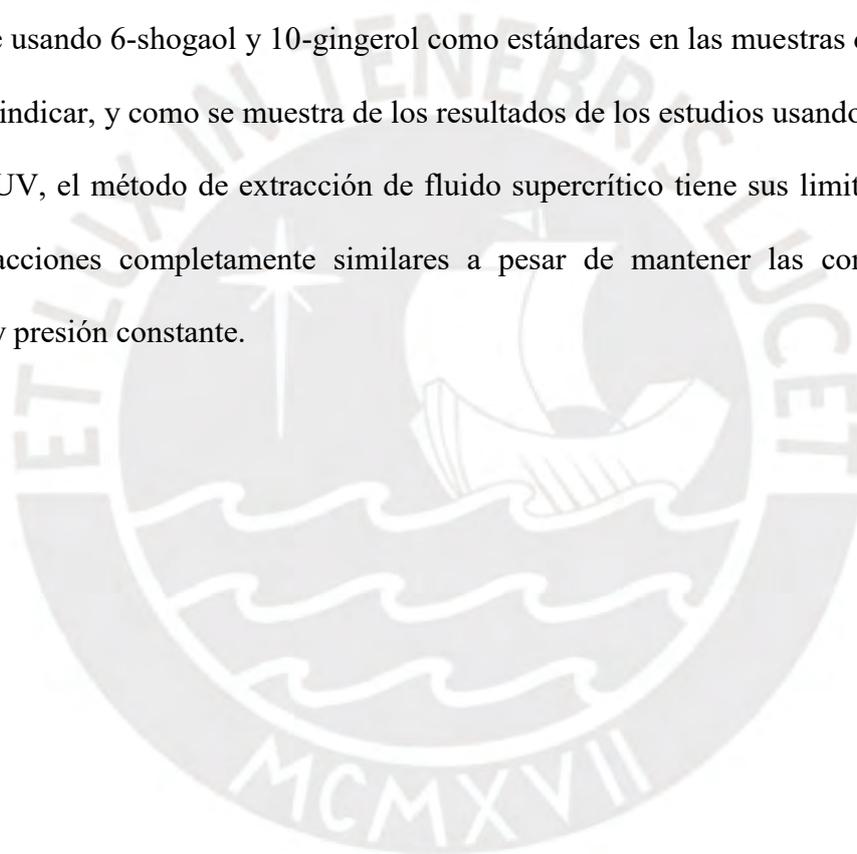
	mg/100 g de Oleoresina									
	T50P100R2	T50P100R4	T50P150R1(*)	T50P150R2	T50P150R3	T50P200R2	T50P200R3	T50P250R2	T50P250R3	T50P250R4
Absorbance (260nm)	0.00	0.01	0.03	0.04	0.02	0.00	0.03	0.02	0.02	0.06
6-Gingerol	n.d.	n.d.	2.43528576	22.508986	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	20.8363239
6-Shogaol	n.d.	n.d.	0.00878507	1.4860923	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.85647658
8-Gingerol	n.d.	n.d.	0.06103595	5.06427537	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4.45407324
10-Gingerol	n.d.	n.d.	1.31909432	10.3444315	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10.1098191

Nota. La tabla enseña la cuantificación relativa de los compuestos de interés de todas muestras.

7. CONCLUSIONES

Durante el presente proyecto que las mejores condiciones para la extracción de hidrocarburos fenólicos sesquiterpénicos, como los gingeroles (6-, 8-; y 10-), del jengibre utilizando la tecnología de fluidos supercrítico es a las condiciones de temperatura de 45 °C y presión de 200 psi, así como temperaturas de 50 °C y presión de 150 psi. Siendo esta última la que permite extraer con mayor facilidad el 6-shogaol. Este resultado fue confirmado por ESI-MS, APPI-MS, LC-APPI-MS/MS, y por absorbancia UV. Se logró cuantificar relativamente usando 6-shogaol y 10-gingerol como estándares en las muestras de interés.

Cabe indicar, y como se muestra de los resultados de los estudios usando APPI-MS y absorbancia UV, el método de extracción de fluido supercrítico tiene sus limitaciones para realizar extracciones completamente similares a pesar de mantener las condiciones de temperatura y presión constante.



8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd El-Kareem, M. S., Rabbih, M. A., & Selim, E. T. M. (2016). Identification of zingiber components by gas chromatograph/mass spectrometer and semi-empirical calculations. *Int. J. Phys. Res.*, 4, 20-26. <https://www.sciencepubco.com/index.php/IJPR/article/view/6052>
- Abd El-Kareem, M., Rabbih, M., & Selim, E. (2016). Identification of zingiber components by gas chromatograph/mass spectrometer and semi-empirical calculations. *International Journal of Physical Research*, 4(1), 20-26. <https://www.sciencepubco.com/index.php/IJPR/article/view/6052>
- Afzal, M., Al-Hadidi, D., Menon, M., Pesek, J., & Dhami, M. S. I. (2001). Ginger: an ethnomedical, chemical and pharmacological review. *Drug metabolism and drug interactions*, 18(3-4), 159-190. <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/DMDI.2001.18.3-4.159/html>.
- Aponte Figueroa, G. M. (2022). Innovación verde: Indicadores y principales tendencias. *Gestión I+D*, 6(2), 12-49. Recuperado a partir de http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_GID/article/view/22483
- Asamenew, G., Kim, H., Lee, M., Lee, S., Kim, Y. J., Cha, Y., Yoo, S. M., & Kim, J. (2019). Characterization of phenolic compounds from normal ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) and black ginger (*Kaempferia parviflora* Wall.) using UPLC–DAD–QToF–MS. *European Food Research and Technology*, 245(3), 653-665. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3188-z>
- Artica Mallqui, L., Baquerizo Canchumanya, M., Rosales Papa, H., & Rodríguez Paucar, G. (2021). Ácidos grasos, tocoferoles y fitoesteroles en aceites de semillas de granadilla y zapallo extraído con CO₂ supercrítico. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 87(1),

3-13. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810-634X2021000100003&script=sci_arttext

Aziz, Z. A. A., Ahmad, A., Setapar, S. H. M., Karakucuk, A., Azim, M. M., Lokhat, D., Rafatullah, M., Ganash, M., Kamal, M. A., & Ashraf, G. M. (2018). Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical and Therapeutic Potential - A Review. *Current drug metabolism*, 19(13), 1100–1110.

<https://doi.org/10.2174/1389200219666180723144850>

Badui, S. (2006). Química de los Alimentos. Pearson educación, México. <https://fcen.uncuyo.edu.ar/upload/libro-badui200626571.pdf>

Bernal Velarde, C. A., & Tunqui García, M. K. (2020). *Capacidad antioxidante del extracto de los frutos liofilizados de la opuntia ficus-indica tuna roja, naranja y verde, Arequipa–2019*. [Tesis para optar el Título Profesional de: Químico Farmacéutico]. Universidad Católica de Santa María. <https://repositorio.ucsm.edu.pe/items/75513b11-013a-40e4-8be9-e8211ef630b7>

Bhattarai, S., & Duke, C. C. (2001). The stability of gingerol and shogaol in aqueous solutions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90(10), 1658-1664.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022354916308395>

Bhattarai, S., Tran, V. H., & Duke, C. C. (2007). Stability of [6]-gingerol and [6]-shogaol in simulated gastric and intestinal fluids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45(4), 648-653. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17706909/>

Blois M. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958; 181:1199–200

Bustamante Zambrano, R. V. y Pérez Maigua, J. A. (2016). Diseño de un Sistema de Gestión de Calidad para el laboratorio de Bioproductos del Centro de Investigación en Biotecnología de una Institución de Educación Superior basado en el Servicio de

Acreditación Ecuatoriano (SAE), ubicado en la ciudad de Guayaquil. [Tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnica del Litoral].

<https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/54402/1/T-105873.pdf>

Camargo, K. (2021). Factibilidad Técnica, Económico y Financiera de la Implementación de un Plan Integral de Manejo en la Producción de Jengibre en la Selva Central (Chanchamayo y Satipo), para Lograr Cosechas en los meses de Escasez y Demanda Insatisfecha Internacional [Tesis para optar el Título de Administración de Agronegocios]. Universidad ESAN.

https://repositorio.esan.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12640/2424/2021_MAAA_19-1_01_T.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Cárdenas Fiorella. Pontificia Universidad Católica Del Perú - Grupo de Innovación en Desarrollo de Nuevos Productos y FONDECYT, PROCENCIA, CONCYTEC (15 de septiembre de 2024) Protocolos de trabajo. <https://www.pucp.edu.pe/profesor/fiorella-cardenas-toro/investigaciones/>

Castillo, A. (2019). Evaluación de las propiedades antimicrobianas y atributos sensoriales de aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinale*) adicionado a una matriz de paté de hígado de cordero [Tesis para optar el Título de Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos]. Universidad Nacional de Colombia.

<https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/78039/Evaluaci%3%b3n%20de%20las%20propiedades%20antimicrobianas%20y%20atributos%20sensoriales%20de%20aceite%20esencial%20de%20jengibre%20%28Zingiber%20officinale%29%20adicionado%20a%20una%20matriz%20de%20pat%3%a9%20de%20h%3%adgado%20de%20cordero.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Charles, R., Garg, S. N., & Kumar, S. (2000). New gingerdione from the rhizomes of

- Zingiber officinale. *Fitoterapia*, 71(6), 716-718. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0367326X0000215X>
- Cisneros-Santos, G., del Rocío Lavado-Meza, C., Estacio-Laguna, R., & Carhuallanqui-Berrocal, E. (2021). El jengibre y su relación con el comercio exterior en la economía peruana 2010-2019. *Investigación Valdizana*, 15(3), 137-144. <https://www.redalyc.org/journal/5860/586068621001/html/>
- Citronberg, J.; Bostick, R.; Ahearn, T.; Turgeon, D.K.; Ruffin, M.T.; Djuric, Z.; Sen, A.; Brenner, D.E.; Zick, S.M. Effects of ginger supplementation on cell-cycle biomarkers in the normal-appearing colonic mucosa of patients at increased risk for colorectal cancer: Results from a pilot, randomized, and controlled trial. *Cancer Prev. Res.* **2013**, 6, 271–281.
- Fillipone, M. P., Di Peto, P., Grellet Bournonville, C. F.; Chalfoun, N. R., Tortora, M. L., Vera, L., Mamani, A. & Castagnaro, Atilio P. (2017). Bioproductos y sanidad vegetal. *Avance Agroindustrial*, 38(1), 24-32. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/63108>
- Foudah, A. I., Shakeel, F., Yusufoglu, H. S., Ross, S. A., & Alam, P. (2020). Simultaneous Determination of 6-Shogaol and 6-Gingerol in Various Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) Extracts and Commercial Formulations Using a Green RP-HPTLC-Densitometry Method. *Foods*, 9(8), 1136. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/foods9081136>
- Giri, D. (2015). High performance liquid chromatography (HPLC): principle, types, instrumentation and applications. *LaboratoryInfo*. <https://laboratoryinfo.com/hplc/>
- Guija-Poma, E., Inocente-Camones, M. Á., Ponce-Pardo, J., & Zarzosa-Norabuena, E. (2015). Evaluación de la técnica 2, 2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horizonte medico (lima)*, 15(1), 57-60. <http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1727->

558X2015000100008&script=sci_abstract

Huaccho-Rojas, J., Yánac-Tellería, W., Balladares Quintana, A. D., Rodríguez Manyari, L. C., Galarza Puertas, S., Vallejos-Gamboa, J., ... & Villar López, M. (2021). Alimentos con potencial efecto inmunomodulador y antiviral a propósito de la pandemia COVID-19. *Perspectivas en Nutrición Humana*, 23(2), 199-220. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-41082021000200199

Hong, W., Zhi, F. X., Kun, T. H., Hua, F. J., Huan Ling, L., Fang, F., Wen, C., Jie, W., & Yang, L. C. (2021). 6-Gingerol attenuates ventilator-induced lung injury via anti-inflammation and antioxidative stress by modulating the PPAR γ /NF- κ B signalling pathway in rats. *International Immunopharmacology*, 92, 107367. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107367>

Ji, Kaihua, Fang, Lianying, Zhao, Hui, Li, Qing, Shi, Yang, Xu, Chang, Wang, Yan, Du, Liqing, Wang, Jinhan, Liu, Qiang, Ginger Oleoresin Alleviated γ -Ray Irradiation-Induced Reactive Oxygen Species via the Nrf2 Protective Response in Human Mesenchymal Stem Cells, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1480294, 12 pages, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1480294>

Jiang, Hongliang, Anikó M. Sólyom, Barbara N. Timmermann, y David R. Gang. (2005). Characterization of Gingerol-Related Compounds in Ginger Rhizome (*Zingiber Officinale* Rosc.) by High-Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(20), 2957-64. <https://doi.org/10.1002/rcm.2140>.

Jolad, S. D., Lantz, R. C., Chen, G. J., Bates, R. B., & Timmermann, B. N. (2005). Commercially processed dry ginger (*Zingiber officinale*): composition and effects on LPS-stimulated PGE₂ production. *Phytochemistry*, 66(13), 1614-1635.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942205002244>

Ko, M. J., Nam, H. H., & Chung, M. S. (2019). Conversion of 6-gingerol to 6-shogaol in ginger (*Zingiber officinale*) pulp and peel during subcritical water extraction. *Food chemistry*, 270, 149-155. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814618312184>

Kou, X., Li, X., Rahman, M. R. T., Yan, M., Huang, H., Wang, H., & Su, Y. (2017). Efficient dehydration of 6-gingerol to 6-shogaol catalyzed by an acidic ionic liquid under ultrasound irradiation. *Food Chemistry*, 215, 193-199.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814616311396>

Kou, X., Wang, X., Ji, R., Liu, L., Qiao, Y., Lou, Z., ... & Ho, C. T. (2018). Occurrence, biological activity and metabolism of 6-shogaol. *Food & function*, 9(3), 1310-1327. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2018/fo/c7fo01354j/unauth>

Kumar, N.V.; Murthy, P.S.; Manjunatha, J.R.; Bettadaiah, B.K. Synthesis and quorum sensing inhibitory activity of key phenolic compounds of ginger and their derivatives. *Food Chem.* **2014**, 159, 451–457.

Mao, Q. Q., Xu, X. Y., Cao, S. Y., Gan, R. Y., Corke, H., Beta, T., & Li, H. B. (2019). Bioactive Compounds and Bioactivities of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Foods (Basel, Switzerland)*, 8(6), 185. <https://doi.org/10.3390/foods8060185>

Manish Kumar Gupta, Aditya Ghuge, Manasi Parab, Yehya Al-Refaei, Anjali Khandare, Neha Dand, Nilkamal Waghmare (2022) A comparative review on High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) & High-Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC). *Curr. Issues Pharm.Med.Sci.*, 35(4), 224-228 doi: 10.2478/cipms-2022-0039

Martínez-Rubio, K., Delgado-Cruz, A., & Vargas-Martínez, E. E. (2021). Adopción de tecnologías verdes y su influencia en las prácticas de responsabilidad ambiental. Percepciones de los trabajadores de hoteles. *Estudios Gerenciales*, 37(161), 532-541.

<http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123->

[59232021000400532&script=sci_arttext](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-59232021000400532&script=sci_arttext)

- Martinez, A & Alvarez, I. (5 de Julio de 2012) *Jornada sobre posibilidades de la Espectrometría de masas en laboratorios de investigación* [Discurso principal]. El poder de análisis comparativo de muestras de Alimento, Proteómica y Metabólica, Madrid España.
- https://www.agilent.com/Library/slidepresentation/Public/1.2.Introducci%C3%B3n_y_Posibilidades_de_la_Espectrometr%C3%ADa_de_Masas.pdf
- Méndez Eduardo. (2012) Fenología y producción de masa fresca y oleorresina de jengibre (*Zingiber officinale* r.) con diferente materia orgánica [Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Trujillo]. <https://dspace.unitru.edu.pe/server/api/core/bitstreams/701556b7-8bab-4191-806a-882ca7057488/content>
- Montalvo, P. J., Perales, C. V., & Figueroa, L. V. (2020). Propiedades farmacológicas del jengibre (*Zingiber officinale*) para la prevención y el tratamiento de COVID-19. *Agroindustrial Science*, 10(3), 329-338.
- <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8085673>
- Nile, S.H.; Park, S.W. Chromatographic analysis, antioxidant, anti-inflammatory, and xanthine oxidase inhibitory activities of ginger extracts and its reference compounds. *Ind. Crop. Prod.* **2015**, 70, 238–244.
- Ok, S., & Jeong, W. S. (2012). Optimization of extraction conditions for the 6-shogaol-rich extract from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Preventive Nutrition and Food Science*, 17(2), 166. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3866747/>
- Park, J. S., & Jung, M. Y. (2012). Development of high-performance liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry for the simultaneous characterization and quantitative analysis of gingerol-related compounds in ginger products. *Journal of agricultural and*

- food chemistry*, 60(40), 10015-10026. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf302944p>
- Pérez, J. (2007). *Metodología para la evaluación de ingredientes funcionales antioxidantes: efectos de fibra antioxidante de uva en status antioxidante y parámetros de riesgo cardiovascular en humanos*. [Tesis para optar el Grado de Doctor]. Universidad Autónoma de Madrid. <https://repositorio.uam.es/handle/10486/1671>
- Platinetti, et al. (2016). Galletas a Base de Harina de Trigo Enriquecidas con Extracto de Jengibre rico en Polifenoles. [Tesis para optar el Grado de Licenciatura en Nutrición]. Escuela de Nutrición de la Facultad de Ciencias Médicas. <https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/4614/Informe%20FINAL%20Tesis%20Jengibre.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Pomilio, A. B., Bernatené, E. A., & Vitale, A. A. (2011). Espectrometría de masas en condiciones ambientales con ionización por desorción con electrospray. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 45(1), 47-79. <https://www.redalyc.org/pdf/535/53519965003.pdf>
- Prieto Jiménez, O. P. (2020). Implementación de tecnologías ecológicas y tecnología BIM, en edificios de viviendas para la ciudad de Loja-Ecuador. *Eidos*, 11(15), 17–28. <https://revistas.ute.edu.ec/index.php/eidos/article/view/700>
- Quiñones, M., Miguel, M., & Alexandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria*, 27(1), 76-89. https://scielo.isciii.es/pdf/nh/v27n1/09_revision_08.pdf
- Rodríguez, P. (2021). Green extraction processes for the valorization of paulownia residual biomass. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=303081>
- Samaniego, J., Huerta, J., Inocente, M., Obregón, J., & López, M. (2021). Validación de un método por cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación de senósidos en tabletas de chocolate. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 87(2), 180-191.

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810634X2021000200180&script=sci_arttext

- Suarez Ospina, D., & Morales Hernández, Y. (2018). Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas. <https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/7731/1/6131978-2018-1-IQ.pdf>
- Tarazona Lévano, J. C., & Turco Condori, T. G. (2022). El Jengibre como recurso potencial en la prevención y/o tratamiento para Covid-19 en el distrito de Breña–Lima. [Tesis para optar el Título de Profesional Químico Farmacéutico]. <https://repositorio.uoosevelt.edu.pe/handle/20.500.14140/757>
- Tao, Y., Li, W., Liang, W., & Van Breemen, R. B. (2009). Identification and quantification of gingerols and related compounds in ginger dietary supplements using high – performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21), 10014-10021. <https://doi.org/10.1021/jf9020224>
- Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. (2014). Essential oils: Extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of Food Science*, 79(7), R1231-R1249. <https://10.1111/1750-3841.12492>
- Valadez-Villarreal, A., López-Hernández, E., García-Jiménez, R., Ruíz-Santiago, F., Hernández-Becerra, J., & Rocher-Córdova, R. (2019). Comparación de dos técnicas de extracción de jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) y cuantificación de fenólicos totales y capacidad antioxidante. Universidad Tecnológica de Tabasco. División de Procesos Industriales. México. <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume4/4/9/114.pdf>
- Vásquez O., Alva, A. y Marrero, J. (2001). Extracción y caracterización del aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinale*). *Revista Amazónica de Investigación alimentaria*, 1(1), 38-42.

<https://enlinea.unapiquitos.edu.pe/pregrado/facultades/alimentarias/descargas/vol1/6.pdf>

Velásquez Valderrama, Ángela María. (2008). La tecnología de fluidos supercríticos, un proceso limpio para el sector industrial. *Producción más limpia*, 3(2), 98-104.
<https://docplayer.es/15133387-La-tecnologia-de-fluidos-supercriticos-un-proceso-limpio-para-el-sector-industrial.html>.

turVelasco, R. J., Villada, H. S., & Carrera, J. E. (2007). Aplicaciones de los fluidos Supercríticos en la agroindustria. *Información tecnológica*, 18(1), 53-66.
<https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642007000100009>

Wong, M. (2023). Competitividad y factores que influyen en las exportaciones peruanas de jengibre en el período 2012-2021. [Tesis para optar el Título Profesional de Economía]. Universidad Nacional del Callao.
<https://repositorio.unac.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12952/7850/tesis%20-Wong.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Yt, K., Singh, M., Ahmad, S., Alam, P., & Salam, S. (2015). Stability-indicating RP-HPLC method for the determination of 6-gingerol in polyherbal formulations. *Journal of Analytical Science and Technology*, 6(23). 10.1186/s40543-015-0056-3

Zambrano-Blanco, E. (2015). Diversidad genética del jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe.) A nivel molecular: Avances de la última década. *Entramado*, 11(2), 190-199.
<http://www.scielo.org.co/pdf/entra/v11n2/v11n2a13.pdf>

Zhang, F., Zhang, J., Yang, W., Xu, P., Xiao, Y., & Zhang, H. (2018). 6-Gingerol attenuates LPS-induced neuroinflammation and cognitive impairment partially via suppressing astrocyte overactivation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 107, 1523-1529.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.136>

Zhang, M.; Viennois, E.; Prasad, M.; Zhang, Y.; Wang, L.; Zhang, Z.; Han, M.K.; Xiao, B.; Xu, C.; Srinivasan, S.; et al. Edible ginger-derived nanoparticles: A novel therapeutic approach for the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer. *Biomaterials* **2016**, *101*, 321–340.

