

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado en Farmacia



“PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE UN AOVE RICO EN POLIFENOLES, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIONES COSMÉTICAS”.

Autora: Nuria Arbonés Ruedas
Villaviciosa de Odón, junio 2025

INDICE

1. RESUMEN.....	4
2. INTRODUCCIÓN	5
2.1 <i>OLEA EUROPAEA L.</i>	5
2.2 CARACTERIZACIÓN Y CLASIFICACIÓN DEL ACEITE DE OLIVA	5
2.2.1 <i>Caracterización</i>	5
2.2.2 <i>Clasificación</i>	5
2.3 COMPOSICIÓN DEL AOVE	6
2.4 PROPIEDADES DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS.....	7
2.5 AGRUPACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS	8
2.5.1 <i>Secoiridoides</i>	8
2.5.2 <i>Alcoholes fenólicos y derivados</i>	8
2.5.3 <i>Ácidos fenólicos y derivados</i>	9
2.5.4 <i>Lignanos</i>	9
2.5.5 <i>Flavonoides</i>	9
3. OBJETIVOS.....	9
3.1 OBJETIVOS PRINCIPALES	9
3.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS	9
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
4.1 EXTRACCIÓN DE LOS PF PRESENTES EN UN AOVE RICO EN ESTOS COMPONENTES ..	10
4.2 FORMULACIONES TÓPICAS	12
4.2.1 <i>Emulsión tópica</i>	12
4.2.2 <i>Bálsamo labial</i>	13
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
5.1 EXTRACCIÓN DE LOS PF	13
5.2 FORMULACIONES TÓPICAS	15
5.2.1 <i>Emulsión tópica</i>	15
5.2.2 <i>Bálsamo labial</i>	16
5.3 CONTROLES DE CALIDAD DE LAS FORMULACIONES TÓPICAS.....	17

5.3.1	<i>Ensayo de reproducibilidad (E.R) – 29/ 04/ 2025</i>	17
5.3.2	<i>Ensayos de las características organolépticas (O.C)</i>	18
5.3.3	<i>Ensayo de determinación del signo de emulsión (E.S) – 9/05/2025</i>	19
5.3.4	<i>Ensayo microbiológico (E.M)</i>	20
5.3.5	<i>Ensayo de fotosensibilidad (E.F)</i>	21
5.3.6	<i>Ensayo de pH - 8/05/2025</i>	22
5.3.7	<i>Ensayo de extensibilidad (E.X) - 8/05/2025</i>	23
5.4	SOSTENIBILIDAD AMBIENTAL, SOCIAL O ECONÓMICA	23
5.5	LIMITACIONES DEL ESTUDIO	24
6.	CONCLUSIONES	25
6.1	FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN	25
7.	BIBLIOGRAFÍA	26
8.	ANEXO I: ÍNDICE DE ABREVIATURAS	31
9.	ANEXO II: IMÁGENES DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR HPLC	33
10.	ANEXO III: IMÁGENES DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS ENSAYOS MICROBIOLÓGICO (E.M)	34
11.	ANEXO IV: IMÁGENES DE LOS RESULTADOS DEL ENSAYO DE FOTOSENSIBILIDAD (E.F)	38
12.	ANEXO V: IMÁGENES DE LOS RESULTADOS DEL ENSAYO DE PH	41
13.	ANEXO VI: AGRADECIMIENTOS	42

1. RESUMEN

El Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE) es una grasa de origen vegetal que se obtiene del fruto del olivo (*Olea europaea L.*). Es reconocido por su valor nutricional y su alto contenido en componentes bioactivos, entre los que destacan los compuestos fenólicos o polifenoles (PF), los cuales se utilizan en distintos ámbitos debido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas. Por ejemplo, en el ámbito cosmético se utilizan para mejorar la estabilidad y la eficacia de las formulaciones.

El objetivo principal del estudio es desarrollar un proceso de extracción de los PF presentes en el AOVE y evaluar sus propiedades mediante la elaboración de formulaciones cosméticas. Para ello, se consideraron diversas técnicas de extracción, resultando eficaz una disolución de MeOH/H₂O (metanol/agua) en proporción 80:20 volumen/volumen (v/v), seguida de una contraextracción con hexano. Los PF obtenidos se utilizaron en la formulación de productos tópicos con fase externa oleosa.

En las formulaciones se llevaron a cabo diversos estudios para evaluar parámetros como la estabilidad física, la resistencia a la luz, el pH, la extensibilidad sobre la piel y la seguridad microbiológica. Estos análisis permitieron valorar la eficacia del método de extracción y el comportamiento de los extractos fenólicos en las formulaciones cosméticas.

Palabras clave: AOVE, polifenoles, extracción, formulaciones cosméticas y estabilidad.

ABSTRACT

Extra Virgin Olive Oil (EVOO) is a plant-based fat obtained from the fruit of the olive tree (*Olea europaea L.*). It is well known for its nutritional value and high content of bioactive compounds, among which phenolic compounds stand out. These compounds are used in various fields due to their antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial properties. For example, in the cosmetic field, they are used to improve the stability and efficacy of formulations.

The main objective of this study is to develop an extraction process for the phenolic compounds present in EVOO and evaluate their properties through the formulation of cosmetic products. To this end, various extraction techniques were considered, with an 80:20

volume/volume (v/v) MeOH/H₂O (methanol/water) solution proving effective, followed by a counter-extraction with hexane. The obtained phenolic compounds were used in the formulation of topical products designed as systems with an oil external phase.

Various studies were conducted on the formulations to evaluate parameters such as physical stability, light resistance, pH, skin spreadability and microbiological safety. These analyses allowed for the assessment of the extraction method's efficacy and the behavior of the phenolic extracts in the cosmetic formulations.

Keywords: EVOO, polyphenols, extraction, cosmetic formulations and stability.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 *Olea europaea* L.

Especie arbórea de carácter perenne que forma parte de la familia botánica Oleaceae. Es reconocida comúnmente como olivo y, aunque su crecimiento es lento, puede alcanzar una longevidad superior a los mil años. Sus flores son pequeñas y blancas, mientras que su fruto, la aceituna, varía en tamaño, forma y color según la variedad. En España se cultivan diversas variedades, entre las que predominan la Picual, la Arbequina y la Hojiblanca. Destacando la Picual por su elevado contenido en ácidos grasos y antioxidantes naturales, (1).

Desde la antigüedad, el olivo se ha utilizado en ámbitos como la medicina y la nutrición debido a sus propiedades beneficiosas para la salud.

2.2 Caracterización y clasificación del aceite de oliva

2.2.1 Caracterización

Grasa vegetal obtenida del olivo mediante procesos mecánicos e industriales. Homero, poeta griego del siglo VIII a.C., lo denominaba “oro líquido” debido a sus propiedades organolépticas y nutricionales. Su composición química y su calidad dependen de factores como la variedad de la aceituna, el grado de madurez del fruto, las condiciones climáticas y el método de extracción utilizado, (2).

2.2.2 Clasificación

En la antigüedad, se empleaban procesos mecánicos de molturación, obteniendo un único tipo

de aceite de oliva. Sin embargo, a finales del siglo XX se desarrollaron procesos industriales que dieron lugar a su clasificación en Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE), Aceite de Oliva Virgen (AOV), Aceite de Oliva Lampante (AOL) y Aceite de Orujo Crudo (AOC), (3).

El AOVE y el AOV son considerados aptos para el consumo humano directo. Por el contrario, el AOL y el AOC debido a deficiencias en sus características nutricionales y sensoriales, no cumplen con los requisitos mínimos de comercialización. Por ello, deben ser sometidos a procesos industriales de refinado que, aunque corrigen las deficiencias organolépticas, también reducen el contenido de compuestos bioactivos beneficiosos, como los PF, (4, 5). Una vez se finaliza el proceso de refinado, el AOL y el AOC refinados serán mezclados con AOV, permitiendo obtener productos finales aptos para el consumo humano, (6, 7).

2.3 Composición del AOVE

Dado que el AOVE es una variedad que no requiere someterse a procesos industriales para su comercialización, conserva totalmente los compuestos bioactivos beneficiosos para la salud. Sus propiedades saludables se atribuyen principalmente a su elevado contenido lipídico, que constituye la fracción mayoritaria de su composición (98-99%), y está compuesta principalmente por triglicéridos (TG). Sin embargo, también contiene una fracción minoritaria compuesta por componentes con propiedades bioactivas, (8, 9, 10). En la Figura 1 se puede observar la composición del AOVE.



Figura 1: Composición del AOVE.

Elaboración propia. Adaptación de: Extra virgin olive oil polyphenols: Modulation of cellular pathways related to oxidant species and inflammation in aging. Cells. 2020;9(2), (8). Creado con BioRender.

Los PF se encuentran en altas concentraciones en el AOVE, siendo considerados compuestos característicos y distintivos de este tipo de aceite, a diferencia de otros componentes, como los tocoferoles que están presentes en proporciones similares en otros tipos de aceites, (11).

2.4 Propiedades de los compuestos fenólicos

- Propiedades anticancerígenas: Los peroxinitritos son compuestos capaces de inducir procesos de desaminación y nitración del ADN, produciendo rupturas en su cadena y posibles mutaciones. Ciertos PF, como el hidroxitirosol (HT), reducen los efectos bioquímicos producidos por los peroxinitritos. Otros compuestos, como los secoiridoides, se han asociado con la reducción de la actividad de la enzima xantina oxidasa, implicada en la carcinogénesis, (10).
- Propiedades bacteriostáticas y bactericidas: Se ha demostrado la actividad de los secoiridoides frente a una amplia variedad de microorganismos patógenos, entre ellos *Staphylococcus aureus*. A su vez, se ha asociado al HT como un compuesto altamente tóxico para otras cepas, como *Pseudomonas syringae pv.savastanoi*, (10).
- Propiedades digestivas: Se produce una inhibición de la motilidad gástrica al procesar las grasas. El AOVE, al contener un alto contenido de estos compuestos, puede ralentizar el vaciamiento gástrico, controlando la digestión y aumentando la sensación de saciedad, (12).
- Propiedades antioxidantes (AOX): Los radicales libres producen un aumento del estrés oxidativo, un factor relacionado con el envejecimiento, las enfermedades crónicas, los procesos inflamatorios y la inhibición del metabolismo óseo. Los PF estimulan la actividad de enzimas AOX. En concreto, el HT destaca por sus propiedades antiinflamatorias, (13).
- Propiedades beneficiosas para el aparato cardiovascular: Reducen las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el organismo, así como las ceramidas y ciertos marcadores biomoleculares, como la interleucina-1 (IL-1), relacionados con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, (13).
- Propiedades vasoprotectoras: Los PF favorecen la síntesis de óxido nítrico con efecto vasodilatador, y, en consecuencia, la reducción de la presión arterial, (14).

La biodisponibilidad de los PF se ve influenciada por el metabolismo de primer paso, que consiste en una biotransformación a través del hígado de determinadas sustancias al administrarlas por vía oral. Su aplicación tópica es una posible alternativa para aumentar su biodisponibilidad. Teniendo en cuenta que en los últimos años se ha observado un aumento en la incidencia de patologías cutáneas, los PF podrían ser una opción de tratamiento mediante esta vía de administración, (15).

2.5 Agrupación de los compuestos fenólicos

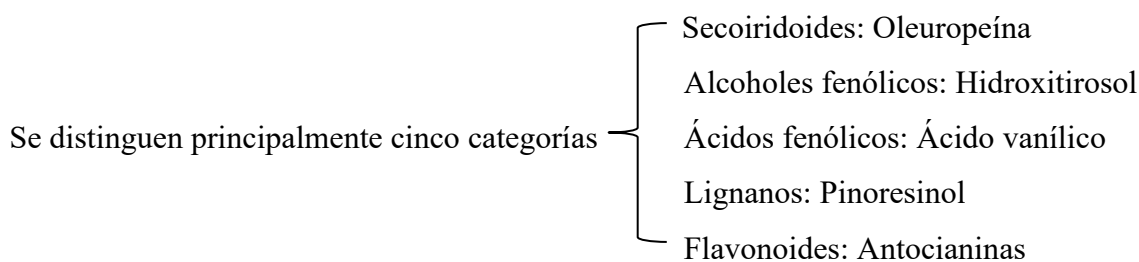


Figura 2: Agrupación de los compuestos fenólicos.
Elaboración propia. Adaptación de: Olive tree (*Olea europaea* L.) leaves: Importance and advances in the analysis of phenolic compounds. *Antioxidants*. 2015;4(4):682–98, (3).

2.5.1 Secoiridoides

Principales compuestos en el AOVE derivado del olivo. La oleuropeína (OLE) se encuentra en altas concentraciones, a diferencia de otros compuestos, como el oleocantal, que, debido a su baja concentración, es difícil de obtener mediante aislamiento y purificación, (16).

Se ha demostrado que la OLE tiene propiedades AOX, antimicrobianas, antitumorales y antiinflamatorias. Tiene la capacidad de inhibir la oxidación de las LDL y eliminar sustancias producidas por los neutrófilos en procesos inflamatorios que pueden dañar proteínas y enzimas esenciales para el organismo, (17). A medida que el olivo madura, la concentración de la OLE disminuye debido a una hidrólisis enzimática que la transforma en HT, (18).

2.5.2 Alcoholes fenólicos y derivados

Algunos factores como la radiación ultravioleta (UV) reducen la síntesis de colágeno, provocan daño en el ADN, inducen la desnaturalización de proteínas, alteran la pigmentación cutánea y favorecen la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), pudiendo desencadenar en procesos de apoptosis. Estas alteraciones activan una respuesta inflamatoria que, mantenida en el tiempo, pueden dañar tejidos y células sanas, produciendo enfermedades como el cáncer, la hipertensión arterial y ciertas enfermedades cardíacas, (19).

El HT es un compuesto derivado de la hidrólisis de la OLE que destaca por sus propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas en ciertos tipos de cáncer como el de colon y mama. El consumo de este compuesto es seguro incluso en dosis elevadas, (19, 20).

2.5.3 Ácidos fenólicos y derivados

Primeros PF identificados en el AOVE. En este grupo destaca el ácido p-cumarínico, que tiene similitud estructural con la L-tirosina, el sustrato natural de la enzima tirosinasa humana, la cual está implicada en la melanogénesis celular al convertir la tirosina en melanina. El ácido p-cumarínico inhibe selectivamente la tirosinasa humana, siendo eficaz para evitar el desarrollo de eritemas y pigmentaciones cutáneas, (21, 22).

2.5.4 Lignanos

Tienen un papel importante en el tratamiento de la diabetes mellitus y sus complicaciones. Presentan una concentración estable en el AOVE debido a que su presencia depende de las condiciones agronómicas en las que se realiza el cultivo del olivo, (23, 24).

2.5.5 Flavonoides

Tienen la capacidad de modular rutas implicadas en la inflamación, la proliferación celular y la apoptosis mediante la neutralización de radicales libres y la modulación de enzimas y receptores celulares. Además, son metabolizados por la microbiota, dando lugar a metabolitos que pueden ejercer efectos biológicos, (26). Debido a la sensibilidad a la luz, el calor y el oxígeno, su concentración en el AOVE puede disminuir con el tiempo, (24).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos principales

- Puesta a punto de un método de extracción de PF presentes en un AOVE rico en estos componentes.
- Extracción de polifenoles.
- Elaboración de formulaciones tópicas con fase externa oleosa a partir de los PF extraídos

3.2 Objetivos secundarios

- Realización de ensayos de calidad de las formulaciones tópicas elaboradas.

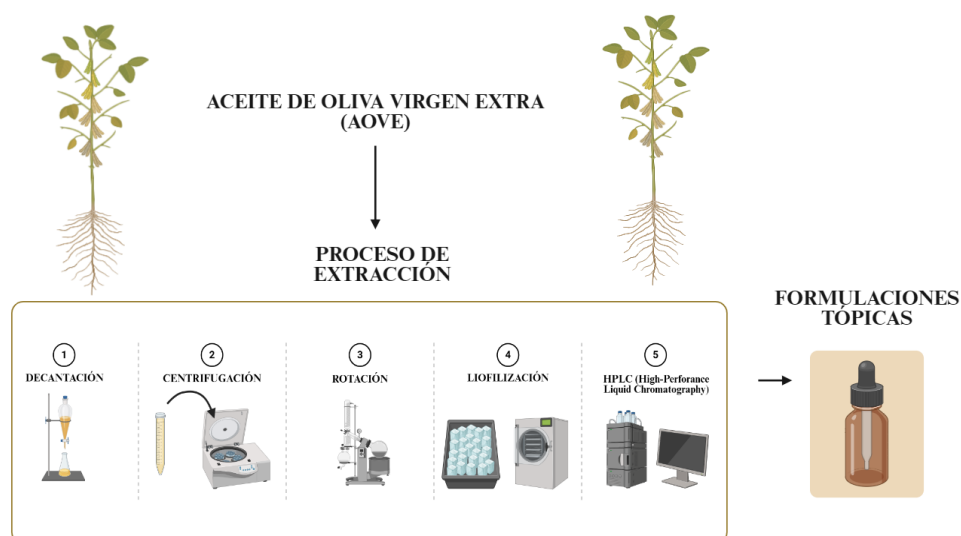


Figura 3: Objetivos principales y secundarios del estudio.
Elaboración propia. Creado con BioRender.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Extracción de los PF presentes en un AOVE rico en estos componentes

El estudio se llevó a cabo mediante el método de extracción líquido-líquido, (LLE), (27). Para la extracción de estos compuestos presentes en un AOVE rico en estos componentes, de variedad picual y de producción ecológica, es necesario seleccionar un disolvente orgánico polar, capaz de establecer interacciones con los grupos hidroxilo de los PF. Se deben seleccionar disolventes seguros. Por ejemplo, aunque el fosfato de tributilo ha demostrado ser efectivo, su uso se ha relacionado con riesgos ambientales y tóxicos para la salud, (27, 28).

El procedimiento se llevó a cabo mediante etanol (EtOH), un alcohol polar considerado seguro y disponible a gran escala. Tiene una densidad de $0,789 \text{ g/cm}^3$ y un bajo punto de ebullición ($78,3 \text{ }^\circ\text{C}$) lo que facilita su posterior evaporación, (29, 30, 31).

4.1.1 Extracción mediante EtOH y hexano

Decantación

En un embudo de decantación se añaden 10 gramos (g) de AOVE y 30 mililitros (mL) de EtOH al 70% como disolvente, y se mezclan ambos por agitación. Se llevan a cabo un total de tres decantaciones continuas, seguidas de un proceso de contraextracción con 10 mL de hexano, un disolvente orgánico utilizado por su capacidad para extraer compuestos apolares presentes en el AOVE favoreciendo la extracción de los PF al reducir la presencia de sustancias lipofílicas que podrían interferir en el proceso, (32, 33).

Tras el proceso de extracción y contraextracción, se obtienen dos fases. Por un lado, el disolvente con los compuestos polares del AOVE disueltos, entre los que se encuentran los PF, y, por otro lado, el AOVE restante.

4.1.2 Extracción mediante metanol / agua y hexano (MeOH / H₂O)

Decantación

Se utilizaron 40 g de AOVE y una disolución de 96 mL de MeOH y 26 mL de H₂O (80:20 v/v). El MeOH es un disolvente polar con un punto de ebullición de 64,7 °C y una densidad de 0,792 g/cm³, (32). Se añaden 40 mL de hexano para realizar el proceso de contraextracción.

Centrifugación

Método de separación de los componentes presentes en una muestra en función de ciertos parámetros, como la densidad, (9). El proceso se lleva a cabo utilizando los tubos Falcon de MeOH, con el fin de separar posibles restos de AOVE presentes en el disolvente. Se realiza a una temperatura de 20°C y 1.500 revoluciones por minuto (rpm) durante cinco minutos.

Rotación

Técnica basada en la extracción del disolvente mediante su evaporación y posterior condensación. Se tienen en cuenta tres factores: la temperatura, la presión y la rotación, (35).

La rotación de MeOH se lleva a cabo a una velocidad moderada y a unos parámetros iniciales de 40°C y 80 milibares (mbar). Es opcional recubrir el matraz con papel de aluminio para prevenir el enranciamiento de los PF. Esta etapa tiene una duración de 30 minutos.

Liofilización

Método de eliminación del disolvente. En primer lugar, se congela la muestra para que se encuentre en estado sólido y se pueda llevar a cabo la segunda etapa, donde se produce la sublimación del disolvente. La liofilización permite mantener la estructura y función de la muestra al evitar vías de degradación que podrían ocurrir a temperatura ambiente, (36).

El extracto obtenido mediante el proceso de rotación se congela a -80° C durante 24 horas y se liofiliza mediante un liofilizador Schneider Electric Harmony. Tras este proceso, se diluye la muestra y se analiza mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)

Método utilizado para la caracterización y la detección de compuestos e impurezas. Para ello, se inyecta la muestra en el puerto de inyección y atraviesa la columna cromatográfica mediante la fase móvil (FM), compuesta normalmente por H₂O y un compuesto orgánico. En la columna se encuentra la fase estacionaria (FE), y la muestra establece interacciones con ambas fases, produciéndose así una separación de los componentes.

Los compuestos cromóforos, como el anillo de benceno, son identificados mediante detectores al absorber la luz UV y emitir una señal a una determinada longitud de onda. Sin embargo, los compuestos no cromóforos, como los triglicéridos, no absorben la luz UV y son detectados mediante otros tipos de detectores, (37).

Para la detección de HT y OLE, se utiliza un HPLC con un filtro de 0,22 micrómetros (μM), una FM compuesta por ACN/H₂O y una fase estacionaria de columna reversa C18. El acetonitrilo (ACN), a diferencia de otros disolventes, tiene una baja viscosidad dando lugar a una separación más rápida y unos picos más definidos en el cromatograma.

Se utiliza un equipo Hewlett Packard 1100 con un Diode Array Detector (DAD) 1260 Infinity II, en longitudes de onda de 280 nanómetros (nm) para la detección de los compuestos cromóforos. La identificación de compuestos no cromóforos o impurezas se realiza mediante un Refractive Index Detector (RID), que detecta desvíos en la dirección de la luz causados por los índices de refracción de los componentes que no absorben la luz UV. Los datos se procesan mediante el software ChemStation de Agilent.

4.2 Formulaciones tópicas

4.2.1 Emulsión tópica

El objetivo del estudio es desarrollar una formulación dirigida a pieles secas y deshidratadas, con la mayor cantidad de PF posibles, con una textura oleosa y una elevada permeabilidad, para asegurar una adecuada absorción y un efecto prolongado sobre la piel. Se lleva a cabo una formulación con fase externa oleosa (FO).

Se lleva a cabo la formulación de la fase acuosa (FA) y la FO de forma independiente. Los componentes sólidos, como la masa esteárica o el aceite de coco se calientan previamente

mediante una placa calefactora para facilitar su incorporación a la formulación. Una vez formuladas ambas fases, se añaden los emulgentes y los componentes minoritarios (CM) a sus respectivas fases. En este caso, se utilizan emulgentes pertenecientes a la FO y CM pertenecientes a la FA excepto el tocoferol, de naturaleza oleosa.

Por último, se adiciona gradualmente la FA sobre la FO dando lugar a una emulsión con fase interna acuosa y fase externa oleosa (W/O).

4.2.2 Bálsamo labial

La finalidad del estudio es desarrollar una formulación dirigida a labios secos y/o agrietados para proporcionarles hidratación y reparación. Para ello, se lleva a cabo una formulación W/O, donde la textura oleosa favorece su aplicación y una textura emoliente al labial. Se formula mediante el mismo procedimiento descrito en la emulsión.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Extracción de los PF

La LLE mediante MeOH/H₂O ha demostrado ser eficaz para la extracción de los PF presentes en la muestra. Los resultados se observaron mediante HPLC (Anexo II).

En investigaciones realizadas previamente como las de Jiménez-Herrera S, Ochando-Pulido JM y Martínez-Ferez donde se comparan diversos métodos de extracción, se afirma que LLE es capaz de extraer toda clase de PF. Sin embargo, otras técnicas de extracción como la sólido-líquido, no son eficaces para extraer compuestos de naturaleza glucósida, como la OLE.

Mediante el estudio se corrobora la eficacia de la técnica LLE para extraer toda clase de PF.

5.1.1 Extracción mediante EtOH y hexano

Durante el proceso de decantación, el EtOH se sitúa en la fase superior debido a su menor densidad respecto al AOVE. Los PF disueltos en el EtOH, se concentran al evaporar el disolvente mediante rotación. Esta etapa tiene una duración de 45 minutos.

No se detectó la presencia de PF mediante HPLC, lo que indica que el disolvente empleado no fue adecuado para la extracción de estos compuestos. La contraextracción mediante hexano

resultó ser ineficaz debido a que se trata de dos líquidos parcialmente miscibles entre ellos, por lo tanto, no se produce una separación efectiva entre ambas fases.

A diferencia de diversos estudios previos como el llevado a cabo por K. Waszkowiak, no se puede confirmar la capacidad del EtOH al 70% para la extracción de PF. Los resultados obtenidos podrían corroborar las investigaciones de M. Librán C, Mayor L, M. Garcia-Castello E y Vidal-Brotons D, donde afirman que existen varios parámetros como la concentración, el tiempo de extracción o la temperatura, que pueden afectar al rendimiento del proceso.

5.1.2 Extracción mediante MeOH/ H₂O y hexano

Durante el proceso de decantación, el MeOH se sitúa en la fase superior debido a su menor densidad respecto al AOVE. Una vez separadas ambas fases, los PF disueltos en la disolución de MeOH/H₂O se concentran al evaporar el disolvente por rotación durante 30 minutos. Este proceso tiene una duración menor que con el disolvente utilizado anteriormente, ya que el MeOH tiene un punto de ebullición más bajo que el EtOH. Por lo tanto, a la misma temperatura se evapora con mayor facilidad, lo que permite llevar a cabo un proceso de rotación más rápido.

Tras este proceso, se lleva a cabo la liofilización, donde se obtienen 120 mg de extracto que se diluyen en 8mL de H₂O, y, posteriormente, en una dilución 1:1 de ACN/ H₂O. De esta dilución se extraen 10 µL para poder identificar el extracto mediante HPLC. La FM, ACN/H₂O, es polar al igual que la OLE. Por ello, la OLE queda más tiempo retenida en la columna cromatográfica y se detecta en tiempos mayores que el HT, un compuesto parcialmente polar.

Dado que el HT y la OLE presentan en su estructura química grupos cromóforos, como los anillos de benceno, y absorben luz UV a 280 nm, pueden ser detectados mediante DAD1 A (280 nm). A una velocidad de flujo de 0,8 mL/min, el HT aparece en el minuto 11,291, mientras que la OLE lo hace aproximadamente en el minuto 23. Según se evidencia en estudios previos con el mismo tiempo de retención, (34). (Anexo II).

Estos resultados permitieron confirmar la eficacia del disolvente MeOH/H₂O en proporciones 80:20 (v/v) para la extracción de PF. Además, resultó útil la contraextracción realizada con hexano, debido a que el MeOH y el hexano son dos compuestos totalmente inmiscibles entre ellos. También se puede determinar la presencia de impurezas mediante RID 1.

Estos resultados confirman los datos obtenidos en investigaciones previas como las de Mora-Barrantes JC y Morera Ramos L, donde afirman que el MeOH puro no tiene la capacidad de extraer gran cantidad de PF por su capacidad limitada para disolver compuestos altamente polares. Sin embargo, el rendimiento de la reacción aumenta en presencia de H₂O. Los resultados coinciden con otras investigaciones, como la realizada por Radzali SA, Markom M y Saleh NM donde comprueban la eficacia de la disolución de MeOH/H₂O como disolvente en procedimientos de extracción.

En el caso de utilizar MeOH puro, el hexano podría mezclarse parcialmente con el disolvente sin producirse una separación definida de las fases, resultando ineficaz el proceso de contraextracción.

5.2 Formulaciones tópicas

5.2.1 Emulsión tópica

El objetivo era desarrollar una emulsión con la mayor cantidad de PF posible. Por eso, se realizaron formulaciones con una alta proporción de FO, dando lugar a dos primeras formulaciones inestables y a la necesidad de disminuir esta fase progresivamente. Se desarrolló la formulación C, la cual, a pesar de encontrarse ligeramente saturada, demostró ser estable, pero no contaba con la textura oleosa deseada para pieles secas y agrietadas.

Se incorporaron emulgentes y agentes espesantes como el alcohol estearílico y la carboximetilcelulosa, que actúan como estabilizantes y contribuyen a una textura más cremosa. Se aumentó la cantidad de emulgentes hasta un 10% y la proporción de aceites con propiedades emolientes, como el aceite de caléndula, el monoestearato de glicerilo y el alcohol estearílico. Por último, se redujo la cantidad de propilenglicol, un humectante que proporciona una textura acuosa.

Estos cambios dieron lugar a la última formulación, que además de ser estable, contaba con la textura deseada. Los resultados obtenidos se pueden observar en la Tabla 1, en la Imagen 1 y en la Imagen 2.

	%A	%B	%C	%D
FASE ACUOSA	30	35	37	41
Agua de hamamelis	20	25		25
Propilenglicol	10	10	17	15
Glicerol			20	1
Carboximetilcelulosa				
FASE OLEOSA	53	51	49	42
AOVE	23	23	22,5	10
Aceite de coco	11	18	16	5
Aceite de caléndula	3,5	3,5	3	10
Aceite de aguacate	3,5	3,5	3	
Masa esteárica	12	3	4,5	
Monoestearato de glicerilo				12
Alcohol estearílico				5
EMULGENTES	3	7	7	10
Masa esteárica		4		
Span 80	3	3		
Glicerilo			3	
Miristato de isopropilo			2	10
Monoestearato de glicerilo			2	
OTROS	7	7	7	7
Tocoferol	1,5	1,5	1,5	1,5
Ácido ascórbico	1,5	1,5	1,5	1,5
Ácido cítrico	1	1	1	1
Dexpantenol	1	1	1	1
Ácido hialurónico	1	1	1	1
Colágeno marino	1	1	1	1



Imagen 1: Formulación A (FA)



Imagen 2: Formulación B (FB)

Tabla 1: Formulación de 30 gramos de emulsión.

Creado con BioRender. Imagen 1: Formulación de la emulsión correspondiente a la formulación A (12/03/2025).

Imagen 2: Formulación correspondiente a la formulación B (13/04/2025).

En contraste con los valores establecidos por el Formulario Nacional (FN), se elaboraron formulaciones con una proporción de FO superior a la recomendada, dando lugar a emulsiones inestables. Al reducir progresivamente el contenido de la FO, se logró una formulación final que, teniendo en cuenta la naturaleza de los emulgentes y de los CM, se encuentra ligeramente saturada. Sin embargo, como las diferencias respecto a los valores recomendados son mínimas, se obtiene una formulación estable. Estos resultados respaldan la importancia de ajustarse a los valores recomendados por el FN y a la importancia de una correcta selección de los emulgentes para garantizar una adecuada formación de la emulsión.

5.2.2 Bálsamo labial

El objetivo de la formulación era desarrollar una formulación estable con la mayor cantidad de PF posibles. La formulación demostró ser estable con una aplicación uniforme y textura homogénea. Los resultados se muestran en la Tabla 2 y en la Imagen 3.

A diferencia de los datos establecidos en el FN, donde se recomiendan valores máximos del 50% para la FO, esta formulación presenta una proporción superior al tener en cuenta la naturaleza de los emulgentes. Sin embargo, la formulación demuestra ser estable. Este resultado podría deberse a que, aunque la formulación se encuentra saturada, no existen

diferencias significativas con los datos establecidos. El estudio confirma la importancia de ajustarse a los valores proporcionados por el FN para elaborar formulaciones estables.



COMPONENTES	%
FASE ACUOSA	40
Glicerol	38
Dexpantenol	2
FASE OLEOSA	50
AOVE	25
Masa esteárica	8,3
Ciclometicona	8,2
Aceite de abeja	7
Talco	1,5
EMULGENTES	10
Miristato de isopropilo	5
Monoestearato de glicerilo	5

Imagen 3

Tabla 2: Formulación de 10 gramos de bálsamo
Creado con BioRender. Imagen 3: Formulación del bálsamo (3/04/2025).

5.3 Controles de calidad de las formulaciones tópicas

5.3.1 Ensayo de reproducibilidad (E.R) – 29/ 04/ 2025

Evalúa la capacidad de replicar un estudio y obtener unos resultados idénticos, y, por lo tanto, fiables. Se trata de un ensayo fundamental para demostrar la validez de la formulación. Existen dos métodos principales: por un lado, el ensayo de repetibilidad, en el que la formulación se realiza bajo condiciones idénticas, es decir, el mismo día y con parámetros ambientales constantes y, por otro lado, el ensayo de reproducibilidad, que se realiza en distintos días y bajo condiciones ambientales menos controladas, (38).

El estudio se realiza mediante el ensayo de reproducibilidad dado que permite demostrar una validez mayor de la formulación al justificar que pequeñas variaciones en los factores externos no afectan a la calidad de la formulación. Los resultados se muestran en la Imagen 4.

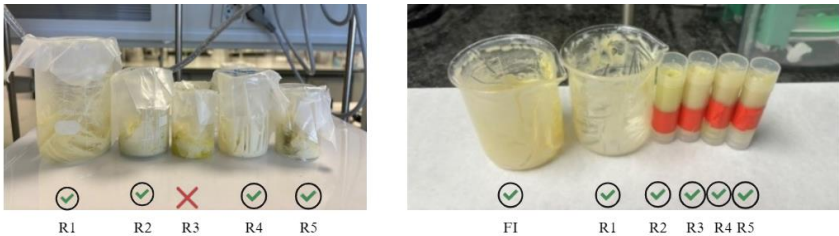


Imagen 4: E.R de la emulsión y el bálsamo respectivamente
(FI: Formulación inicial, R1: Réplica 1, R2: Réplica 2, R3: Réplica 3, R4: Réplica 4, R5: Réplica 5)
(v reproducible/ x no reproducible). Elaborado con BioRender.

Las formulaciones realizadas se pueden considerar reproducibles, dado que únicamente la réplica 3 (R3) de la emulsión no tiene propiedades idénticas al resto. Estos resultados confirman los métodos utilizados previamente en otras investigaciones, como las realizadas por Kowalska M, Ziomek M y Żbikowsk, donde afirman que un estudio puede considerarse reproducible si, al realizar seis formulaciones, solo una de ellas difiere del resto.

5.3.2 Ensayos de las características organolépticas (O.C)

Este análisis se realiza mediante el protocolo de evaluación sensorial. Los resultados obtenidos se pueden observar en la Tabla 3 y en la Imagen 5.

	AROMA										COLOR										TEXTURA									
	EMULSIÓN					BÁLSAMO					EMULSIÓN					BÁLSAMO					EMULSIÓN					BÁLSAMO				
	24 h	7 d	35 d	42 d	49 d	24 h	7 d	35 d	42 d	49 d	24 h	7d	35 d	42 d	49 d	24 h	7d	35 d	42 d	49 d	24 h	7d	35 d	42 d	49 d	24 h	7d	35 d	42 d	49 d
FI	A	A	C	C	C	A	A	SA	SA	A	CE	E	A	A	A	A	A	A	A	A	H	H	N	N	N	H	H	H	H	H
R 1	A	A	C	C	C	A	A	SA	SA	SA	EC	E	C	A	A	A	A	A	A	A	H	L	N	N	N	H	L	H	L	H
R 2	A	A	A	A	C	A	A	C	C	A	EC	E	C	A	A	A	A	A	EC	EC	H	L	N	N	N	H	L	H	L	H
R 3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	E	E	A	A	A	A	A	A	A	A	N	N	N	N	N	H	H	H	H	H
R 4	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	EC	E	C	A	R	A	R	A	A	A	H	L	N	N	N	H	L	H	L	H
R 5	A	A	A	A	A	A	A	C	C	A	EC	E	C	R	R	A	R	A	A	EC	H	L	N	N	N	H	L	H	L	H

Tabla 3: Resultados obtenidos en los ensayos de O.C. AA: Amarillo Ácido. AR: Amarillo Arena. EC: Amarillo Ceroso. C: Aroma Ceroso. A: Aroma aceite. SA: Sin Aroma. HL: Textura Homogenea Ligera. NH: No homogénea.

Hasta la tercera semana, todas las formulaciones conservaron su estabilidad, a excepción de la R3 de la emulsión, la cual presentó inestabilidad desde el inicio del estudio.



Imagen 5: Réplicas de la emulsión tras tres semanas de formulación.
(A: R1, B: R2, C/F: R3, D: R4 y E: R5).

Como se puede observar en la Imagen 6, a partir de la quinta semana se observa un proceso de desestabilización en el resto de emulsiones. En relación con los bálsamos, el análisis visual realizado no mostró variaciones en sus propiedades físicas a lo largo del tiempo, lo que indica que las emulsiones mantuvieron sus características iniciales durante el periodo de evaluación.



Imagen 6: Réplicas de la emulsión tras cinco semanas de la formulación.
(A: FI, B: R1, C: R2, D: R3, E: R4 y F: R5).

Considerando que ambas formulaciones contienen elevadas concentraciones de FO, y que los bálsamos han demostrado estabilidad a lo largo del tiempo, mientras que las emulsiones no, es posible que cualquier mínima variación en las condiciones ambientales o de almacenamiento pueda inducir un proceso de desestabilización, tal como menciona Anica Petkovic en su estudio sobre la estabilidad oxidativa de las emulsiones. Este hecho corrobora la importancia de respetar los límites establecidos por el FN.

5.3.3 Ensayo de determinación del signo de emulsión (E.S) – 9/05/2025

Se basa en el principio de que las emulsiones con FO externa no son miscibles en agua, (39). Para llevar a cabo el estudio, se añade H₂O en una probeta con una pequeña cantidad de la muestra, la ausencia de turbidez en el agua indicará que se trata de una formulación W/O, (40).

Se observa un cambio en la integridad de la R4 de la emulsión al entrar en contacto con el agua. Respecto a los bálsamos, todas las formulaciones mantuvieron sus características iniciales sin alteraciones. En la Imagen 7 y en la Imagen 8 se muestran los resultados obtenidos.



Imagen 7: E.E de las emulsiones dispuestas secuencialmente. (Se observan de izquierda a derecha: FI, R1, R2, R3, R4, R5).

Imagen 8: E.E de los bálsamos dispuestos secuencialmente. (Se observan de izquierda a derecha: FI, R1, R2, R3, R4, R5).

Como mencionan S. Cumbreno y F. Pérez en sus estudios sobre la estabilidad del signo de emulsión, al tratarse de una emulsión con FO externa, presenta características apolares, y, por lo tanto, es inmiscible con el agua debido a su naturaleza polar, (41).

Este estudio corrobora la eficacia del procedimiento descrito en el FN para determinar el signo de emulsión. Se pudo confirmar que la mayoría de las formulaciones no sufrieron una inversión de las fases, con excepción de la R4 de la emulsión, la cual, sí sufrió variaciones al entrar en contacto con el H₂O, demostrando inestabilidad en su signo de emulsión. Este hecho podría deberse a que factores externos, como la temperatura, hayan inducido un cambio en sus fases.

5.3.4 Ensayo microbiológico (E.M)

El ensayo permite determinar los microorganismos presentes en las formulaciones, garantizando su seguridad microbiológica. El recuento microbiano en agar sangre se considera el método de elección debido a su alta eficacia en la detección de microorganismos, tal como mencionan algunos autores como Cordero-Ramos en sus estudios sobre microbiología, (42). Se complementa con la realización del ensayo en Mueller-Hinton (MHA), para tener un espectro más amplio de microorganismos detectables. Estos dos medios de cultivo se diferencian en su capacidad para favorecer el crecimiento de distintos tipos de microorganismos. MHA es un medio de cultivo donde se reproducen bacterias de crecimiento rápido, mientras que el agar sangre está enriquecido, permitiendo el crecimiento de microorganismos que necesitan condiciones más específicas, (43).

El ensayo se realiza tras cinco semanas de la elaboración de las formulaciones, con una duración de dos semanas. Por un lado, el estudio se lleva a cabo sin la presencia de PF y por otro, utilizando los compuestos previamente extraídos. Esta comparación permite analizar de manera cualitativa cómo estos componentes influyen en el comportamiento y en las propiedades de las formulaciones. Para realizar este ensayo, se disuelve una pequeña cantidad de la muestra en H₂O y se lleva a cabo la siembra en el medio de cultivo.

Respecto a la emulsión, no se observó contaminación en ninguna de las muestras utilizadas para el ensayo sin la presencia de PF. Sin embargo, con la presencia de estos compuestos se observó contaminación en la R1 y R5 en MHA y en la R1, R2 y R4 en agar sangre. Esto se puede deber a una contaminación por factores externos durante el desarrollo del ensayo. En los bálsamos se detectó contaminación microbiana en la mayoría de las formulaciones en ambos medios de cultivo, con y sin la presencia de extracto. La evolución del estudio se puede observar en el Anexo III y los resultados obtenidos en la Tabla 4 y en la Tabla 5.

	MHA		AGAR SANGRE	
	SIN PF	PF	SIN PF	PF
FI	-	-	-	-
R1	-	+	-	+
R2	-	-	-	+
R3	-	-	-	-
R4	-	-	-	+
R5	-	+	-	-

Tabla 4: E.M en la emulsión.

(- ausencia de contaminación y + presencia de contaminación).

	MHA		AGAR SANGRE	
	SIN PF	PF	SIN PF	PF
FI	-	+	-	-
R1	-	-	+	-
R2	+	+	+	-
R3	+	+	-	-
R4	+	-	-	-
R5	-	+	+	-

Tabla 5: E.M en el bálsamo

(- ausencia de contaminación y + presencia de contaminación).

El bálsamo presentó una contaminación mayor en comparación con la emulsión. Esta diferencia podría deberse a que la emulsión posee un mejor balance de emulgentes, de humectantes y de AOX, como el ácido ascórbico y el tocoferol, que favorecen el mantenimiento de la estabilidad y reducen la carga microbiana. Mientras que, el bálsamo no contiene ni conservantes ni AOX siendo más susceptible a la contaminación microbiana.

Los PF no mostraron actividad antimicrobiana en los bálsamos cuando se evaluaron en MHA, pero sí se pudo observar en el medio de agar sangre. Esto podría demostrar la eficacia de los PF frente a cepas que requieren condiciones de crecimiento más exigentes, pero no frente a cepas de crecimiento rápido o menos exigentes. Sin embargo, en el caso de la emulsión, también se presencia contaminación en el medio de agar sangre. Por lo tanto, no se pueden obtener resultados concluyentes de la actividad antimicrobiana de los PF, a diferencia de estudios previos como el de Toshitsugu Taguri sobre la actividad antimicrobiana de los PF.

5.3.5 Ensayo de fotosensibilidad (E.F)

Las radiaciones UV pueden producir alteraciones en las características organolépticas de las formulaciones, (44). Se realizó un estudio a lo largo de dos semanas comparando las diferencias entre las formulaciones protegidas y las expuestas a la luz UV. Además, en el caso de las emulsiones, se observó la influencia de los PF (Anexo IV).

Respecto a la eficacia de los PF, no se produjeron modificaciones en las características organolépticas de las emulsiones expuestas a la luz UV sin PF, con excepción de la R4. Sin embargo, con la presencia de PF, estas alteraciones no se observaron en la misma. Por el contrario, sí se observaron alteraciones en la R2 con la presencia de estos componentes. En cuanto a los bálsamos, no se observaron modificaciones significativas tras la exposición prolongada a la luz UV en ninguna de las réplicas obtenidas.

Respecto a la eficiencia del envase opaco, no se observaron diferencias significativas entre las formulaciones protegidas y las expuestas de ambas formulaciones.

A diferencia de estudios previos, como el de Anica Petkovic sobre la mejora de la estabilidad oxidativa de emulsiones cosméticas con extractos de plantas, no es posible obtener conclusiones definitivas sobre la influencia de la radiación UV directa en la estabilidad de las

formulaciones. Dado que, en la mayoría no se produjeron modificaciones. En el estudio realizado por Petkovic no se especifica la duración del ensayo, por lo tanto, las modificaciones podrían deberse a una exposición más prolongada a la luz UV.

No es posible obtener resultados definitivos sobre la eficacia de los PF para evitar las modificaciones organolépticas causadas por la luz UV. Dado que, en el caso de la R4 de la emulsión, que sufrió modificaciones en sus características organolépticas cuando se encontraba expuesta a la luz UV sin la presencia de estos componentes, no las sufrió con PF. Sin embargo, la R2 si sufrió modificaciones. Sería necesario realizar investigaciones a mayor escala que permitan obtener resultados más concluyentes.

No es posible determinar la eficiencia del envase opaco al no existir diferencias significativas entre las formulaciones protegidas y expuestas a la luz UV.

5.3.6 Ensayo de pH - 8/05/2025

La piel presenta un pH ácido que la protege frente a patógenos externos, agentes irritantes y la pérdida de humedad. Las formulaciones tópicas deben respetar este valor para evitar alterar el equilibrio cutáneo. Por ello, las formulaciones elaboradas deben rondar a un pH aproximado de 4,5 - 6.

Para llevar a cabo este ensayo, se humedece la muestra a analizar con una tira reactiva con la capacidad de determinar intervalos de pH. Se compara visualmente el color obtenido con los estándares establecidos, (45). En la formulación inicial de la emulsión se observa un pH aproximadamente igual a 7, por ello, se añade una disolución de ácido cítrico (AC) en H₂O para acidificar la formulación. En el resto de formulaciones se obtienen valores iniciales de pH dentro del rango (Anexo V).

De acuerdo con el artículo sobre la capacidad del AC para acidificar una formulación del pH llevado a cabo por Maxwell LCorso, (46). La disolución de AC/H₂O resultó ser eficaz para reducir el pH. Esto se confirmó mediante la formulación inicial de la emulsión, la cual presentaba un pH superior al recomendado para la piel facial. Sin embargo, el pH disminuyó significativamente tras la adición de la disolución, ajustándose a los valores de pH óptimos.

5.3.7 Ensayo de extensibilidad (E.X) - 8/05/2025

Tiene como objetivo medir la capacidad de una formulación para extenderse homogéneamente. En el caso de los bálsamos, el ensayo se realizó utilizando el formato roll-on para poder evaluar si la formulación es apta para este tipo de formato. Sin embargo, en el caso de las emulsiones, el ensayo se llevó a cabo sobre la piel.

En el caso de las emulsiones, el E.X no mostró resultados positivos, esto podría deberse a la inestabilidad de las formulaciones que dieron lugar a una extensibilidad no uniforme sobre la piel. Sin embargo, en el caso de los bálsamos, demostraron ser aptos para su presentación en formato roll-on. El resultado del ensayo en los bálsamos se puede observar en la Tabla 6.

	35d					
	FI	R1	R2	R3	R4	R5
ALTA			•	•	•	•
MEDIA	•	•				
BAJA						



Tabla 6: E.X del bálsamo.
Creado con BioRender.

Imagen 9: Fomato roll-on.

5.4 **Sostenibilidad ambiental, social o económica**

Para la realización de las formulaciones se tuvieron en cuenta varios aspectos como la educación de calidad, la salud y el bienestar, la vida de los ecosistemas terrestres y, por último, la producción y el consumo responsables.

El AOVE empleado en las formulaciones ha sido obtenido a partir de olivares situados en Jaén. Su extracción se realiza mediante procedimientos mecánicos, sin llevar a cabo procesos de refinado ni tratamientos químicos que puedan generar emisiones tóxicas. Además, al tratarse de un producto de origen ecológico, está libre de pesticidas y fertilizantes químicos sintéticos, minimizando el impacto ambiental y contribuyendo a la conservación de la biodiversidad.

Para las formulaciones tópicas, además de utilizar AOVE como componente principal en ambas formulaciones, se han incorporado otros componentes de origen natural por sus propiedades beneficiosas para la piel. En el caso de la emulsión, se ha utilizado el agua de Hamamelis por sus propiedades calmantes, (47). El aceite de coco y el aceite de caléndula por

sus propiedades hidratantes y antiinflamatorias, (48). El aceite de aguacate por su alto contenido en ácidos grasos esenciales que ayudan a la regeneración cutánea. El tocoferol y el ácido ascórbico por sus propiedades antioxidantes, (49). El ácido cítrico para regular el pH. El dexpantenol y el ácido hialurónico por sus propiedades hidratantes, (50). Y, por último, el colágeno marino para proporcionar firmeza a la piel, (37).

Para el bálsamo, se han utilizado otros compuestos como el aceite de abeja que actúa como agente oclusivo al formar una barrera protectora sobre la piel, ayudando a retener la humedad, (51). También contiene dexpantenol, que favorece la hidratación y la reparación de la barrera cutánea, (52).

La sostenibilidad de las formulaciones cosméticas ha adquirido una gran importancia en la investigación científica por la alta demanda de productos de origen vegetal, éticos y sostenibles. El envase utilizado para las formulaciones es de vidrio biofotónico reciclable.

5.5 Limitaciones del estudio

- a. Extracción de PF mediante EtOH: El estudio se llevó a cabo mediante EtOH al 70%, sin obtener los resultados esperados. La eficiencia del proceso puede verse influenciada por procesos de oxidación y de degradación si no se controlan adecuadamente ciertos factores externos, como la temperatura o el pH. En el estudio, no se aplicaron condiciones de laboratorio controladas rigurosamente, lo que pudo haber sido un factor limitante para el rendimiento de la extracción.
- b. Selección limitada de disolventes: La extracción se llevó a cabo mediante EtOH al 70% y MeOH/H₂O. El estudio podría ampliarse teniendo en cuenta otras concentraciones de EtOH o mediante otros disolventes como la acetona y el isopropanol.
- c. Condiciones ambientales no controladas rigurosamente: El estudio no se realizó en condiciones de laboratorio controladas estrictamente, lo que pudo afectar al rendimiento de la extracción y a la estabilidad de las formulaciones.
- d. Escala de laboratorio: En el estudio se desarrollan seis formulaciones cosméticas, limitando la capacidad de comparar en profundidad el efecto de distintos excipientes o de las cantidades del extracto. Un mayor número de formulaciones habría permitido un análisis más detallado.

6. CONCLUSIONES

1. El método de LLE resultó ser eficaz para la extracción de PF presentes en la muestra mediante el disolvente MeOH/H₂O 80:20 (v/v).
2. Se obtienen 120 mg / 8 mL (15 mg / mL) de PF a partir de la muestra analizada.
3. Cada emulsión de 30 gramos contiene de media 4,5 mg de PF, y, cada bálsamo de 15 gramos, 2,25 mg.
4. Las condiciones de almacenamiento incluyen significativamente en la estabilidad de las formulaciones.

6.1 Futuras líneas de investigación

Los resultados obtenidos y las limitaciones encontradas durante el estudio dan lugar a diversas propuestas de investigación.

- a. Comparación entre distintos métodos de extracción: Analizar las diferencias en el rendimiento y la eficacia entre las técnicas sólido-líquido y líquido-líquido para seleccionar la técnica más adecuada en la extracción de HT, debido a que la OLE no es apta para la extracción sólido-líquido. Se pueden considerar otras técnicas como ultrasonido y microondas.
- b. Comparación entre distintas concentraciones de EtOH y MeOH/H₂O: Analizar distintas concentraciones para comparar la eficiencia de los disolventes en diferentes concentraciones.
- c. Elaboración de las formulaciones en condiciones de laboratorio controladas: Elaborar las formulaciones bajo condiciones de laboratorio estrictamente controladas.
- d. Uso de residuos: Considerar la revalorización de los residuos generados durante el proceso de extracción, desde una perspectiva de sostenibilidad y economía circular.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Ramon T. (Universidad de Huelva). Files Bartolome Vazquez Bernal. 2013;1–7.
2. Rodrigues N, Pinho T, Casal S, Peres AM, Baptista P, Pereira JA. Chemical characterization of oleaster, *olea europaea* var. *sylvestris* (mill.) lehr., oils from different locations of northeast portugal. *Appl Sci*. 2020;10(18).
3. Abaza L, Taamalli A, Nsir H, Zarrouk M. Olive tree (*Olea europaea* L.) leaves: Importance and advances in the analysis of phenolic compounds. *Antioxidants*. 2015;4(4):682–98.
4. Pérez-Camino MC, Ruiz-Méndez M V., Márquez-Ruiz G, Dobarganes MC. Virgin and refined olive oils: Differences in glyceridic minor compounds. *Grasas y Aceites*. 1993;44(2):91–6.
5. Lucci P, Bertoz V, Pacetti D, Moret S, Conte L. Effect of the refining process on total hydroxytyrosol, tyrosol, and tocopherol contents of olive oil. *Foods*. 2020;9(3):1–11.
6. Vidal AM, Moya M, Alcalá S, Romero I, Espínola F. Enrichment of Refined Olive Oils with Phenolic Extracts of Olive Leaf and Exhausted Olive Pomace. *Antioxidants*. 2022;11(2):1–15.
7. DOUE. Reglamento de ejecución 26 marzo 2013. 2013;(4).
8. Serreli G, Deiana M. Extra virgin olive oil polyphenols: Modulation of cellular pathways related to oxidant species and inflammation in aging. *Cells*. 2020;9(2).
9. Gümüş A, Zengi O, Kazezoğlu C, Uçar KT, Coşkun C, Tek S, et al. Assessment of centrifugation knowledge among medical laboratory personnel: a survey-based study. *BMC Med Educ*. 2025;25(1).
10. Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, Di Majo D, Giammanco S, La Guardia M. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr Res Rev*. 2005;18(1):98–112.
11. Gorzynik-Debicka M, Przychodzen P, Cappello F, Kuban-Jankowska A, Gammazza AM, Knap N, et al. Potential health benefits of olive oil and plant polyphenols. *Int J Mol Sci*. 2018;19(3).
12. Jimenez-Lopez C, Gallardo-Gomez M, Simal-Gandara J, Carpena M, Lorenzo JM,

- Lourenço-Lopes C, et al. Bioactive Compounds and Quality of Extra Virgin Olive Oil. *Foods*. 2020;135–42.
13. James MJ, Gibson RA, Cleland LG. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr*. 2000 Jan 1;71(1):343S-348S.
 14. Cárdeno A, Sánchez-Hidalgo M, Alarcón-de-la-Lastra C. An Up-date of Olive Oil Phenols in Inflammation and Cancer: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Curr Med Chem*. 2013;20(37):4758–76.
 15. Burin T, Grohar MC, Jakopic J, Veberic R, Hudina M. Fermented olives (*Olea europaea* L.): A detailed insight into morphological changes and phenolic profile from harvest to jar. *Food Chem X*. 2025;26(December 2024):102309.
 16. Filardo S, Mattioli R, Di Risola D, Mosca L, Di Pietro M, Sessa R. *Olea europaea* L.-derived secoiridoids: Beneficial health effects and potential therapeutic approaches. *Pharmacol Ther*. 2024 Feb 1;254:108595.
 17. Omar SH. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Sci Pharm*. 2010;78(2):133–54.
 18. Vilaplana-Pérez C, Auñón D, García-Flores LA, Gil-Izquierdo A. Hydroxytyrosol and Potential Uses in Cardiovascular Diseases, Cancer, and AIDS. *Front Nutr*. 2014;1(October):1–11.
 19. Jeon S, Choi M. Anti-inflammatory and anti-aging effects of hydroxytyrosol on human dermal fibroblasts (HDFs). *Biomed Dermatology*. 2018;2(1):1–8.
 20. Bertelli M, Kiani AK, Paolacci S, Manara E, Kurti D, Dhuli K, et al. Hydroxytyrosol: A natural compound with promising pharmacological activities. *J Biotechnol*. 2020 Feb 10;309:29–33.
 21. Echeverría F, Ortiz M, Valenzuela R, Videla LA. Hydroxytyrosol and cytoprotection: A projection for clinical interventions. *Int J Mol Sci*. 2017;18(5).
 22. Servili M, Sordini B, Esposto S, Urbani S, Veneziani G, Di Maio I, et al. Biological activities of phenolic compounds of extra virgin olive oil. *Antioxidants*. 2014;3(1):1–23.
 23. Boo YC. p-coumaric acid as an active ingredient in cosmetics: A review focusing on its

- antimelanogenic effects. *Antioxidants*. 2019;8(8).
24. Vicario G, Cantini C, Francini A, Raffaelli A, Cifelli M, Domenici V, et al. Olive Fruit Ripening Degree and Water Content Relationships with Phenolic Acids and Alcohols, Secoiridoids, Flavonoids and Pigments in Fruit and Oil. *Molecules*. 2023;28(19).
 25. Isah MB, Tajuddeen N, Yusuf A, Mohammed A, Ibrahim MA, Melzig M, et al. The antidiabetic properties of lignans: a comprehensive review. *Phytomedicine*. 2025;141(March):156717.
 26. Cornaggia C, Manoni F, Torrente E, Tallon S, Connon SJ. A catalytic asymmetric reaction involving enolizable anhydrides. *Org Lett*. 2012;14(7):1850–3.
 27. Jiménez-Herrera S, Ochando-Pulido JM, Martínez-Ferez A. Comparison between different liquid-liquid and solid phase methods of extraction prior to the identification of the Phenolic fraction present in olive oil washing wastewater from the two-phase olive oil extraction system. *Grasas y Aceites*. 2017;68(3):1–12.
 28. Wazeer I, Hizaddin HF, Wen NX, El Blidi L, Hashim MA, Hadj-Kali MK. Extraction of Phenol as Pollutant from Aqueous Effluents Using Hydrophobic Deep Eutectic Solvents. *Water (Switzerland)*. 2023;15(24).
 29. Zhang Y, Zhou WE, Yan JQ, Liu M, Zhou Y, Shen X, et al. A review of the extraction and determination methods of thirteen essential vitamins to the human body: An update from 2010. *Molecules*. 2018;23(6):1–25.
 30. Waszkowiak K, Gliszczynska-Świgło A. Binary ethanol–water solvents affect phenolic profile and antioxidant capacity of flaxseed extracts. *Eur Food Res Technol*. 2016;242(5):777–86.
 31. Salelign K, Duraisamy R. Sugar and ethanol production potential of sweet potato (*Ipomoea batatas*) as an alternative energy feedstock: processing and physicochemical characterizations. *Heliyon*. 2021;7(11):e08402.
 32. Nazaroff WW, Weschler CJ. Methanol and ethanol in indoor environments. *Indoor Environ*. 2024;1(4):100049.
 33. Mora-Barrantes JC, Morera Ramos L, Ulate-Salas M, Núñez-Agüero V, Acuña-Salazar E, Cordero-Carvajal M. Clasificación del riesgo químico de solventes orgánicos mediante la aplicación del método “CHEM21 selection guide of classical- and less

- classical-solvents”. Un caso de estudio en cursos de docencia universitaria de química orgánica y bioquímica. *Rev Tecnol en Marcha*. 2021;35:28–43.
34. Tasioula-Margari M, Tsabolatidou E. Extraction, separation, and identification of phenolic compounds in virgin olive oil by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Antioxidants*. 2015 Sep 1;4(3):548–62.
 35. Bnyan R, Cesarini L, Khan I, Roberts M, Ehtezazi T. The effect of ethanol evaporation on the properties of inkjet produced liposomes. *DARU, J Pharm Sci*. 2020;28(1):271–80.
 36. Kasper JC, Friess W. The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *Eur J Pharm Biopharm*. 2011;78(2):248–63.
 37. Chew YL, Khor MA, Lim YY. Choices of chromatographic methods as stability indicating assays for pharmaceutical products: A review. *Heliyon*. 2021;7(3):e06553.
 38. Diario Oficial de la Unión Europea. REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) 2021/808 DE LA COMISIÓN de 22 de Marzo de 2021. 2021;2014:3–20.
 39. Cumbreno S, Pérez F. Procedimientos Normalizados De Laboratorio: Determinación Del Signo De La Emulsión. *Offarm*. 2004;23(4):1–5.
 40. Nacional F. A G E N C I A E S P A Ñ O L A D E M E D I C A M E N T O S Y P R O D U C T O S S A N I T A R I O S D E T E R M I N A C I Ó N D E L S I G N O D E L A E M U L S I Ó N.
 41. Zygouri P, Spyrou K, Mitsari E, Barrio M, Macovez R, Patila M, et al. A facile approach to hydrophilic oxidized fullerenes and their derivatives as cytotoxic agents and supports for nanobiocatalytic systems. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–13.
 42. Cordero-Ramos J, Merino-Bohórquez V, Delgado-Valverde M, Barros-Tornay R, Cameán-Fenández M, Calleja-Hernández MÁ. Formulation, long-term physicochemical and microbiological stability of 15% topical resorcinol for hidradenitis suppurativa. *Eur J Hosp Pharm*. 2020;29(6):313–8.
 43. Al-blooshi SY, Latif MAA, Sabaneh NK, Mgaogao M, Hossain A. Development of a novel selective medium for culture of Gram-negative bacteria. *BMC Res Notes*. 2021;14(1):4–9.

44. Di Bartolomeo L, Irrera N, Campo GM, Borgia F, Motolese A, Vaccaro F, et al. Drug-Induced Photosensitivity: Clinical Types of Phototoxicity and Photoallergy and Pathogenetic Mechanisms. *Front Allergy*. 2022;3(June):1–8.
45. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), Ministerio de Sanidad. PN/L/CP/001/00 - Determinación de pH. *Formul Nac*. 2020;1–5.
46. Corso ML, Woodworth JC, Tokach MD, Gebhardt JT, DeRouchey JM, Goodband RD. 148 Evaluating water characteristics and their effects on reducing water pH using citric acid. *J Anim Sci*. 2024;102(Supplement_2):121–121.
47. Thring TS, Hili P, Naughton DP. Antioxidant and potential anti-inflammatory activity of extracts and formulations of white tea, rose, and witch hazel on primary human dermal fibroblast cells. *J Inflamm*. 2011;8(1):27.
48. Evangelista MTP, Abad-Casintahan F, Lopez-Villafuerte L. The effect of topical virgin coconut oil on SCORAD index, transepidermal water loss, and skin capacitance in mild to moderate pediatric atopic dermatitis: A randomized, double-blind, clinical trial. *Int J Dermatol*. 2014;53(1):100–8.
49. Thiele JJ, Ekanayake-Mudiyanselage S. Vitamin E in human skin: Organ-specific physiology and considerations for its use in dermatology. *Mol Aspects Med*. 2007;28(5–6):646–67.
50. Papakonstantinou E, Roth M, Karakiulakis G. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermatoendocrinol*. 2012;4(3):253–8.
51. Nong Y, Maloh J, Natarelli N, Gunt HB, Tristani E, Sivamani RK. A review of the use of beeswax in skincare. *J Cosmet Dermatol*. 2023;22(8):2166–73.
52. Proksch E, de Bony R, Trapp S, Boudon S. Topical use of dexpanthenol: a 70th anniversary article. *J Dermatolog Treat*. 2017;28(8):766–73.

8. ANEXO I: ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AC: Ácido cítrico

ACN: Acetonitrilo

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AOC: Aceite de Oliva Crudo

AOX: Antioxidante

AOV: Aceite de Oliva Virgen

AOVE: Aceite de Oliva Virgen Extra

AOL: Aceite de Oliva Lampante

CM: Componentes minoritarios

DAD: Diode Array Detector

E.F: Ensayo de Fotosensibilidad

E.M: Ensayo Microbiológico

E.R: Ensayo de Reproducibilidad

E.S: Signo de Emulsión

E.X: Ensayo de Extensibilidad

EtOH: Etanol

FA: Fase Acuosa

FE: Fase Estacionaria

FM: Fase Móvil

FN: Formulario Nacional

FO: Fase Oleosa

g: Gramos

g/cm³: Gramos por centímetro cúbico

H₂O: Agua

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography

HT: Hidroxitirosol

IL: Interleucina

LDL: Low-Density Lipoprotein (Lipoproteínas de baja densidad)

LLE: Liquid-Liquid Extraction

Mbar: Milibar

MeOH: Metanol

mg: Miligramos

mL: Mililitro

MHA: Mueller-Hinton Agar

µm: Micrómetro

nm: Nanómetro

O.C: Características Organolépticas

OLE: Oleuropeína

PF: Polifenoles

R: Réplica

RID: Refractive Oxygen Species

ROS: Reactive Oxygen Species (Especies reactivas de oxígeno)

RPM: Revoluciones Por Minuto

TG: Triglicéridos

UV: Ultravioleta

V/V: Volumen por Volumen

W/O: Water in Oil

9. ANEXO II: IMÁGENES DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR HPLC

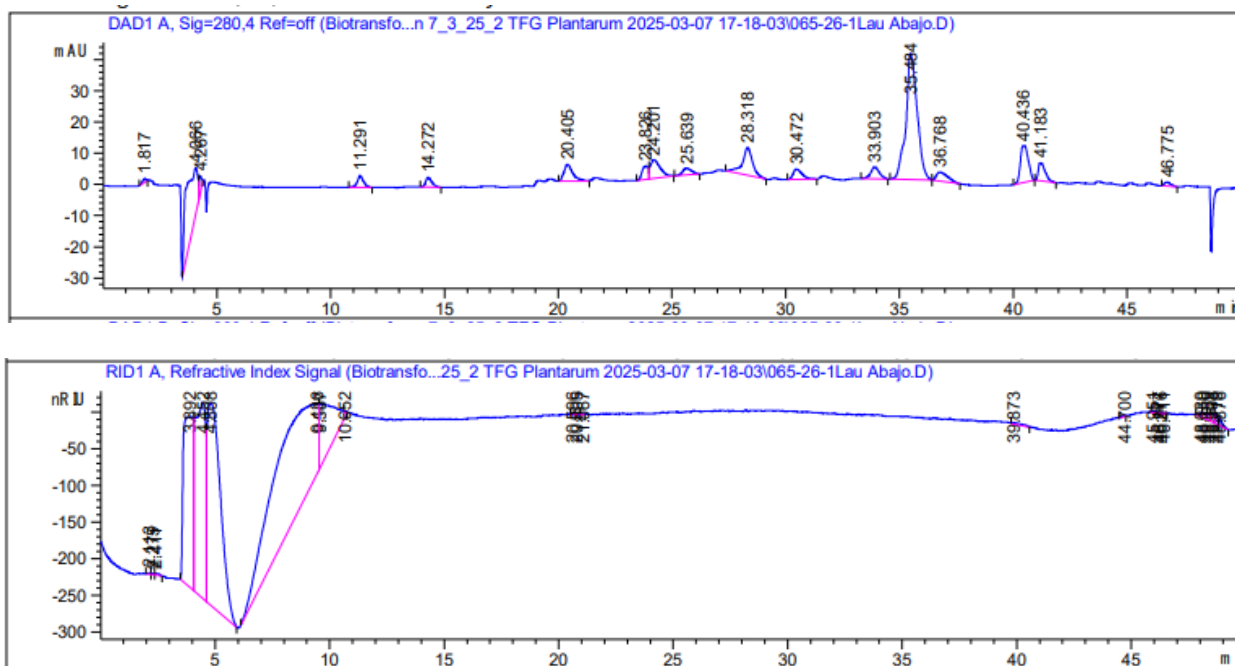


Imagen 10: HPLC: Extracción de PF mediante MEOH. (7/03/2025).

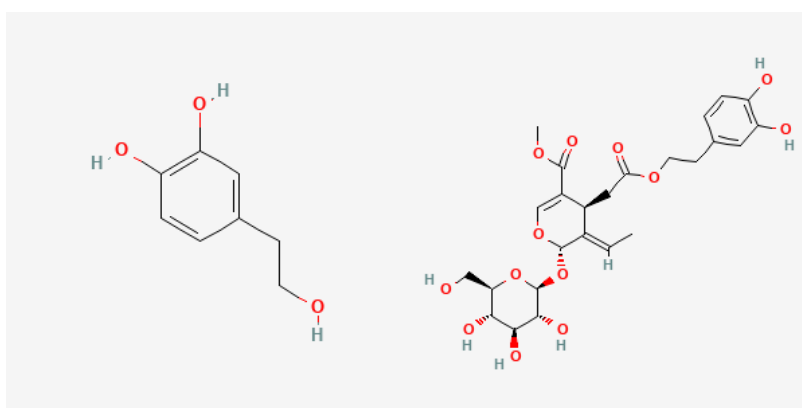


Imagen 11: HT. Obtenida de Pubchem.

Imagen 12: OLE. Obtenida de Pubchem.

10. ANEXO III: IMÁGENES DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS ENSAYOS MICROBIOLÓGICO (E.M)

ENSAYO MICROBIOLÓGICO DE LA EMULSIÓN TÓPICA

- DIA 1**

SIN EXTRACTO

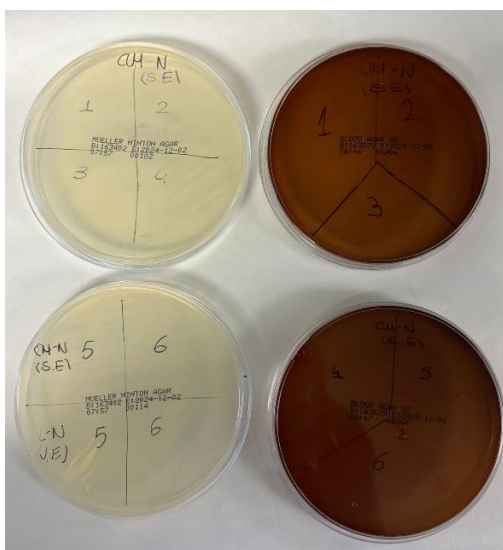


Imagen 13: Resultados obtenidos en el E.M de la emulsión (sin extracto) tras 24h del sembrado.

A la izquierda, cultivo en medio Mueller Hinton; a la derecha, cultivo en agar sangre. (1: FI, 2: R1, 3: R2, 4: R3, 5: R4 y 6: R5).

CON EXTRACTO

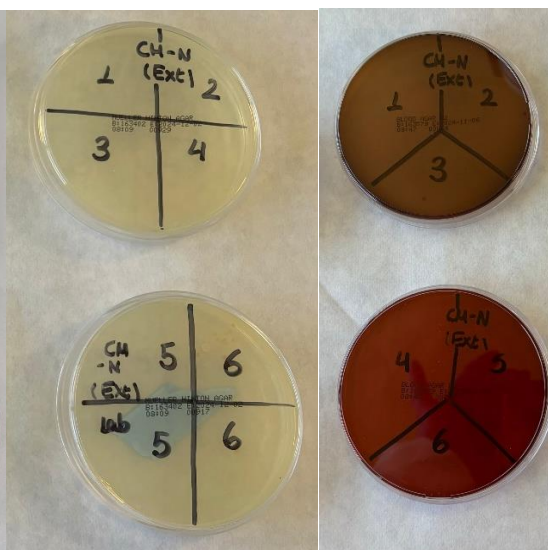


Imagen 14: Resultados obtenidos en el E.M de la emulsión (sin extracto) tras 24h del sembrado.

A la izquierda, cultivo en medio Mueller Hinton; a la derecha, cultivo en agar sangre. (1: FI, 2: R1, 3: R2, 4: R3, 5: R4 y 6: R5).

- SEMANA 1**

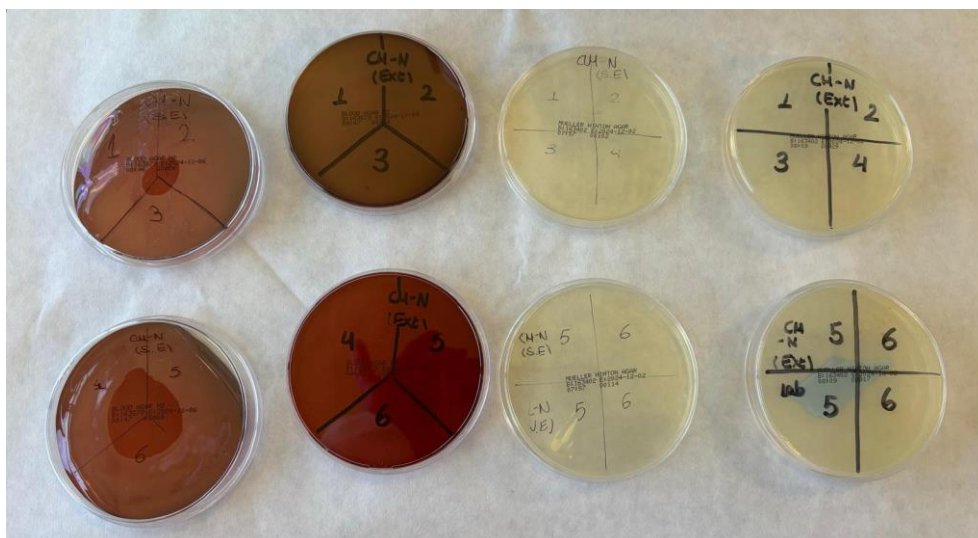


Imagen 15: Resultados obtenidos en el E.M de la emulsión tras siete días del sembrado.

(S.E: sin extracto, ext: extracto). A la izquierda, cultivo en medio agar sangre; a la derecha, cultivo en medio Mueller-Hinton. (1: FI, 2: R1, 3: R2, 4: R3, 5: R4 y 6: R5).

- **SEMANA 2**

SIN EXTRACTO

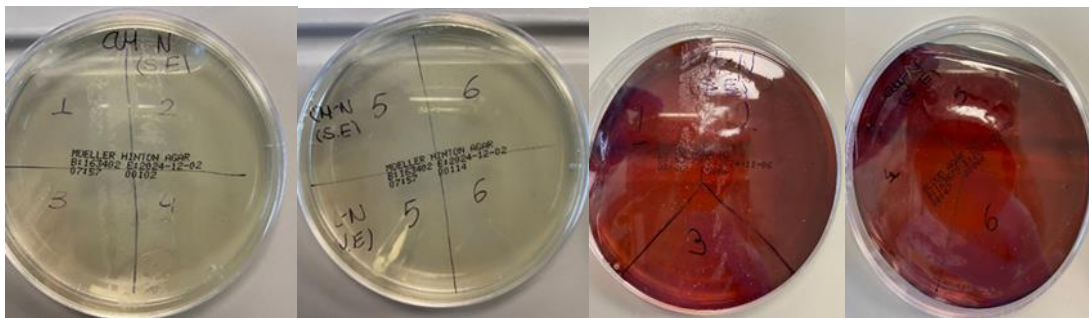


Imagen 16: resultados obtenidos en el E.M de la emulsión (sin extracto) tras dos semanas del sembrado.

Culivo en medio Mueller Hinton, (1: FI, 2: R1, 3: R2, 4: R3, 5: R4 y 6: R5).

Imagen 17: resultados obtenidos en el E.M de la emulsión (sin extracto) tras dos semanas del sembrado.

Cultivo en medio Mueller Hinton, (1: FI, 2: R1, 3: R2, 4: R3, 5: R4 y 6: R5).

CON EXTRACTO



Imagen 18: Resultados obtenidos en el E.M de la emulsión (con extracto) tras dos semanas del sembrado.

En la parte superior, culivo en medio Mueller Hinton; en la parte inferior, cultivo en medio agar sangre, (1: FI, 2: R1, 3: R2, 4: R3, 5: R4 y 6: R5).

ENSAYO MICROBIOLÓGICO DEL BÁLSAMO LABIAL

• DIA 1

SIN EXTRACTO

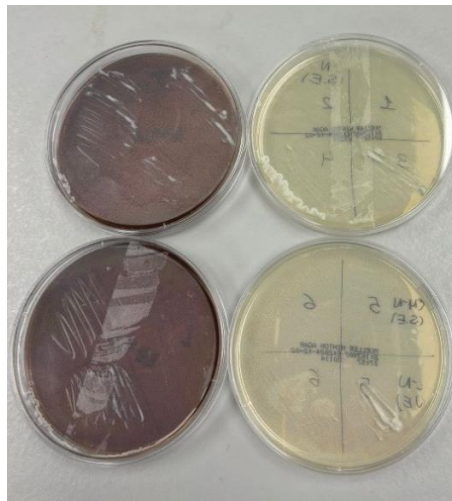


Imagen 19: Resultados obtenidos en el E.M del bálsamo (sin extracto) tras 24h del sembrado. A la izquierda, cultivo en medio agar sangre y a la derecha, cultivo en Mueller-Hinton, (1: FI, 2: R1, 3: R2, 4: R3, 5: R4 y 6: R5).

CON EXTRACTO

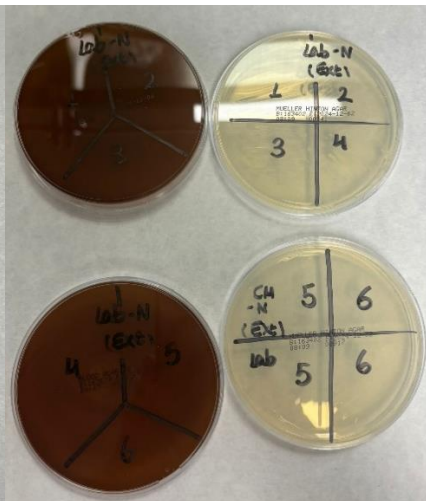


Imagen 20: Resultados obtenidos en el E.M del bálsamo (con extracto) tras 24h del sembrado. A la izquierda, cultivo en medio agar sangre y a la derecha, cultivo en Mueller-Hinton, (1: FI, 2: R1, 3: R2, 4: R3, 5: R4 y 6: R5).

• SEMANA 1

SIN EXTRACTO

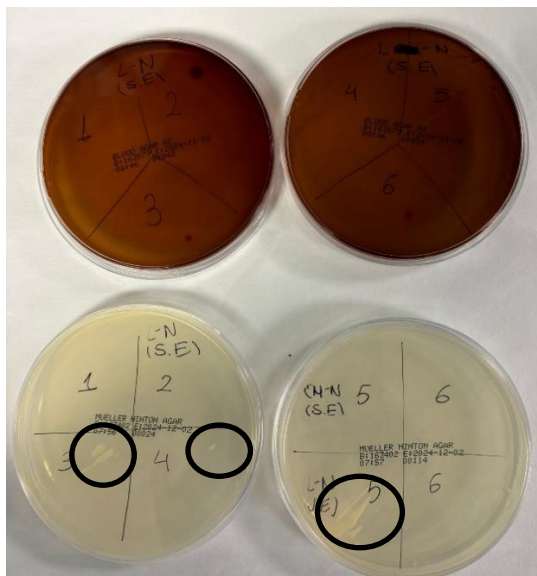


Imagen 21: Resultados obtenidos en el E.M del bálsamo (sin extracto) tras una semana del sembrado. En la parte superior, cultivo en medio agar sangre y, en zona inferior cultivo en Mueller-Hinton, (1: FI, 2: R1, 3: R2, 4: R3, 5: R4 y 6: R5).

CON EXTRACTO

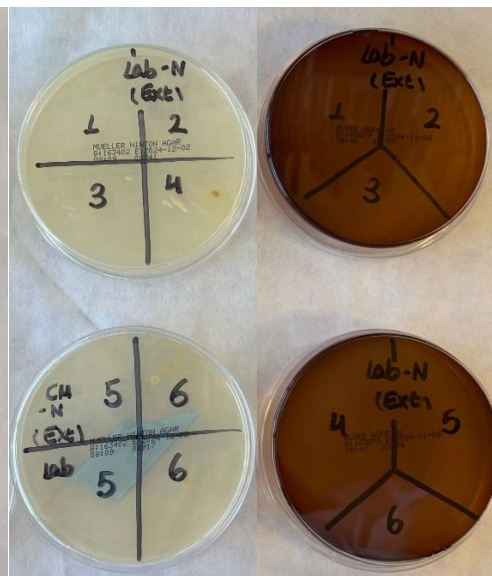


Imagen 22: Resultados obtenidos en el E.M del bálsamo (con extracto) tras una semana del sembrado. A la izquierda, cultivo en medio Mueller-Hinton y, a la derecha cultivo en agar sangre, (1: FI, 2: R1, 3: R2, 4: R3, 5: R4 y 6: R5).

- **SEMANA 2**

SIN EXTRACTO

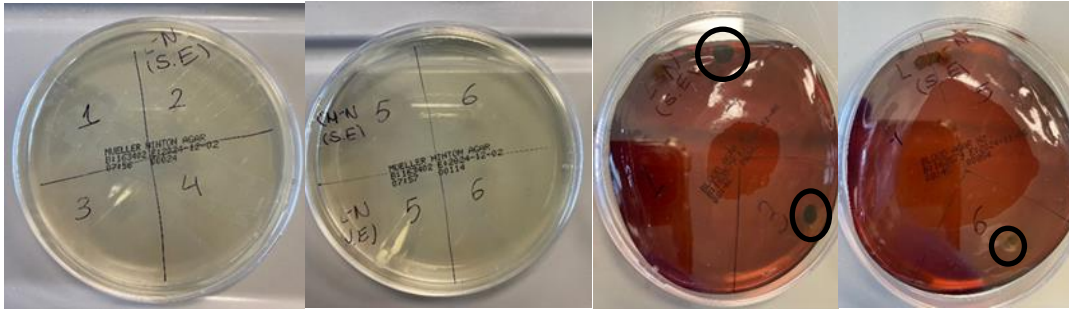


Imagen 23: Resultados obtenidos en el E.M del bálsamo (sin extracto) tras dos semanas del sembrado.

A la izquierda, cultivo en medio Mueller-Hinton y, a la derecha cultivo en agar sangre, (1: FI, 2: R1, 3: R2, 4: R3, 5: R4 y 6: R5).

CON EXTRACTO



Imagen 24: Resultados obtenidos en el E.M del bálsamo (con extracto) tras dos semanas del sembrado.

A la izquierda, cultivo en medio Mueller-Hinton y, a la derecha cultivo en agar sangre, (1: FI, 2: R1, 3: R2, 4: R3, 5: R4 y 6: R5).

11. ANEXO IV: IMÁGENES DE LOS RESULTADOS DEL ENSAYO DE FOTOSENSIBILIDAD (E.F)

ENSAYO FOTOSENSIBILIDAD DE LA EMULSIÓN TÓPICA

- *DIA 1*

SIN EXTRACTO



Imagen 25: Resultados obtenidos en el E.F de la emulsión (sin extracto) tras 24h del inicio del ensayo.
(1: FI, 2: R1, 3: R2, 4: R3, 5: R4 y 6: R5). (a: recipiente expuesto a la luz solar, b: recipiente opaco).

CON EXTRACTO

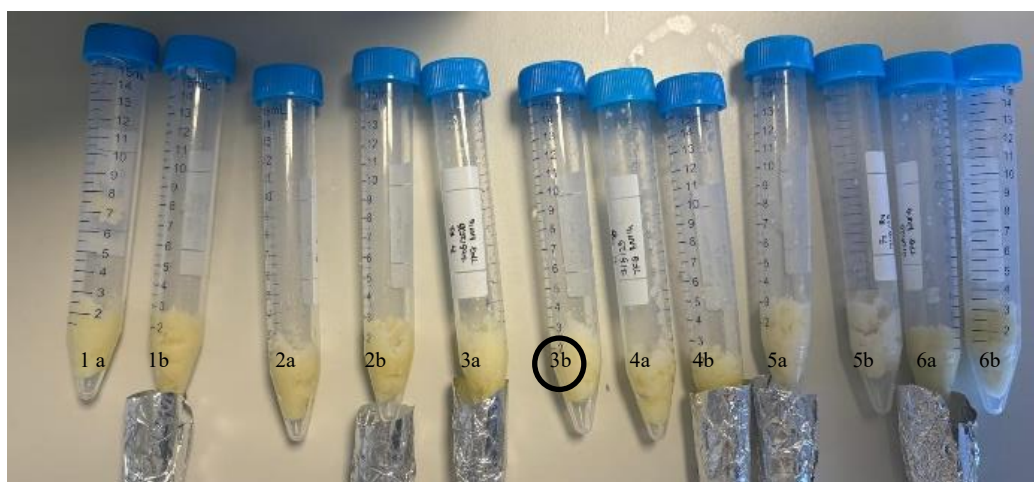


Imagen 26: Resultados obtenidos en el E.F de la emulsión (con extracto) tras 24h del inicio del ensayo.
(1: FI, 2: R1, 3: R2, 4: R3, 5: R4 y 6: R5). (a: recipiente expuesto a la luz solar, b: recipiente opaco).

- **SEMANA 2**

SIN EXTRACTO



Imagen 27: Resultados obtenidos en el E.F de la emulsión (sin extracto) tras dos semanas. del inicio del ensayo.

(1: FI, 2: R1, 3: R2, 4: R3, 5: R4 y 6: R5). (a: recipiente expuesto a la luz solar, b: recipiente opaco).

CON EXTRACTO



Imagen 28: Resultados obtenidos en el E.F de la emulsión (sin extracto) tras dos semanas. del inicio del ensayo.

(1: FI, 2: R1, 3: R2, 4: R3, 5: R4 y 6: R5). (a: recipiente expuesto a la luz solar, b: recipiente opaco).

ENSAYO FOTOSENSIBILIDAD DEL BÁLSAMO LABIAL

- DIA 1**

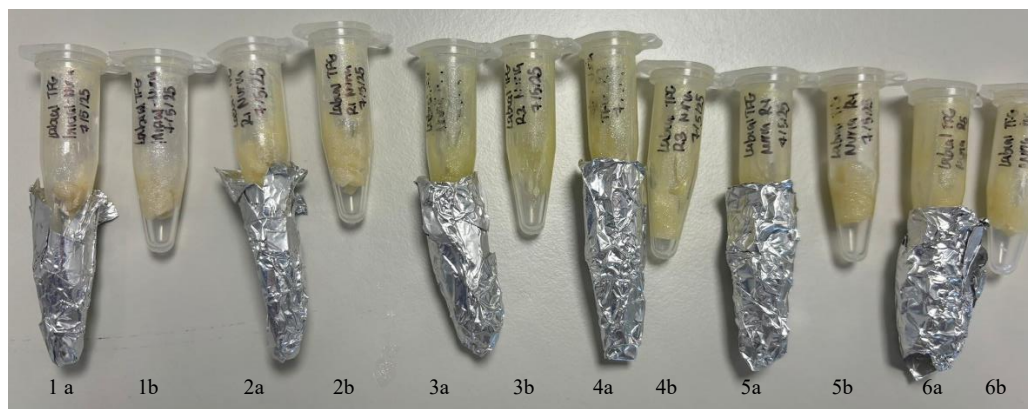


Imagen 29: Resultados obtenidos en el E.F del bálsamo (sin extracto) tras 24h. del inicio del ensayo.

(1: FI, 2: R1, 3: R2, 4: R3, 5: R4 y 6: R5). (a: recipiente expuesto a la luz solar, b: recipiente opaco).

- SEMANA 1**

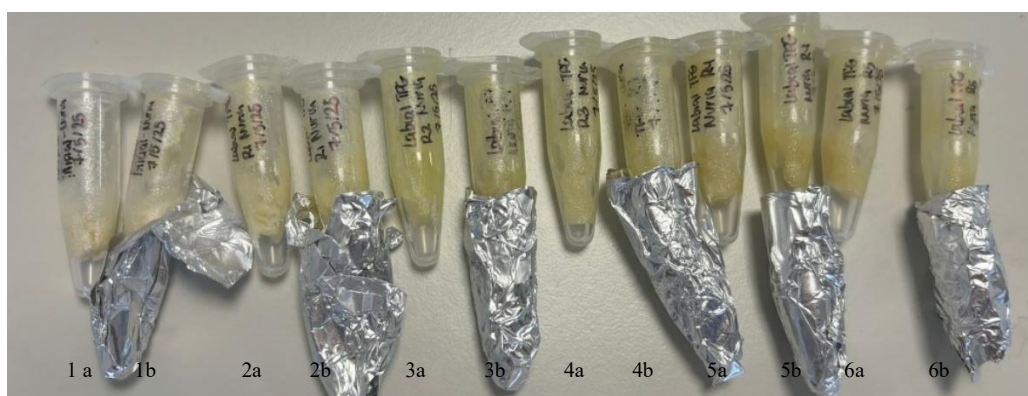
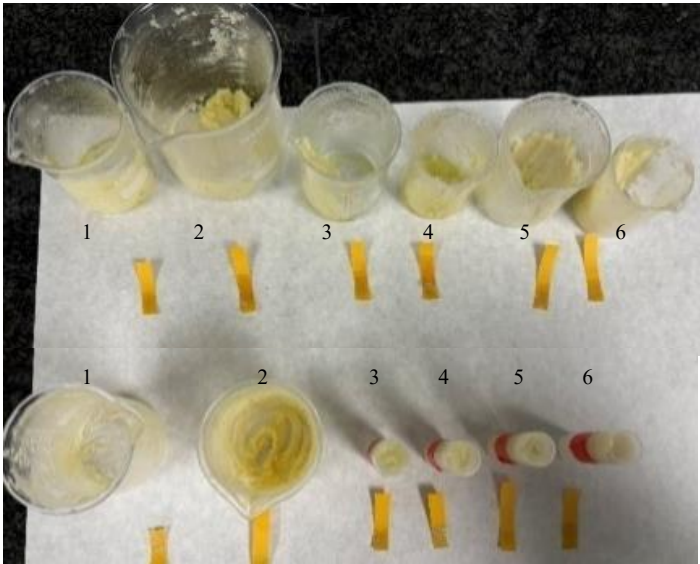


Imagen 30: Resultados obtenidos en el E.F del bálsamo (sin extracto) tras una semana del inicio del ensayo.

(1: FI, 2: R1, 3: R2, 4: R3, 5: R4 y 6: R5). (a: recipiente expuesto a la luz UV, b: recipiente opaco).

12. ANEXO V: IMÁGENES DE LOS RESULTADOS DEL ENSAYO DE pH



Formulación	Emulsión	Bálsamo
Fo	7	5
R1	5	6
R2	6	6
R3	5	7
R4	5	5
R5	5	6

Tabla 7: Resultados obtenidos en el ensayo del pH.

Imagen 31: Resultados obtenidos en del pH del bálsamo.
(1: FI, 2: R1, 3: R2, 4: R3, 5: R4 y 6: R5).

13. ANEXO VI: AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis familiares y amigos por su comprensión durante todo el proceso. En especial a mis padres, quienes siempre me han facilitado el camino y me han proporcionado los recursos necesarios para construir mi futuro.

A mi tutora, Laura Pérez Blázquez, por su guía, dedicación y comprensión. Sus consejos han sido fundamentales para realizar el estudio. Asimismo, mis agradecimientos a Laura Redondo Flórez, por su apoyo durante esta etapa.

Por último, mis agradecimientos a Cielo y Tierra Olive S.L., por proporcionar su AOVE “Phenomenal” necesario para la realización del estudio.