

Aplicación de Metodos Cromatograficos en el estudio de la Composición Química del Aceite de Girasol Ozonizado “OLEOZON[®]”

Oscar Ernesto Ledea Lozano^{1*}, Enrique Martínez Force², Rafael Garcés Mancheño², Manuel Alaiz², Maritza Díaz Gómez¹, Carmen Dobarganes², Jesús Moleiro Mirabal¹, Carlos Hernández Castro¹, Arístides Rosado Pérez³, y Teresa Correa Vidal⁴.

¹ Centro de Investigaciones del Ozono, CNIC, Ave. 15 y Calle 230, Playa, Ciudad de la Habana, Apartado postal 6412, Cuba. Teléfonos: 271-1157, 271-1335, 271-2324, * Email: oscar.ledea@cnic.edu.cu.

² Instituto de la Grasa, CSIC, Padre García Tejero 4, Sevilla, España, Email: rgarcés@cica.es.

³ Centro de Investigaciones Avícolas, Ministerio de la Agricultura, La Lisa, Ciudad de la Habana, Cuba.

⁴ Laboratorios Antidoping, INDER, Calle 100 y Aldabó, Ciudad de la Habana, Cuba.

RESUMEN: El aceite de girasol ozonizado (OLEOZON[®]) es un medicamento desarrollado en el Centro de Investigaciones del Ozono (CNIC). Ha sido registrado nacionalmente para el tratamiento de la epidermofitosis (1999) y para el tratamiento de la giardiasis (2004). Es un producto germicida de amplio espectro, efectivo frente a bacterias, virus, hongos y algunos parásitos. Los objetivos de este trabajo son dar a conocer los métodos cromatográficos empleados en el análisis del OLEOZON[®], así como mostrar los principales resultados en la caracterización química de un producto tan complejo. En este trabajo se emplearon distintos métodos cromatográficos como la extracción líquido-líquido, la separación por columnas de silicagel, la cromatografía de capa delgada, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía de gases (CG). En primer lugar, se extrajeron, identificaron y cuantificaron los compuestos presentes en la fracción volátil del producto, compuesta fundamentalmente por hexanal, nonanal y 3-nonanal. Igualmente, el OLEOZON[®] se separó, por cromatografía de partición, en dos fracciones: en la fracción apolar se recogieron los triglicéridos que no reaccionaron con el ozono y en la fracción polar se concentraron aquellos triglicéridos que si lo hicieron. Los triglicéridos presentes en la fracción apolar se identificaron por CG-FID y los compuestos de menor peso molecular se identificaron por CG-EM. La combinación de todas estas técnicas de separación permitió determinar la composición del OLEOZON[®] en cuanto a cantidad de triglicéridos no modificados, compuestos con peso molecular mayor que los triglicéridos (dímeros y oligómeros), triglicéridos oxidados con funciones peroxídicas, carbonílicas o ácidas y de compuestos con longitudes de cadena de entre seis y nueve átomos de carbono con funciones aldehídicas y carboxílicas. Los métodos analíticos desarrollados en este trabajo para la caracterización del OLEOZON[®] no se habían utilizado previamente para el análisis de ningún aceite vegetal ozonizado.

ABSTRACT: Ozonized Sunflower oil (OLEOZON[®]) is a therapeutical drug developed at the Ozone Research Center (National Center for Scientific Research). It has been national registered for the treatment of skin infections produced by fungi (1999, 2004) and for the treatment of the *giardia lamblia* infection (2004). OLEOZON[®] is a product with a high germicidal power, is effective against virus, bacteria, parasites, and fungi. The aims of this work are to present the chromatographic methods employed in OLEOZON[®] chemical analysis and to show its main results. In this work, different chromatographic methods like: liquid – liquid extraction, partition column separation, thin layer chromatography, high performance liquid chromatography, gas – liquid chromatography, and gas chromatography – mass spectrometry, were employed. Firstly, the OLEOZON[®] volatile and partially volatile compounds were extracted, identified, and quantified. Hexanaldehyde, nonaldehyde, and 3-nonanaldehyde were the main products present on this OLEOZON[®] fraction. Also, OLEOZON[®] was analyzed by partition column chromatography and two fractions were obtained. The triglycerides that have not reacted with ozone were collected in the non-polar fraction, by the contrary; the ozone-modified triglycerides were collected in the polar fraction. The non-polar fraction triglycerides were identified by gas – liquid chromatography and the compounds with lower molecular weights, presents in the same fraction, were identified by gas – chromatography – mass spectrometry. The combination of all the chromatographic techniques employed allow to determine the general composition of OLEOZON[®], taking into consideration the amount of non-modified triglycerides, the content of modified triglycerides (oxidized and polymerized triglycerides), and the lineal compounds with a carbon length between six and nine and carbonylic

or carboxylic functions on its structure. The analytical methods developed in this work for OLEOZON[®] characterization have never been previously employed on the analysis of any ozonized vegetable oil.

Palabras claves: Aceite de Girasol Ozonizado, métodos cromatográficos, HPLC, CG-EM, triglicéridos y ácidos grasos.

Key words: Ozonized sunflower oil, chromatographic methods, HPLC, GC-MS, triglycerides, and fatty acids.

INTRODUCCIÓN

El OLEOZON[®] es un medicamento obtenido a partir de la reacción del ozono con el aceite de girasol, según un procedimiento desarrollado en el Centro de Investigaciones del Ozono del CNIC. Es un germicida de amplio espectro, muy efectivo en el tratamiento de procesos infecciosos producidos tanto por virus como por bacterias, hongos y algunos parásitos.^{1,2} Está registrado nacionalmente para el tratamiento de la epidermofitosis (1999, 2004) y para el tratamiento de la giardiasis (2004).

De forma general, en la literatura internacional prácticamente no existe información sobre la composición química de los aceites vegetales ozonizados, debido a la complejidad de estos productos, y a que tanto los procedimientos de ozonización como sus aplicaciones médicas han sido objeto de patentes. Es necesario señalar que prácticamente todos los aceites vegetales comerciales han sido ozonizados utilizando distintos procedimientos o condiciones de ozonización y han sido objetos de patentes.³⁻⁸ Ninguna de las patentes consultadas incluye en su contenido algún dato acerca de una caracterización más profunda de los aceites vegetales ozonizados, ni hacen referencias al respecto, apreciándose la carencia de información básica sobre el tema. Este aspecto ha sido una gran limitación en el desarrollo de estos productos como medicamentos.

Tanto en las patentes como en los artículos consultados sólo se refiere el empleo de métodos volumétricos en el control del proceso de ozonización o en la caracterización de los productos de la ozonización.⁸ Desde el punto de vista químico básico, se ha tratado de simplificar el sistema real formado por triglicéridos, utilizando modelos más sencillos como los ácidos grasos insaturados o sus ésteres metílicos, como lo demuestran los distintos trabajos publicados sobre el tema.⁹⁻¹¹ Igualmente, se han utilizado las técnicas de Resonancia Magnética Nuclear para el estudio de los compuestos modelos o de los propios aceites vegetales ozonizados, obteniéndose información valiosa y evitándose así, la separación cromatográfica de la compleja mezcla de compuestos presentes.¹⁰⁻¹⁵

Existen muy pocos trabajos publicados previamente referidos al empleo de métodos cromatográficos en el estudio de la composición de los aceites vegetales ozonizados¹⁶ y menos aún sobre el aceite de girasol ozonizado.¹⁷ Sin embargo, contrasta sobremedida la amplia relación de artículos y normativas publicados sobre la aplicación de métodos cromatográficos al análisis de los aceites vegetales, tanto vírgenes como refinados u oxidados.¹⁸⁻²⁴

Los objetivos de este trabajo son dar a conocer los métodos cromatográficos empleados en el análisis del OLEOZON[®], así como mostrar los principales resultados de la aplicación de estos métodos en el fraccionamiento cromatográfico y la caracterización química de este producto.

Cuando el ozono reacciona con los aceites vegetales, lo hace con los triglicéridos insaturados presentes en el aceite de girasol y a través del mecanismo de Criegee (Figura 1), obteniéndose una mezcla compleja de compuestos como son: peróxidos, ozónidos, aldehídos, ácidos carboxílicos, y compuestos poliméricos, entre otros.^{25,26} Debido a la compleja mezcla de productos formados es necesaria la combinación de diferentes técnicas cromatográficas y espectroscópicas para la caracterización de este tipo de producto.

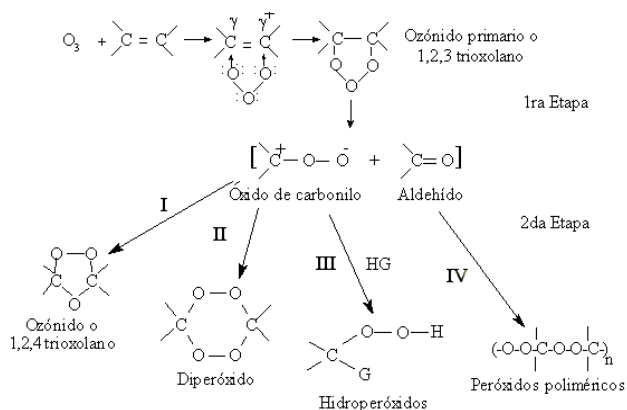


Figura 1. Mecanismo de Criegee para la reacción del ozono con los compuestos insaturados.
Leyenda: I, II, III, IV- diferentes vías de reacción.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Reactivos: ácido clorhídrico (AnalaR[®], BDH, Inglaterra), éter etílico (AnalaR[®], BDH, Inglaterra), ácido sulfúrico (AnalaR[®], BDH, Inglaterra), acetato de etilo (AnalaR[®], BDH, Inglaterra), Trifenilfosfina (99 % SIGMA, USA), kit de triglicéridos patrones (40-60 carbonos, 99 %, SIGMA, USA), trimargarina (99 %, SIGMA, USA), heptadecanoato de metilo (99,99 %, SIGMA, USA), oleato de metilo (99,99 %, SIGMA, USA), linoleato de metilo (99,99 %, SIGMA, USA), triestearina (99,99 %, SIGMA, USA), trioleina (99,99 %, SIGMA, USA), trilinoleina (99,99 %, SIGMA, USA), hidróxido de potasio (p.a. Merck, Alemania), tolueno (p.a. Merck, Alemania), cloroformo (p.a. Merck, Alemania), metanol (p.a. Merck, Alemania), dimetoxipropano (p.a. Merck, Alemania), n-heptano (p.a. Merck, Alemania), n-hexano (p.a. Merck, Alemania), ácido fórmico (p.a. Merck, Alemania), sulfato de sodio anhidro (p.a. Merck, Alemania), silicagel 60 (p.a. Merck, Alemania), placas de silicagel 60 (10x10 cm, Merck, Alemania) y cloruro de sodio (p.a. Merck, Alemania).

Otros materiales: El aceite de girasol utilizado fue de calidad comestible (Agustín Roig S.A., España).

MÉTODOS

- Determinación de la composición de triglicéridos del aceite de girasol.

El análisis de los triglicéridos presentes en el aceite de girasol se realizó por CGL, se utilizó para la identificación de los triglicéridos un kit de triglicéridos patrones. Las muestras se prepararon de la siguiente forma: en un vial con capacidad para 1 mL se colocaron 10 mg de la muestra, 10 μ L de la disolución del patrón interno (trimargarina, 1 g/L) y un mililitro de cloroformo. Se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent 7683 (Agilent Technologies, USA) con inyector automático (Agilent 7683) y un detector de ionización de llama. La columna utilizada fue una DB-17HT (15 m x 250 μ m x 0,15 μ m). La temperatura de la columna se mantuvo a 340 °C durante 20 minutos. La temperatura del inyector se fijó a 370 °C y la del detector a 380 °C. Se utilizó hidrógeno como gas portador a una presión de 80 kPa y un flujo de 1,4 mL/min. Se inyectó en modo divisor de caudal (40:1). El volumen de inyección fue de 3 μ L. Se utilizó nitrógeno como gas de purga a un flujo de 20 mL/min durante dos minutos. Cada muestra se analizó por triplicado.

- Determinación de la composición de ácidos grasos del aceite de girasol.

El análisis de los ácidos grasos presentes en el aceite de girasol se realizó por cromatografía de gases, a través de sus ésteres metílicos preparados según un método descrito previamente.²⁷ El análisis por cromatografía de gases de los ésteres metílicos se realizó con un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 serie II con auto-inyector (HP 6890) y detector de ionización por llama (FID). La columna utilizada fue una SP-2380 (15 m x 250 μ m x 0,15 μ m). El gradiente de temperatura utilizado para la columna fue de 100 °C (1 min.) a 8 °C/min hasta 200 °C. La temperatura del inyector se fijó en 270 °C y la del detector en 280 °C. Se utilizó hidrógeno como gas portador con una presión de 51 kPa (7,5 psi) y un flujo de 1 mL/min. El volumen de inyección fue de 1 μ L. Cada muestra se analizó por triplicado.

- Análisis por Cromatografía de Gases - Espectrometría de Masas.

El análisis por esta técnica incluye la transmetilación de la muestra previamente.²⁷ En el análisis se utilizó un sistema GC-MS Fisons MD-800 (VG Analytical, UK) con un detector de masas cuadrupolar. El sistema operó en modo de impacto electrónico con detección de iones positivos. El voltaje de ionización fue de 70 eV y el rango de masas registrado fue de 2-800 uma. La columna utilizada fue una DB-WAX de 30 m de largo por 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μ m de espesor de la fase líquida. El gas portador utilizado fue helio (11 psi) a un flujo de 1 mL/min. La temperatura de la interfase se fijó a 250 °C, y la de la fuente de iones a 200 °C. El inyector "on column" se mantuvo a 250 °C y se inyectaron 0,5 μ L. El gradiente de temperatura utilizado comenzó a 60 °C (1 min) hasta 220 °C a 8 °C/min y finalmente 220 °C durante 10 min.

- Obtención de la muestra representativa de OLEOZON[®].

La selección de la muestra representativa del medicamento se realizó según la norma cubana vigente.²⁸ Se seleccionaron 15 lotes del producto de forma aleatoria. De cada uno de los lotes seleccionados se tomaron dos frascos de 30 mL de capacidad y se mezclaron en un recipiente de un litro de capacidad. Una vez mezclados homogéneamente, se guardaron en refrigeración (2 -8 °C) en cuatro recipientes de vidrio ámbar, con capacidad para 250 mL, previamente rotulados. Las muestras permanecieron en el refrigerador hasta que se le realizaron los análisis pertinentes.

- Análisis de los compuestos volátiles y parcialmente volátiles presentes en el OLEOZON®.

La determinación de los compuestos volátiles y parcialmente volátiles presentes en el OLEOZON®, se realizó combinando la técnica de extracción líquido-líquido con el análisis por CG-EM (análisis cualitativo) y CG con detección por ionización de llama (análisis cuantitativo). Las condiciones para el desarrollo de este método en el OLEOZON® se establecieron previamente.²⁹

La identificación de los compuestos presentes en el extracto metanólico se realizó utilizando un cromatógrafo de gases de la serie 610 con inyector del tipo “split-splitless”, acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolar de la serie AUTOMASS (UNICAM, England). En la separación se utilizó una columna capilar FFAP de 30 m de largo, 0,25 µm de espesor de la fase líquida y 0,32 mm de diámetro interno. La temperatura del inyector del cromatógrafo se fijó a 240 °C, mientras que la de la fuente iónica del detector cuadrupolar, fue a 250 °C y la de la interfase a 240 °C. La temperatura del horno se programó de 40 °C (1 min.) hasta 100 °C a 4 °C/min., siguiendo a 8 °C/min, hasta 220 °C (5 minutos). El intervalo de masas barrido fue de 30 a 400 uma y se trabajó con un voltaje de ionización en la fuente de 70 eV. El gas portador utilizado fue helio con un flujo de 1 mL/min y una presión de 0,4 MPa. El volumen de muestra fue de 1 µL y no se utilizó división de caudal durante 30 s (modo de inyección “splitless”); posteriormente se mantiene una relación de caudal de 20:1.

La determinación de la concentración de los compuestos se realizó por CG-FID, utilizando el método del patrón interno. Se empleó un cromatógrafo de gases de la serie 610 dotado de un inyector “split-splitless” (UNICAM, England). Se emplearon las mismas condiciones descritas para el análisis cualitativo por CG-EM excepto que la temperatura del detector se situó a 280 °C.

La cuantificación se realizó combinando los métodos del estándar interno y de la curva de calibración. Como patrones internos se utilizaron el octanal para la cuantificación de los aldehídos y el ácido octanoico para la cuantificación de los ácidos carboxílicos. Los factores de respuesta cromatográficos se determinaron experimentalmente preparando disoluciones de igual concentración de los analitos y el patrón correspondiente (0,01 mol/L) y analizándolas por CG en diez ocasiones. Por su parte, la determinación de los recobrados de los compuestos en la extracción se realizó utilizando el método de la curva de calibración. La concentración de los analitos en la muestra real se determinó empleando la siguiente expresión:

$$Ca = Aa / Ap \times Cp \times f \times Rp/Ra$$

donde: Ca- Concentración del analito, Aa- Área del analito en el cromatograma, Ap- Área del patrón en el cromatograma, Cp- Concentración del patrón, f- Factor de respuesta cromatográfico, Ra- Recobrado del analito, Rp- Recobrado del patrón.

El cálculo de la concentración para los compuestos que no se disponían sus patrones se determinó considerando el factor de respuesta igual a la unidad y asumiendo que su recobrado era igual al del patrón interno correspondiente.

- Separación entre los triglicéridos apolares y polares presentes en el OLEOZON® y comprobación de la separación.

La separación de los compuestos apolares y polares del OLEOZON® se realizó por cromatografía de adsorción en columna de silicagel, según el método establecido por la IUPAC para los aceites vegetales oxidados.^{18, 30} La comprobación de la efectividad de la separación se realizó por cromatografía de capa delgada en fase normal. Como fase estacionaria, se utilizaron placas de 10x10 cm de silicagel 60 previamente activadas térmicamente. Como fase móvil se utilizó una mezcla de hexano:éter etílico:ácido acético (70:30:2 v/v). Se preparó una disolución al 10 % en volumen de la muestra en cloroformo y se aplicaron dos microlitros. La detección se realizó previamente en una cámara de yodo y posteriormente con una disolución de ácido sulfúrico y calor.

- Determinación del contenido de compuestos polares en el OLEOZON® y del recobrado de la muestra.

El contenido de compuestos polares (CP) del OLEOZON® se realizó utilizando la siguiente expresión:

CP [%] = $(pm - pF_1)/pm \times 100$, donde: CP- contenido de compuestos polares, pm- peso de la muestra y pF₁- peso de la fracción apolar.

El recobrado de la muestra se calculó según la siguiente ecuación: $R (\%) = pF_1 + pF_2/pm \times 100$

donde: pF₁- peso de la fracción apolar, pF₂- peso de la fracción polar y pm-peso de la muestra analizada.

- Análisis por HPLC de exclusión molecular.

La preparación de las muestras consistió en la disolución de 10 mg de la muestra en 1 mL de tetrahidrofurano grado HPLC. En el análisis se utilizó un cromatógrafo líquido Konik, modelo 500 (Konik, España) con detección por índice de refracción con sensibilidad de 10⁻⁴ (Hewlett-Packard, USA) y un inyector Rheodine con un “loop” de 10 µL de capacidad. Se emplearon dos columnas de acero inoxidable de 30 cm de longitud y 7,7 mm de

diámetro interno, empacadas con un co-polímero de estireno-divinilbenceno con un diámetro de partícula de 5 μm y tamaños de poros diferentes. Una de ellas con tamaño de poros de 10 nm y la otra de 50 nm (Waters Associates, USA). Las columnas se conectaron en serie comenzando por la de 50 nm. Como fase móvil se utilizó tetrahidrofurano con un flujo de 1 mL/min. Se empleó el monoglicérido del ácido esteárico como patrón interno para la cuantificación (1 mg/mL) y se asumió igual factor de respuesta para los distintos grupos de compuestos.²² Se le realizó el análisis por esta técnica al OLEOZON[®] y a sus fracciones apolar y polar.

- Análisis cromatográficos realizados a las fracciones apolar y polar del OLEOZON[®].

A la fracción apolar se le realizaron los análisis de determinación de la composición tanto de triglicéridos como de los ácidos grasos presentes en los triglicéridos. Estos análisis se realizaron de la misma forma que se describió para el aceite de girasol. Igualmente, se le realizó el análisis de los compuestos poliméricos por HPLC de exclusión molecular como se describió previamente.

A la fracción polar se le realizó la determinación de la composición de los ácidos grasos presentes en los triglicéridos modificados, de la misma forma que se describió para el aceite de girasol. Igualmente, se le realizó el análisis de los compuestos poliméricos por HPLC de exclusión molecular.

RESULTADOS Y DISCUSION

1- Caracterización del aceite de girasol utilizado en la producción del OLEOZON[®].

- Composición de triglicéridos del aceite de girasol.

En la Figura 2 se muestra un cromatograma representativo del análisis por CGL de los triglicéridos presentes en el aceite de girasol utilizado como materia prima; así como su relación molar porcentual (%). Como se observa, la relación molar encontrada para el aceite utilizado es similar a la referida en la literatura especializada o se encuentran en los intervalos de variación observados.^{31,32} Se detectaron un total de 14 triglicéridos con relaciones molares superiores al 0,1 %, encontrándose en mayor concentración la oleo-dilinoleína (OLL-29,91%), la trilinoleína (LLL-22,20%) y la linoleo-dioleína (OLO-16,88 %). Estos tres triglicéridos representan casi el 70 % del total de los triglicéridos presentes en el aceite.

- Composición de ácidos grasos del aceite de girasol.

Es conocido que el aceite de girasol se encuentra en el grupo de los aceites que presentan al ácido linoleico como ácido graso mayoritario, encontrándose su contenido entre un 50–70 % del total de ácidos que lo componen.³³ En este caso, su composición fue de aproximadamente un 55 %, seguido del ácido oleico con un 33 % y en menor concentración los ácidos grasos saturados: palmítico (7 %) y esteárico (4 %), respectivamente (Figura 3). Es decir que el aceite de girasol utilizado, presenta aproximadamente un 88 % de ácidos grasos insaturados en su composición. Estos valores confirman la composición de triglicéridos encontrada y son comparables con los valores existentes en la bibliografía.³³

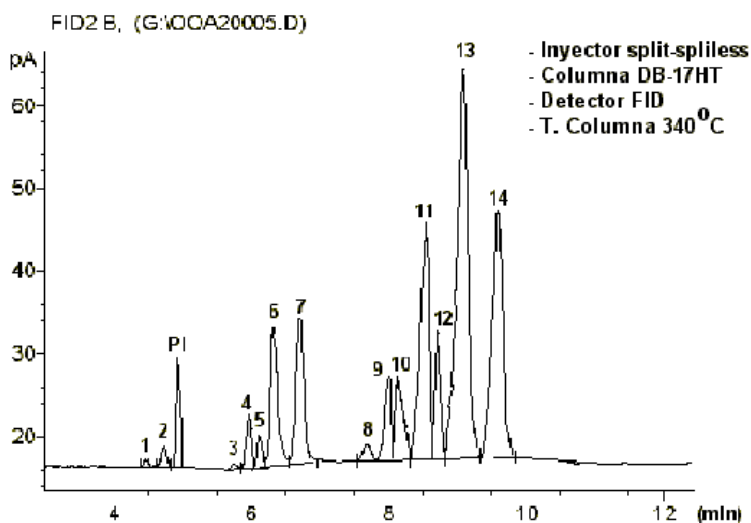


Figura 2. Cromatograma representativo del análisis de los triglicéridos del aceite de girasol por cromatografía de gases capilar.

Leyenda: 1- POP (4,48 min; 0,21 %), 2- PLP (4,74 min; 0,57 %), PI- patrón interno (MMM-4,90 min), 3- POE (5,76 min; 0,37 %), 4- POO (5,99 min; 2,09 %), 5- PLE (6,06 min; 0,77 %), 6- POL (6,35 min; 6,07 %), 7- PLL (6,72 min; 6,46 %), 8- EOO (7,72 min; 1,15 %), 9- OOO (8,03 min; 5,89 %), 10- EOL (8,16 min; 3,20 %), 11- OOL (8,56 min; 16,88 %), 12- ELL (8,65 min; 4,22 %), 13- OLL (9,10 min; 29,91 %) y 14- LLL (9,58 min; 22,2 %).

%).

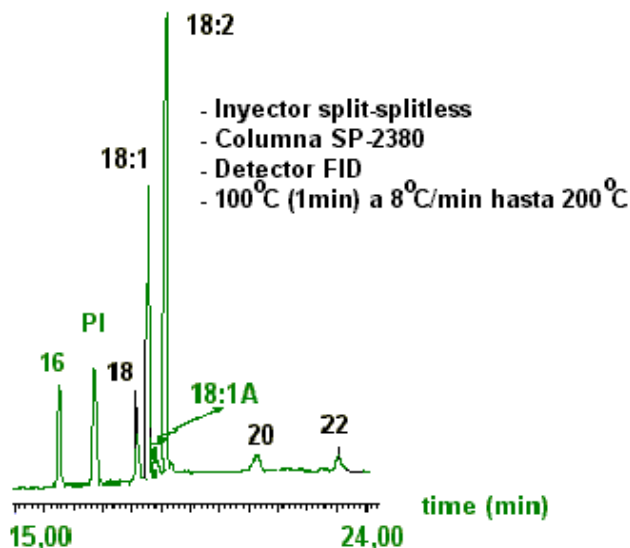


Figura 3. Análisis por CGL de los ésteres metílicos de los ácidos grasos del aceite de girasol.

Leyenda: 16- Palmitato de metilo (15,55 min; 6,70 %), PI- Patrón interno (16,25 min), 18- Estearato de metilo (17,93 min; 3,89 %), 18:1- Oleato de metilo (18,11 min; 33,12 %), 18:1A- Asclepato de metilo (18,40 min; 0,58 %), 18:2- Linoleato de metilo (18,58 min; 54,73 %), 20- Araquidato de metilo (20,73 min; 0,29 %), 22- Behenato de metilo (23,50 min; 0,70 %).

2- Estudio de la composición del OLEOZON®. Fraccionamiento cromatográfico.

- Resultados del análisis de los compuestos volátiles y parcialmente volátiles.

En la Tabla 1, se muestra el resultado del análisis de los compuestos volátiles y parcialmente volátiles presentes en el OLEOZON®. El análisis por CG/EM del extracto metanólico, permitió la identificación de ocho de los diez compuestos obtenidos. Los aldehídos: hexanal, nonanal, 3-nonenal y los ácidos: hexanoico, nonanoico y 3-nonenoico son los compuestos mayoritarios y su presencia puede explicarse mediante el mecanismo de Criegee para la ozonización de olefinas (Figuras 1 y 4).

Tabla 1. Composición del extracto metanólico del OLEOZON® por CG-EM.

No	Compuestos	tr (min)	Conc.(mol/L)	DE (10 ⁴)	CV (%)
1	Hexanal	5,50	0,1580	14,34	0,90
2	NI	6,61	0,0025	0,35	1,42
3	Heptanal	7,50	0,0027	0,12	0,44
4	Octanal (PI)	10,20	0,0770	11,67	1,51
5	Nonanal	13,23	0,1120	19,68	1,75
6	3- nonenal	14,49	0,1110	6,62	0,60
7	2- nonenal	"	0,0022	0,35	1,59
8	NI	17,41	0,0015	0,15	1,01
9	Hexanoato de metilo	22,40	0,0260	4,94	1,88
10	Octanoato de metilo (PI)	25,27	0,0127	0,95	0,74
11	Nonanoato de metilo	26,57	0,0115	0,88	0,77
12	3- nonenoato de metilo	27,15	0,0053	0,50	0,94

Leyenda: tr- tiempo de retención, Conc.- concentración promedio de 10 réplicas, DE- desviación estándar, CV- coeficiente de variación, PI- patrón interno.

Una explicación que pudiera darse a la presencia del 2-nonenal es a través del equilibrio aldo-enólico del 3-nonenal (Figura 4). Este equilibrio se estabiliza por la formación de una estructura del tipo 1,3 butadieno en la

forma enólica del 3-nonenal; la cual a su vez, puede encontrarse en equilibrio con la estructura mesomérica α,β insaturada del 2-nonenal.²⁶

Previo a este trabajo se realizó un estudio de los componentes volátiles del OLEOZON[®], combinando la técnica de equilibrio dinámico de fases (purgamiento gaseoso) con dos sistemas de colección de la muestra: trampa fría (mezcla hielo seco-acetona a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$) y utilizando una trampa con Tenax-TA.¹⁷ En la variante donde se utilizó el Tenax-TA, sólo se determinaron los aldehídos hexanal, heptanal, nonanal y los isómeros de posición 2- y 3-nonenal. Por otra parte, el método de purgamiento gaseoso con trampa fría, igualmente utilizado en el trabajo previo, tuvo un fin cualitativo y permitió la detección del malonaldehído, además de otros aldehídos y ácidos carboxílicos, pero no determinar sus concentraciones.²⁹

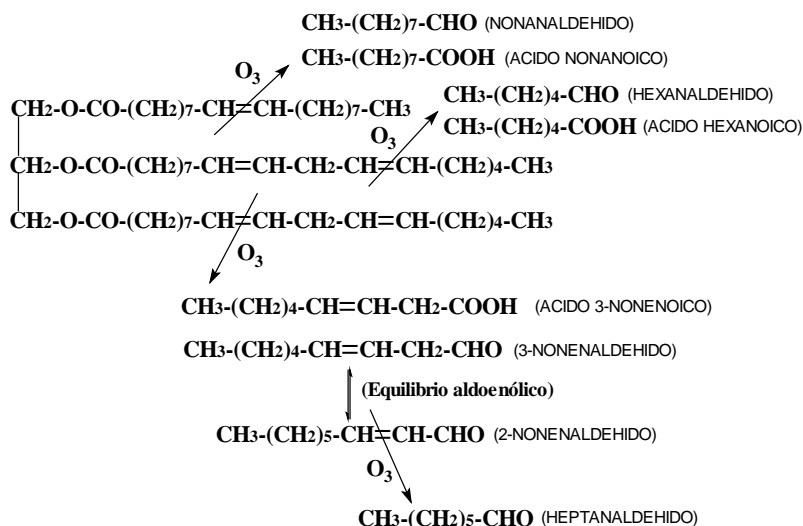


Figura 4. Posible esquema de formación de los compuestos volátiles y parcialmente volátiles identificados en el OLEOZON[®].

Las concentraciones de los aldehídos, determinadas en este trabajo por la combinación de la extracción líquido-líquido y la detección por CG, fueron muy similares a las obtenidas previamente por el método de PG y colección en trampa de Tenax-TA.²⁹ Igualmente, tampoco fue detectado el malonaldehído, lo que está relacionado con su gran volatilidad y baja concentración en la muestra. Adicionalmente, en este trabajo fue posible identificar y cuantificar los ácidos carboxílicos presentes en la fracción volátil y parcialmente volátil del OLEOZON[®], aspecto que no había podido lograrse por la combinación de los dos métodos previamente utilizados.

De los tres métodos de análisis utilizados hasta el momento para la caracterización de los compuestos volátiles y parcialmente volátiles del OLEOZON[®], la extracción líquido-líquido, desarrollada en este trabajo, ha mostrado los mejores resultados generales al determinarse la mayor cantidad de compuestos en la muestra desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo. Estos resultados confirman la necesidad de utilizar distintos métodos de análisis de compuestos volátiles para tener una idea más acertada de la composición de la fracción volátil de cualquier producto.

El OLEOZON[®] presenta un olor característico relacionado con los compuestos volátiles o parcialmente volátiles que forman parte del medicamento. En la literatura se ha encontrado la descripción del olor de algunos de estos compuestos identificados; por ejemplo, el olor del hexanal se describe como: frutal, grasoso, rancio, herboso, semejante al del tabaco, a la hierba cortada o al de la pintura, estos últimos cinco rasgos también se le atribuyen al aroma del heptanal, además de avinagrado y fermentado. El olor del nonanal lo califican de jabonoso o dicen que es semejante al del caucho y el del 3-nonenal le llaman grasoso o seboso.^{34,35} Características similares se le atribuyen a los ácidos identificados en el medicamento y contribuyen en alguna medida al aroma del medicamento. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y a lo descrito en la literatura, podemos plantear que el olor del OLEOZON[®] proviene fundamentalmente de un efecto sinérgico entre los aromas de los compuestos que componen la fracción volátil y parcialmente volátil del producto (aldehídos y ácidos carboxílicos $\text{C}_6\text{-C}_9$).

- Separación entre los triglicéridos y los triglicéridos modificados presentes en el OLEOZON®. Determinación del contenido de compuestos polares y del recobrado.

Teniendo en cuenta la complejidad del OLEOZON®, se deduce que es necesario establecer una estrategia de fraccionamiento que garantice, al menos, la separación por grupos de compuestos sin que se destruyan los principios activos presentes en el mismo. La inexistencia en la literatura especializada de información química referente a la composición o a las técnicas de análisis de los aceites vegetales ozonizados, obliga a la búsqueda de métodos de análisis de sistemas similares. Entre las técnicas existentes que podrían aplicarse a nuestro sustrato se encontraba la normada para la determinación del contenido de compuestos polares en aceites de fritura.^{18,36} Esta técnica permite separar los aceites oxidados en dos fracciones. En una se extraen los triglicéridos que no han sufrido ninguna degradación y en la otra los triglicéridos que han sufrido algún tipo de modificación como la oxidación, la polimerización o la hidrólisis.³⁰ En este trabajo se realizó la separación de los triglicéridos que han sido modificados por la reacción con el ozono (triglicéridos polares) de aquellos triglicéridos que no reaccionaron (triglicéridos apolares). En la Tabla 2 se relacionan los valores obtenidos para 10 réplicas de la muestra representativa del OLEOZON®. El contenido de compuestos polares resultó tener un valor cercano al 50 % de la muestra (48,6 %), lo que quiere decir que aproximadamente la mitad de los triglicéridos presentes en la muestra fueron modificados por la reacción de ozonización. Igualmente, los coeficientes de variación del contenido de polares (CP) y del recobrado (R) fueron inferiores al 2 %.

Si bien es cierto que los mecanismos de oxidación con oxígeno y de ozonización son diferentes, los productos de ambos procesos tienen en común que son altamente oxigenados que forman compuestos de entre seis y nueve átomos de carbono en su estructura (aldehídos y ácidos, responsables del olor característico) y que tienden a la polimerización. Estas similitudes y las ventajas de la técnica de determinación del contenido de compuestos polares, hacen parecer esta técnica muy promisoría en el análisis de los aceites vegetales ozonizados desde el punto de vista analítico cuantitativo y como primer paso de fraccionamiento de dichos aceites. Como se observa, los valores que se obtienen de recobrado de la muestra son bastante elevados (superiores al 97 %), lo que sumado a su simplicidad hacen que el método pueda ser utilizado con bastante confianza desde el punto de vista preparativo.

Tabla 2. Análisis de la separación de compuestos polares del OLEOZON®.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Xm	DE	CV
Pm (g)	1,0110	1,0221	1,0218	1,0135	1,0301	1,0111	1,0201	1,0313	1,0112	1,0217	1,0194	0,0072	0,70
p-F ₁ (g)	0,5178	0,5096	0,5261	0,5098	0,5272	0,5352	0,5394	0,5297	0,5175	0,5281	0,5240	0,0096	1,83
p-F ₂ (g)	0,4623	0,4726	0,4761	0,4869	0,4879	0,4669	0,4638	0,4715	0,4586	0,4671	0,4714	0,0094	1,99
CP (%)	48,78	50,14	48,51	49,7	48,82	47,07	47,12	48,64	48,82	48,31	48,59	0,9130	1,88
R (%)	96,94	96,1	98,08	98,34	97,87	99,11	98,34	97,08	96,53	97,41	97,58	0,8838	0,90

Leyenda: 10- réplicas del análisis, pm- peso de muestra, p-F₁- peso de la fracción apolar, p-F₂- peso de la fracción polar, CP- contenido de compuestos polares expresado en %, R- recobrado total de la muestra, expresado en %, Xm- valor promedio, DE- desviación estándar, CV- coeficiente de variación.

La eficacia de la separación por este método se comprueba utilizando la cromatografía de capa delgada. A continuación se muestra una placa representativa de la separación obtenida por esta técnica (Fig. 5). El OLEOZON® presenta una banda ancha a lo largo de la placa y desde el mismo punto de aplicación. No obstante, se distingue con mayor nitidez una mancha ovalada (rf = 0,83 cm) que pertenece a los triglicéridos que no se modificaron que se concentran en la fracción apolar. Igualmente, la banda difusa desde el punto de aplicación corresponde a las sustancias denominadas por nosotros como compuestos polares que se concentran en la fracción polar. La técnica empleada permitió una excelente separación entre los dos grupos de compuestos presentes en el medicamento.

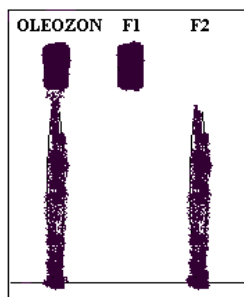


Figura 5. Separación por cromatografía de capa delgada del OLEOZON® y sus fracciones apolar (F1) y polar (F2).

- Análisis por HPLC-SEC del OLEOZON® y sus fracciones apolar y polar.

En la Fig. 6, se muestran los cromatogramas típicos con los resultados de los análisis del OLEOZON® y sus fracciones apolar y polar por la técnica de HPLC de exclusión molecular. Atendiendo al mecanismo de Criegee, en la ozonización de compuestos insaturados se forman compuestos de menor tamaño o peso molecular que el compuesto insaturado de partida, debido a la ruptura de la molécula en la posición del doble enlace. Igualmente, es posible la formación de compuestos de mayor peso molecular que el compuesto de partida por la formación de dímeros y compuestos poliméricos. Si, además, la reacción de ozonización del compuesto de partida no es completa, se tiene en la mezcla de reacción una mezcla de tres grandes grupos de compuestos. Como ya hemos visto, en el OLEOZON® existen triglicéridos que no han modificado sus estructuras y triglicéridos que han sufrido cambios, formándose compuestos de menor tamaño como los detectados en su fracción volátil y compuestos de mayor tamaño, responsables del incremento de la viscosidad del producto respecto al aceite de partida.

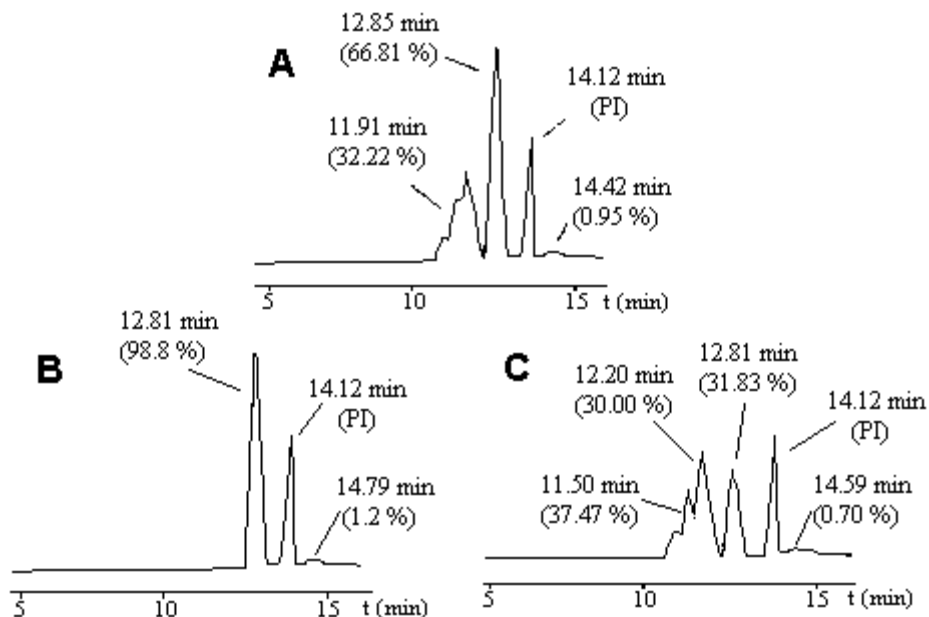


Figura 6. Cromatograma del análisis por HPLC de exclusión molecular del OLEOZON® (A) y sus fracciones apolar (B) y polar (C).

Leyenda: 11,50 min, 11,91 min, y 12,20 min – Compuestos de mayor peso molecular que los TGs, 12,81 min y 12,85 min - TGs + triglicéridos modificados, 14,12 min - monoestearina utilizada como patrón interno, 14,42 min, 14,59 min y 14,79 min - Compuestos de menor peso molecular que los TGs

La cromatografía de exclusión molecular permite la separación entre grupos de compuestos que difieren marcadamente en sus dimensiones moleculares. Si se analiza el peso molecular de los compuestos volátiles y parcialmente volátiles presentes en el OLEOZON®, se observa que éste es inferior a los 200 uma, siendo además su estructura lineal. Los triglicéridos presentes en el aceite de partida tienen pesos moleculares entre

800–900 uma, mientras que los dímeros y oligómeros de triglicéridos presentan pesos moleculares superiores a los 1500 uma. Las diferencias en las dimensiones moleculares de los tres grupos de compuestos descritos son lo suficientemente grandes como para presentar un comportamiento cromatográfico diferente por esta técnica. Es decir que la cromatografía líquida de alta resolución por exclusión molecular puede ser de mucha utilidad para la separación entre los distintos grupos de compuestos presentes en el aceite ozonizado.

Esta técnica ya se aplica en el análisis de los aceites altamente oxidados, como los aceites de fritura, para determinar la concentración de los compuestos poliméricos en dichos aceites. En un análisis representativo, de aceites oxidados, se realizó la asignación para los distintos grupos de compuestos presentes en la muestra.³⁰ De los cuatro grupos identificados para los aceites oxidados, no estará presente en nuestras muestras el correspondiente a los diacilglicéridos, ya que el ozono sólo ataca los dobles enlaces de los triglicéridos insaturados presentes y además la reacción se realiza a temperatura ambiente lo que no favorece el proceso de hidrólisis y por ende la formación de mono- y di- glicéridos.

La técnica de separación física utilizada se basa en las diferencias existentes entre los pesos moleculares de los componentes de la mezcla a analizar, lo que impide que sea una técnica altamente resolutive para grupos de compuestos de similar peso molecular. Los polímeros presentes son ligeramente separados entre sí, sin presentar una resolución base entre los distintos grupos de oligómeros y en el pico de los triglicéridos coeluyen los triglicéridos modificados. No obstante, muestra una buena separación entre los tres grupos de compuestos existentes en la muestra: 1- compuestos poliméricos con pesos moleculares superiores al de los triglicéridos, 2- triglicéridos vírgenes más los triglicéridos modificados y 3- los compuestos con menor peso molecular que los triglicéridos. Ahora bien, si se tiene en cuenta que en el análisis de la fracción volátil y parcialmente volátil del OLEOZON[®], se determinó la presencia de aldehídos y ácidos carboxílicos con longitudes de cadenas C₆–C₉, no es errado pensar que estos compuestos pueden ser los responsables de la señal correspondiente al grupo de compuestos con menor peso molecular que los triglicéridos.

Por otra parte, en el análisis por esta técnica de la fracción apolar del OLEOZON[®] (F₁) (Figura 6B) se observa prácticamente un solo pico con tiempo de retención de 12,81 min (~99 %). Esta fracción está compuesta fundamentalmente por los triglicéridos que no fueron modificados durante el proceso de ozonización, ya que se extrajo con una mezcla apolar de hexano/éter etílico (87/13 v/v) y se corroboró por cromatografía de capa delgada en fase normal. Otro grupo de compuestos que está presente en la fracción son los de menor tamaño que los triglicéridos que al igual que para el OLEOZON[®] puede asociarse con los compuestos de cadenas con entre seis y nueve átomos de carbono, debido al olor característico que conserva esta fracción. No obstante, es necesario profundizar en la composición de esta fracción para poder confirmar la suposición anterior. Sin embargo, algo que si queda claro del análisis del cromatograma de la fracción apolar (F₁), es que no hay presencia en su composición de ningún compuesto polimérico o de mayor peso molecular que los triglicéridos. Considerando los resultados de este análisis y para completar la caracterización de la fracción apolar, sólo resta determinar la composición y concentración de los triglicéridos presentes, así como la composición de los compuestos de menor tamaño.

Por otra parte, si se analiza la fracción polar del OLEOZON[®] (F₂) (Figura 6C), se observa que uno de los picos presentes en el cromatograma tiene igual tiempo de retención (12,81 min) al encontrado para los triglicéridos presentes en la fracción apolar. El análisis previo de la fracción polar por cromatografía de capa delgada en fase normal mostró que en esta fracción sólo se encontraban presentes los triglicéridos que habían sido modificados por el ozono. Esto puede indicar que este pico corresponde a los triglicéridos modificados por el ozono, los cuales presentan pesos y tamaños moleculares diferentes al de los triglicéridos que le dieron origen, pero en los que las diferencias de peso no son tan grandes como para que tengan un comportamiento distinto en el sistema cromatográfico utilizado.

Los resultados de este análisis permiten plantear que aproximadamente el 32 % en peso de la fracción polar analizada está compuesta por triglicéridos modificados y algo más del 67 % en peso por compuestos poliméricos. El casi 1 % en peso restante pueden ser aldehídos y ácidos carboxílicos productos de la ozonización (vía directa) o de la descomposición de las distintas especies peroxídicas existentes (vía indirecta). Tanto en el OLEOZON[®] como en su fracción polar se observa que existe más de un tipo de compuesto polimérico o de mayor peso molecular que los triglicéridos. La identificación y cuantificación de los distintos compuestos de mayor peso molecular que los triglicéridos, requiere de un estudio posterior.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para el OLEOZON[®] y sus fracciones apolar y polar por esta técnica y la de determinación de compuestos polares, se puede plantear que este producto está compuesto por alrededor de un 32 % de triglicéridos polimerizados, aproximadamente un 15 % de triglicéridos modificados con cadenas carbonadas de nueve o doce átomos de carbono o presentan el grupo ozónido en su estructura, correspondiendo entonces el otro 51 % a los triglicéridos que no han sido modificados y hasta un 2 % a los compuestos de menor peso molecular que los triglicéridos.

Análisis de la fracción apolar (F₁) del OLEOZON[®] por CGL

- Análisis de los triglicéridos de la fracción apolar.

El análisis de los triglicéridos de esta fracción fue muy similar al del aceite de girasol de partida (Fig. 2). En el mismo, sólo se encontraron los 14 triglicéridos que habían sido identificados en el aceite de girasol, pero con diferente concentración. En la Tabla 3 se muestran las variaciones experimentadas por los cinco triglicéridos que se encontraban en mayor concentración en el aceite de girasol. El triglicérido más afectado fue la trilinoleína (seis dobles enlaces en su estructura), seguido de la oleodilinoleína (cinco dobles enlaces) y de la linoleodioleína (cuatro dobles enlaces). Estos tres triglicéridos disminuyeron su concentración en más del 50 % producto de la reacción del ozono con el aceite de girasol.

- Análisis de los ácidos grasos de la fracción apolar.

Adicionalmente al análisis de los triglicéridos se determinó la composición de los ácidos grasos de esta fracción (Tabla 4). Todos los ácidos grasos fueron identificados y coinciden con los que se encontraron en el análisis del aceite de girasol. Los ácidos insaturados, linoleico y oleico, continúan siendo los ácidos mayoritarios de dicha fracción, ya que constituyen más del 83 % del total de ácidos grasos. Sin embargo, el análisis de la relación: concentración del ácido linoleico / concentración del ácido oleico, en el aceite de girasol (1,65) y en la fracción apolar (1,43), demuestra que esta fracción está más enriquecida en ácido oleico. Esto se explica por el mayor consumo del ácido linoleico durante la reacción de ozonización, debido a que contiene el doble de insaturaciones que el ácido oleico.

Tabla 3. Variación experimentada por los triglicéridos más abundantes en el aceite de girasol después de la ozonización.

No	TG	Conc. AG (mol/L)	Conc. F ₁ (mol/L)	Variación	% Variación
1	LLL	0,2415	0,0886	0,1529	63,31
2	OLL	0,3269	0,1306	0,1963	60,05
3	OLO	0,1845	0,0800	0,1045	56,64
4	PLL	0,0706	0,0371	0,0335	47,45
5	PLO	0,0663	0,0373	0,0290	43,74

Leyenda: TG- triglicérido, Conc. AG- concentración en el aceite de girasol, Conc. F₁- concentración en la fracción apolar, LLL- trilinoleína, OLL- oleodilinoleína, OLO- linoleodioleína, PLL- palmitodilinoleína, PLO- palmitolinoleninoleína.

Tabla 4. Concentración de los ácidos grasos de la fracción apolar del OLEOZON[®].

#	Ac.G	Expresada en % molar			Expresada en mol/L		
		Xm	DE	CV	Xm	DE	CV
1	C16	9,20	0,0810	0,88	0,1882	0,0018	1,31
2	C18	5,11	0,0874	1,71	0,0977	0,0014	1,80
3	C18:1	34,25	0,5411	1,58	0,5156	0,0095	1,84
4	C18:1A	0,58	0,0108	1,86	0,0087	0,0002	1,92
5	C18:2	48,81	0,5418	1,11	0,7365	0,0120	1,63
6	C20	0,70	0,0130	1,86	0,0105	0,0002	1,96
7	C22	1,35	0,0238	1,76	0,0233	0,0004	1,93
	Total	100			1,5077		

Leyenda: Ac. G- Ácido Graso, C16-Ácido Palmítico, C18- Ácido Esteárico, C18:1- Ácido oleico, C18:1A- Ácido Asclépico, C18:2- Ácido Linoleico, C20- Ácido Araquídico y C22- Ácido Behénico, Xm- Valor medio de concentración, DE- Desviación estándar, CV- Coeficiente de variación. Se analizaron 10 replicas independientes de la fracción apolar del OLEOZON[®].

Igualmente, la fracción apolar del OLEOZON[®] está más enriquecida en todos los ácidos grasos saturados que el aceite que le da origen (Tabla 4 y Figura 3). Esto es completamente lógico ya que durante el proceso de ozonización se consumen los ácidos grasos insaturados. Sin embargo, la concentración en esta fracción de los ácidos grasos saturados: palmítico y esteárico, igualmente disminuye si se compara con la del aceite de girasol. Esto puede explicarse, considerando que en el aceite de girasol los ácidos grasos no se encuentran en su forma libre, sino que están formando parte de los triglicéridos. Las moléculas de triglicéridos del aceite de girasol contienen en su composición tanto ácidos grasos insaturados como saturados (Figura 3). Cuando el ozono reacciona con un doble enlace de alguno de los ácidos grasos insaturados, modifica al triglicérido de forma tal que aumenta su polaridad por la inclusión, en la posición del doble enlace, de los distintos grupos representados en el mecanismo de Criegee (Fig. 1). En esta fracción (F₁, apolar), como ya se comprobó, se extraen los triglicéridos que no han modificado sus dobles enlaces, mientras que la fracción polar (F₂) incluye los triglicéridos que han modificado desde alguno de sus ácidos grasos, hasta triglicéridos que han modificados todos sus dobles enlaces. Es decir que la fracción polar debe contener triglicéridos que presentan ácidos grasos modificados por el ozono y ácidos grasos saturados e insaturados que no han sido modificados. Esto quiere decir que es necesario analizar la composición de ácidos grasos de la fracción polar para tener una idea más clara y real de los ácidos grasos que reaccionaron con el ozono.

Análisis de la fracción polar (F₂) del OLEOZON[®].

El alto contenido de especies peroxídicas que contiene esta fracción impide que puedan analizarse los triglicéridos directamente por alguna técnica cromatográfica, sin correr el riesgo de deteriorar la fase estacionaria. Adicionalmente, el análisis de los triglicéridos por cromatografía de gases de esta muestra generaría gran cantidad de productos de descomposición térmica de los distintos compuestos peroxídicos y no permitiría la cuantificación adecuada de los componentes de dicha fracción. Esas son las razones por lo que no se determinó directamente la composición de triglicéridos de la misma. No obstante, sí se analizó la composición de ácidos grasos, ya que el proceso de transmetilación de las muestras, previo al análisis por CGL, conlleva a la transformación de las especies peroxídicas en compuestos menos agresivos a las fases estacionarias y con mejores propiedades cromatográficas. Adicionalmente, las temperaturas utilizadas en este tipo de análisis son menores a las empleadas en la determinación de los triglicéridos y por ende, son menores los procesos de descomposición térmica.

- Análisis de los ácidos grasos de la fracción polar del OLEOZON[®].

A continuación se muestran los resultados del análisis por CGL de los ésteres metílicos presentes en la fracción polar (Tabla 5). En esta fracción no se encontraron a los ácidos grasos saturados de cadena más larga (C₂₀ y C₂₂), lo que se debe a que estos ácidos se encuentran en baja concentración en el aceite de partida y además no forman parte de los triglicéridos más insaturados que son los que mayores modificaciones sufren durante la reacción de ozonización y por ende, los que se encuentran presentes en esta fracción. Además, en este análisis se observa que los ácidos linoleico y oleico sigue siendo los ácidos mayoritarios de la fracción y que la concentración relativa de ácido oleico/ácido linoleico es aún superior a las encontradas para el aceite de partida y la fracción apolar.

Tabla 5. Análisis de los ácidos grasos de la fracción polar del OLEOZON[®] por CGL.

#	Ac.G	Expresada en % molar			Expresada en mol/L		
		Xm	DE	CV	Xm	DE	CV
1	C _{16:0}	12,71	0,1004	0,79	0,0778	0,0007	0,84
2	C _{18:0}	6,95	0,0702	1,01	0,0426	0,0005	1,22
3	C _{18:1}	35,95	0,1474	0,41	0,2202	0,0010	0,44
4	C _{18:1A}	1,07	0,0193	1,80	0,0066	0,0001	1,83
5	C _{18:2}	43,32	0,4289	0,99	0,2654	0,0031	1,18

Leyenda: Ac. G- Ácido Graso, C16:0-Ácido Palmítico, C18:0- Ácido Esteárico, C18:1- Ácido oleico, C18:1A-Ácido Ascléptico, C18:2- Ácido Linoleico, Xm- Valor medio, DE- Desviación estándar, CV- Coeficiente de variación. Se analizaron 10 réplicas de la muestra.

Del análisis de la Figura 3 y de las Tablas 4 y 5, donde se muestran las concentraciones de los ácidos grasos para el aceite de partida y las fracciones apolar y polar respectivamente, se puede deducir que el ácido linoleico fue el que redujo en mayor medida su concentración debido a la ozonización. Su concentración descendió de

1,8132 mol/L en el aceite de partida a 1,0019 mol/L en el momento del análisis. La variación experimentada de la concentración de este ácido correspondió al 44,7 % de su concentración inicial. El ácido oleico también redujo su concentración de forma significativa al pasar de 1,0974 mol/L a 0,7358 mol/L para un 32,9 % de variación, mientras que el ascléptico fue el que experimentó la menor reducción al disminuir su concentración de 0,0191 mol/L a 0,0153 mol/L (19,9 %). De este mismo análisis se deriva que durante el proceso de ozonización del aceite de girasol, en nuestras condiciones, se consumen 2,2 mole de ácido linoleico por cada mole de ácido monoinsaturado consumido. Este valor es ligeramente superior al esperado desde el punto de vista teórico (2,0) y puede deberse a la unión de distintos factores como una baja dosis de ozono aplicada y problemas de transferencia de masas en la ozonización.

CONCLUSIONES

1. El análisis combinado de las técnicas de extracción líquido – líquido, con la cromatografía de gases y la espectrometría de masas permitió identificar y cuantificar los productos presentes en la fracción volátil y parcialmente volátil del OLEOZON[®]. Se determinó que está compuesta fundamentalmente por los aldehídos: hexanal, nonanal y 3-nonenal y en menor concentración heptanal y 2-nonenal y por los ácidos: hexanoico, nonanoico y 3-nonenoico.
2. Se demostró que el OLEOZON[®] está formado aproximadamente por un 51 % en peso de triglicéridos no modificados, un 32 % de compuestos de mayor peso molecular que los triglicéridos (dímeros y oligómeros), un 15 % de triglicéridos modificados y hasta un 2 % de compuestos con longitudes de cadena de entre seis y nueve átomos de carbono con funciones aldehídicas y carboxílicas.
3. La combinación de las técnicas de separación (cromatografía de columna en fase normal y de HPLC de exclusión molecular) utilizadas por primera vez en el análisis de los aceites vegetales ozonizados, permitió la separación entre los triglicéridos no modificados y modificados por el ozono y la determinación de la composición general del OLEOZON[®]. Igualmente, las técnicas de cromatografía gas – líquido (CGL) y de CG-EM permitieron identificar y cuantificar los principales compuestos obtenidos en las distintas fracciones del medicamento.
4. Se identificaron y cuantificaron 14 triglicéridos en la fracción apolar del OLEOZON[®] que se corresponden con los triglicéridos no modificados por la reacción con el ozono. La trilinoleína, la oleodilinoína y la linoleodilinoína fueron los triglicéridos que disminuyeron su concentración en mayor medida producto de la reacción de ozonización. Los ácidos linoleico y oleico continúan siendo los principales constituyentes de los triglicéridos de esta fracción.
5. La fracción polar del OLEOZON[®] está compuesta aproximadamente por un 32 % en peso de triglicéridos modificados y algo más del 67 % por compuestos de mayor peso molecular que los triglicéridos (dímeros y oligómeros). El casi 1 % restante son compuestos de menor peso molecular que los triglicéridos (ácidos carboxílicos y aldehídos volátiles).

BIBLIOGRAFÍA

1. Lezcano I., Nuñez N., Gómez M., and Espino S. In vitro activity of OLEOZON[®] on *S. Aureus* and epidermitis strains. **Ozone Science and Engineering**, **22**, 207, 2000.
2. Jardines D., Correa T., Ledea O., Zamora Z., Rosado A., and Moleiro J., Gas chromatography – mass spectrometry profile of urinary organic acids of Wistar rats orally treated with ozonized unsaturated triglycerides and ozonized sunflower oil. **Journal of Chromatography B**, **783**, 517-525, 2003.
3. Beal R. E., Ozonization of vegetable oils in an improved aqueous medium, US Patent 3504038, 1970.
4. De Villez R. L., Method of treating acne using ozonized materials, US Patent 4451480, 1984.
5. Washutt J. and Viebahn R., Process for the production of stable ozonized oils from unsaturated vegetable oils, US Patent 5183911, 1993.
6. Bernard S., Huile ozonisee obtenue par generateur alimente en oxygen pur huile saturee en ozone, FR 2784388, 1998.
7. Molerio J. y col., Aceite de girasol ozonizado para uso terapéutico, Patente Nacional CU 22749, 1996.
8. Moleiro J., Menéndez S., Ledea O.E., Díaz M., Díaz W., Fernández L. A., y Lezcano I., Procedimiento para la obtención de aceites y grasas vegetales ozonizados y aplicación de estos productos con fines farmacéuticos y cosmetológicos, Patente PCT WO 03/085072 A1, 2003.
9. Pryor W.A., Wu M., Ozonation of methyl oleate in hexane, in a thin film, in a SDS micelles and in

- distearoylphosphatidylcholine liposomes: Yields and properties of Criegee ozonides. **Chemistry Research Toxicology**, **5**, 505, 1992.
10. Díaz M., Hernández F., Alvarez I., Velez H., Ledea O. y Molerio J., $^1\text{H-NMR}$ studies of the ozonation of methyl oleate. **Bol. Soc. Chil. Quím.**, **42**, 349, 1997.
 11. Ledea O., Díaz M., Moleiro J., Jardines D., Rosado A., y Correa T., $^1\text{H-NMR}$ Spectroscopy study of oleic acid and methyl oleate in different reaction conditions. **Revista CENIC Ciencias Químicas**, **34**, 1, 2003.
 12. Díaz M., Hernández F., Alvarez I., Velez H., Ledea O. y Molerio J., La espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear Protónica en el seguimiento de la reacción del ozono con los ácidos grasos insaturados. **Revista CNIC Ciencias Químicas**, **29**, 89, 1998.
 13. Díaz M., Lezcano I., Molerio J., and Hernández F., Spectroscopy characterization of ozonides with biological activity. **Ozone Science and Engineering**, **23**, 35, 2001.
 14. Díaz M., Hernández F., Ledea O., Sazatornil J.A., Moleiro J., $^1\text{H-NMR}$ study of methyl linoleate ozonation. **Ozone Science and Engineering**, **25**, 121-126, 2003.
 15. Díaz M., Sazatornil J.A., Ledea O., Hernández F., Alaiz M., Garcés R., Spectroscopic characterization of ozonated sunflower oil. **Ozone Science and Engineering**, **27**, 247-253, 2005.
 16. Miura T., S. Zuzuki, S. Sakurai, A. Matsumoto and N. Shinriki, Structure Elucidation of Ozonated Olive Oil, 15 th Ozone World Congress Proceedings, London, UK, 72, 2001.
 17. Ledea O., Correa T., Molerio J., Jardines D., Escobar M., Rosado A. and Hernández C., Volatile components of ozonized sunflower oil "OLEOZON[®]". **Ozone Science and Engineering**, **23**, 121, 2001.
 18. IUPAC Standard Method 2.507, Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives. 7th Edition, International Union of Pure and Applied Chemistry, Blackwell, Oxford, 1987.
 19. Carelli A. and Cert Ventula A., Comparative study of the determination of triacylglycerols in vegetable oils using chromatographic techniques. **Journal of Chromatography**, **630**, 213, 1993.
 20. Ruiz-Gutiérrez V., and Barron L.J.R., Methods for the analysis of triacylglycerols. **Journal of Chromatography B**, **671**, 133, 1995.
 21. Christie W. W., Size-exclusion chromatography of lipids. **Lipid Technology**, **7**, 17, 1995.
 22. Márquez-Ruiz G., M. Martín-Polvillo and M.C. Dobarganes, Rapid, quantitative determination of polar compounds in fats and oils by solid-phase extraction and size-exclusion chromatography using monostearin as internal standard. **Journal of Chromatography A**, **749**, 55, 1996.
 23. Schneiter A., Sunflower technology and production. American Society of Agronomy Inc. Press, Madison, Wisconsin, USA, 712, 1997.
 24. Hardwood J. and Aparicio R., Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties. Air Aspen Publication, Aspen Publisher Inc., Gaithersburg, Maryland, 2000.
 25. Bailey P. S., Ozonation in Organic Chemistry, Vols. 1 y 2, Academic Press, New York, USA, 1978.
 26. Ledea O., Estudio de la composición química del aceite de girasol ozonizado, OLEOZON[®]. **Revista CENIC Ciencias Químicas**, **35**, 1, 2004.
 27. Garcés R., Mancha M., One step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. **Analytical Biochemistry**, **211**, 139, 1993.
 28. NC-92-09:7. Norma cubana para el control de la calidad. Selección de muestras aleatorias, 1984.
 29. Escobar M., Identificación de los compuestos presentes en la fracción volátil del OLEOZON, Trabajo de diploma, Universidad de la Habana, Centro de Investigaciones del Ozono, 1999.
 30. Dobarganes M.C., J. Velasco and A. Dieffenbacher, Determination of polar compounds, polymerized and oxidized triacylglycerols, and diacylglycerols in oils and fats. Results of collaborative studies and the standardized method. Technical Report. **Pure Appl. Chem.**, **72**, 1563, 2000.
 31. Firestone D., Physical and chemical characteristics of oils, fats, and waxes, US FDA, AOCS Press, 98, 1999.
 32. Márquez-Ruiz G., R. Garcés, M. León-Camacho, and M. Mancha, Thermoxidative stability of triacylglycerols from mutant sunflower seeds. **JAOCS**, **76**, 1169, 1999.
 33. Gunstone F. D., Structured and Modified Lipids, Marcel Dekker Inc., New York, 2001.
 34. Grun I.U.; W.E. Barbeau; J.B. Crowther, Changes in headspace volatiles and peroxide values of undeodorized menhaden oil. **J. Agric. Food Chem.**, **44**, 1190-1194, 1996.
 35. Malcolmson L. J., y col., Characterization of low linolenic Canola oils at different levels of consumer acceptance. **JAOCS**, **73**, 1153, 1996.
 36. Walkling A.E., and Wessels M., Chromatographic separation of polar and nonpolar components of frying fats, J. Assoc. Off. **Anal. Chem.**, **64**, 1329, 1981.