

ACEITE DE CARAPA GUIANENSIS (ANDIROBA): EVALUACIÓN PARA USO FARMACÉUTICO

Stacy Olivia James¹, Dania Pérez Ricardo^{1*}, Mirna Fernández Cervera¹, Nilia de la Paz Martín-Viaña²

¹Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba.

²Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), La Habana, Cuba.

*Autor de Correspondencia: email: yosue@ifal.uh.cu

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar y evaluar tecnológicamente emulsiones empleando el aceite de Andiroba, proveniente de la República de Guyana. Fueron elaboradas emulsiones directas con diferentes mezclas de surfactantes no iónicos (Span 20®, Tween 20® y Tween 80®). Las emulsiones seleccionadas como más estables a partir de su evaluación macroscópica, fueron almacenadas a temperatura ambiente y refrigeración, estudiando su estabilidad durante seis meses a través de la medición del pH, conductividad, índice de cremado, turbidez y observación microscópica. Adicionalmente se evaluó la actividad antimicrobiana del aceite de *Carapa guianensis* y las emulsiones seleccionadas. Los sistemas emulsificados con Tween 20® y Span 20® fueron más estables que los que tenían Tween 80® y Span 20®, mostrando como inestabilidad fundamental el cremado. La estabilidad de las emulsiones aumentó con el valor del HLBn del sistema y fue mayor en condiciones de refrigeración. Según las condiciones del estudio, se propone como HLBn del aceite entre 15 y 16, lo que se corresponde a resultados previos. Se demostró que en las condiciones ensayadas, el aceite y las emulsiones tenían actividad antimicrobiana, predominantemente antifúngica.

Palabras clave: emulsiones, HLB, aceite de Andiroba, estabilidad.

OIL OF CARAPA GUIANENSIS (ANDIROBA): EVALUATION FOR PHARMACEUTICAL USE.

Abstract

The objective of the present work was to develop and evaluate technologically emulsions using Andiroba oil, from the Republic of Guyana. Direct emulsions were made with different blends of nonionic surfactants (Span 20®, Tween 20® and Tween 80®). The emulsions selected as being more stable from their macroscopic evaluation were stored at room temperature and refrigeration, studying their stability for six months through the measurement of pH, conductivity, cremation index, turbidity and microscopic observation. Additionally, the antimicrobial activity of *Carapa guianensis* oil and the selected emulsions were evaluated. The systems emulsified with Tween 20® and Span 20® were more stable than those with Tween 80® and Span 20®, showing as fundamental instability the cremation. The stability of the emulsions increased with the HLBn value of the system and was higher

under refrigeration conditions. According to the study conditions, it is proposed as HLBn of the oil between 15 and 16, which corresponds to previous results. It was shown that under the conditions tested, the oil and emulsions had antimicrobial activity, predominantly antifungal.

Keywords: Emulsion, HLB, Andiroba oil, stability.

Introducción

La *Carapa guianensis*, perteneciente a la familia de la caoba, es un árbol que, por sus propiedades variadas, es una de las riquezas de las Américas. Su madera es de alto valor por la dureza y resistencia contra insectos Forget et al, 2009. Al aceite de *Carapa guianensis*, o Andiroba, se le atribuyen actividades como antimalárico, antifúngico, antiinflamatorio, antineoplásico, repelente e insecticida, entre otras. Por su potente efecto emoliente, y contenido de aceites esenciales, está siendo incorporado en varias formulaciones cosméticas. (Pingal, 2002; Nayak et al., 2009; Ferraris et al., 2010; Ferreira et al., 2010)

En otros reportes se mencionan otras propiedades del aceite, su efectividad contra la celulitis y la activación de linfocitos T. (Ferraris et al., 2010) Se han identificado además componentes del aceite de Andiroba, responsables de los efectos antimalárico y antineoplásico. (Taylor, 2004)

El aceite de andiroba es una fuente rica de aceites esenciales y ácidos grasos, principalmente los ácidos oleico, palmítico, mirístico, esteárico, linoleico, conjuntamente con un 2 - 5% de material insaponificable. (Nayak et al., 2009) La utilidad cosmética del aceite está dada por el alto contenido de ácido oleico y ácido linoleico (Pingal, 2002), ya que éste último es un ácido graso que mantiene la integridad epidérmica. Por lo tanto, el aceite de andiroba puede ser utilizado particularmente en cremas para pieles secas, productos antiarrugas, emulsiones reconstructivas y lociones corporales.

Las emulsiones son sistemas coloidales termodinámicamente inestables, pero con cierta estabilidad cinética, que contienen dos líquidos inmiscibles; aceite o disolución orgánica y agua o una disolución acuosa. De estos uno se dispersa finamente, de forma discontinua en el seno del otro, denominándose fase dispersa y fase continua, respectivamente. La fase continua es aquella a través de la cual se puede acceder desde cualquier punto a otro, sin abandonarla, mientras que para ir de un punto de la fase dispersa a otro hay que atravesar también porciones de fase continua.

Para formar una emulsión estable, es necesaria la presencia de un tercer componente, el agente emulgente. Los agentes emulsificantes pueden actuar por diversos mecanismos. (Solans, 2001)

El HLB (balance hidrófilo-lipófilo) es un parámetro de gran importancia en el desarrollo de una emulsión. Este sistema fue desarrollado por Griffin en la década del 50 y trata de dar una respuesta parcial a la búsqueda de una mezcla de surfactantes que sea ideal para garantizar la estabilidad de una emulsión en cuestión. (Vila Jato, 1997; Fernández, 2006)

Por lo tanto, el HLB es característico del tensoactivo o de la mezcla de tensoactivos. Sin embargo, el sistema de HLB no brinda información acerca de la cantidad de agentes emulgentes necesarios en una emulsión, por lo que se necesita conocer el HLB ideal para emulsificar el sistema, denominado HLB crítico (Macedo et al., 2006). Este HLB crítico, conocido también como HLB óptimo o necesario, se refiere a la fase lipofílica.

El HLB crítico de una fase oleosa es el valor de HLB de la mezcla de agentes emulsificantes. Su conocimiento es de gran interés ya que permite escoger la proporción de tensoactivos óptima para obtener el tamaño mínimo de gota y estabilidad de la emulsión. Además, las emulsiones obtenidas con este valor de HLB son menos susceptibles de variar con el método de fabricación. (Vila Jato, 1997)

Muchos aceites minerales tienen establecidos sus valores de HLB requeridos, no así, los aceites esenciales. Valores de HLB requeridos para los aceites esenciales de eucalipto, menta piperita y lipia o bella alfombra fueron determinados a través del método de Griffin y correlacionados con un método turbidimétrico (Orafidiya y Oladimeji, 2002). Rodríguez-Rojo et al., 2012, caracterizaron el aceite de romero para la formulación de emulsiones biodegradables determinando su HLB óptimo. Rahate y Nagarkar, 2007, emplearon una combinación de surfactantes no iónicos para determinar el HLB de los aceites de girasol y ajonjolí.

Ferreira et al., 2010, determinaron el HLB requerido (HLB_n) del aceite de andiroba reportando un valor de 16,7. Para ello emplearon como mezcla emulgente el Tween[®] 20 y Span[®] 80, pero de acuerdo con los resultados obtenidos llegaron a la conclusión que la formulación con Tween[®] 20, como único surfactante, era capaz de estabilizar las emulsiones que contenían el aceite de andiroba. Nakanishi et al., 1965, reportaron la actividad antibacteriana del aceite de *Carapa guianensis*. Otros estudios, empleando extractos obtenidos a partir de la corteza y el corazón del andiroba, le han atribuido propiedades antifúngicas y antibacterianas. Entre los usos recomendados para el aceite, se plantea las infecciones micóticas, parásitos o cáncer de la piel. Teniendo en cuenta estos antecedentes se procedió al estudio de la actividad antimicrobiana del aceite de *Carapa guianensis*, proveniente de Guyana.

Materiales y Métodos

Se empleó aceite de las semillas del *Carapa guianensis*, proveniente de la provincia de Berbice, de la República de Guyana. Los tensoactivos Tween 80[®] (Fluka, Suiza) Tween 20[®] (Fluka, Suiza) Span 20[®] (BDA, Inglaterra).

Elaboración de las emulsiones: Para la determinación del HLBn del aceite fueron elaboradas emulsiones con un emulgente lipofílico (Span 20[®], HLB = 8,6) y dos hidrófilos (Tween 80[®], HLB = 15,0 y Tween 20[®], HLB =16,7), cuyas composiciones se muestran en la Tabla I.

En todos los casos el porcentaje de mezcla emulgente fue del 5 %. Como componente de la fase oleosa se empleó el aceite de *Carapa guianensis* al 20 % de la emulsión. Una vez que las fases fueron mezcladas, se homogenizaron empleando el homogenizador Ultra-Turrax (IKA, mod. T-25, Staufen, Alemania) a una velocidad de 13500 min⁻¹ durante 10 min. (Ferreira et al., 2010)

Tabla I. Composición de las emulsiones formuladas

Ensayo	Span 20 [®]	Tween 80 [®]	HLBn	Ensayo	Span 20 [®]	Tween 20 [®]	HLBn
	%	%			%	%	
E1	100	0	8.60	E12	100	0	8.60
E2	90	10	9.42	E13	90	10	9.41
E3	80	20	9.88	E14	80	20	10.22
E4	70	30	10.52	E15	70	30	11.03
E5	60	40	11.16	E16	60	40	11.84
E6	50	50	11.80	E17	50	50	12.65
E7	40	60	12.44	E18	40	60	13.46
E8	30	70	13.08	E19	30	70	14.27
E9	20	80	13.72	E20	20	80	15.08
E10	10	90	14.36	E21	10	90	15.89
E11	0	100	15.00	E22	0	100	16.70

Una vez elaboradas las emulsiones fueron almacenadas a temperatura ambiente durante 15 días.

En la segunda etapa del estudio fueron elaboradas las cuatro emulsiones seleccionadas como más estables (E7, E8, E20, y E21), para llevar a cabo el estudio de estabilidad.

Balance hidrófilo-lipófilo (HLB) del aceite de *Carapa guianensis*

Para el cálculo del HLBn del aceite fue empleada la ecuación de Griffin: (Griffin, 1954)

Donde:

HLB_T : HLB del emulgente hidrófilo (Tween 80[®] y 20[®], respectivamente)

HLB_S : HLB del emulgente lipófilo (Span20[®])

$\%_T$: porcentaje del emulgente hidrófilo

$\%_S$: porcentaje del emulgente lipófilo

Evaluación de las emulsiones: Todas las emulsiones elaboradas en la primera fase del estudio fueron evaluadas periódicamente durante 15 días para detectar modificaciones visibles o inestabilidades como: color, aceite separado, cremado y coalescencia.

Estabilidad de las emulsiones seleccionadas

En la segunda etapa se realizó el estudio de estabilidad de las emulsiones seleccionadas: E7, E8, E20 y E21. Para ello se almacenaron durante 6 meses a temperatura ambiente ($30 \pm 2^\circ\text{C}$) y refrigeración ($5 \pm 2^\circ\text{C}$), respectivamente. A cada emulsión, de acuerdo a las condiciones de almacenamiento, se les evaluó los parámetros que se describen a continuación.

a. Evaluación macroscópica

La evaluación organoléptica de cada una de las preparaciones fue evaluada a temperatura ambiente y refrigeración, para detectar modificaciones visibles o inestabilidades como: color, aceite separado, cremado y coalescencia.

b. Observación microscópica

Las emulsiones fueron observadas a través de un microscopio óptico (MOTIC, China) con lente de X40, equipado con cámara fotográfica MOTICAM 2000, 2.0 M. Pixel empleando USB 2.0 y software MOTIC IMAGES PLUS 2.0, China.

Las emulsiones fueron agitadas suavemente antes del análisis para garantizar la homogeneidad de la muestra. Una gota de cada emulsión fue colocada en el portaobjeto y cubierta por un cubreobjetos, empleando un ocular calibrado (1U $1,6 \mu\text{m} \times 400$).

c. pH

Las determinaciones de pH se realizaron empleando un pHmetro (Hanna Instruments, mod. PH211, China) calibrado con soluciones buffer de pH 4 y 7 (BDH, Inglaterra). El análisis se realizó por triplicado.

d. Conductividad

Los estudios de la conductividad de las emulsiones fueron realizados empleando un conductímetro (mod. DDSJ-308A, China) a 25°C . Las mediciones se hicieron por triplicado.

e. Índice de cremado

El índice de cremado se estimó como la relación porcentual entre el volumen de la fase separada respecto al volumen total de la emulsión (Soro Guevara, 2007). Las mediciones se realizaron por triplicado. Para el cálculo del índice de cremado fue empleada la siguiente ecuación (Ferreira et al., 2010):

Donde:

*I*C: índice de cremado (%)

C: altura total de fase separada (mL)

ET: altura total de la emulsión (mL)

f. Turbidez

Para realizar el método 5 mL de cada ensayo fue diluido con 25 mL de agua destilada. El porcentaje de transmitancia (%T) fue medido a 600 nm de acuerdo con los estudios de Ferreira et al., 2010, empleando agua destilada como blanco. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro (Rayleigh mod.UV-1601, China). Considerando la transmisión del blanco del 100 %, la turbidez fue calculada con la siguiente ecuación:

Los resultados fueron obtenidos a partir de los valores de tres réplicas.

Evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite

a. Pruebas de susceptibilidad “*in vitro*”

Los dermatofitos se subcultivaron en Agar Avena, durante 7 días a temperatura ambiente. Se utilizaron las siguientes cepas ATCC (American Type Culture Collection; Rockville, Md): *Trichophyton mentagrophytes* 13566, *Trichophyton rubrum* 16322, *Candida albicans* ATCC 22019 (hongo levaduriforme) y de las bacterianas las cepas *Escherichia coli* ATCC 22319 y *Staphylococcus aureus* ATCC 21013.

Los agentes antimicrobianos utilizados como controles positivos fueron: dos sustancias antifúngicas liofilizadas Ketoconazol (Pfizer), Miconazol (Novartis) y una antibacteriana de amplio espectro, Ceftriazona (Pfizer). Las sustancias antifúngicas se diluyeron en dimetilsulfóxido (DMSO) al 1% y la antibacteriana en agua-HCl, siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

b. Preparación del inóculo de los hongos dermatofitos

Se preparó un inóculo estándar. Las colonias subcultivadas en Agar Avena por 7 días a temperatura ambiente, se cubrieron con 1-2 mL de agua destilada estéril. Posteriormente se raspó la superficie con la punta de una pipeta Pasteur estéril, obteniéndose una suspensión turbia formada por conidios e hifas que se transfirió a otro tubo estéril, sedimentando por 3-5 minutos. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se agitó en un vortex por 15 segundos. El sobrenadante se ajustó espectrofotométricamente (longitud de onda de 530 nm) hasta obtener un tamaño de inóculo de $0.5 \cdot 10^3$ - $2.5 \cdot 10^3$ conidios/mL.

c. Preparación del inóculo bacteriano y levaduriforme

El inóculo estándar se preparó a partir de las colonias subcultivadas en Agar *Staphylococcus* #110, Agar Luria Bertani y Agar Papa Dextrosa incubadas por 3 días a 37 °C. A partir de los subcultivos se tomaron asadas y se aplicaron en los respectivos caldos, incubándolos hasta obtener un cultivo en fase de aceleración negativa (previa curva de crecimiento estándar). Seguidamente se tomó 1 mL de

cada cultivo con una pipeta Pasteur estéril y se diluyó con agua destilada estéril hasta obtener (longitud de onda de 620 nm) un tamaño de inóculo de $1,5 \times 10^2$ células/mL.

d. Procedimiento

Las pruebas se llevaron a cabo por quintuplicado en placas de Petri desechables estériles, a las que se les agregó 15 mL del medio de cultivo, con 0.1 mL de cada inóculo, dejando solidificar el medio a temperatura ambiente. Los discos utilizados para inocular las diferentes formulaciones de *Carapa guianensis* se diseñaron a partir de papel de filtro Whatman No. 42, de 6 mm de diámetro. Se cargaron asépticamente con 0,1 mL de los compuestos ensayados, dejando evaporar e inmediatamente después se colocaron en los medios de cultivo.

Las placas inoculadas con los hongos dermatofitos se incubaron a una temperatura de 28 °C por 4 días, leyéndose en forma visual a las 24 h. En cambio, las placas inoculadas con hongos levaduriformes y bacterias se incubaron a 37 °C por 3 días y leídas a las 18 h. Posteriormente, se midieron los halos de inhibición con un pie de rey y se reportaron los resultados en milímetros (mm). Los resultados se analizaron estadísticamente empleando el test de Tukey-HSD.

Resultados

Todas las emulsiones fueron obtenidas exitosamente, las cuales permanecieron estables sin cambios visuales durante 24 horas. A pesar de la variación del HLBn entre las emulsiones, no se observaron diferencias a temperatura ambiente (Tabla II), independientemente de la mezcla de surfactantes empleada, ya que todas tenían un aspecto lechoso uniforme.

Tabla II. Aspecto organoléptico de las emulsiones

Tween 80 [®] y Span 20 [®]					Tween 20 [®] y Span 20 [®]				
Ensayo	Días				Ensayo	Días			
	0	1	5	15		0	1	5	15
E1	L	L(A)+ C	L(A)+C +S	L(A)+C +S	E12	L	L(A)+ C	L(A)+C+S	L(A)+C+ S
E2	L	L(A)+ C	L(A) + C	L(A) + C	E13	L	L(A)+ C	L(A)+C	L(A) + C
E3	L	L(A)+ C	L(A) + C	L(A) + C	E14	L	L(A)+ C	L(A)+C	L(A) + C
E4	L	L(A)+ C	L(A) + C	L(A) + C	E15	L	L(A)+ C	L(A)+C	L(A) + C
E5	L	L(A)+ C	L(A) + C	L(A) + C	E16	L	L(A)+ C	L(A)+C	L(A) + C
E6	L	L + C	L(A) + C	L(A) + C	E17	L	L(A)+ C	L(A)+C	L(A) + C
E7	L	L + C	L + C	L + C	E18	L	L + C	L(A)+C	L(A) + C
E8	L	L + C	L + C	L + C	E19	L	L + C	L(A)+C	L(A) + C
E9	L	L + C	L + C	L(A) + C	E20	L	L + C	L + C	L + C
E10	L	L + C	L + C	L(A) + C	E21	L	L + C	L + C	L + C
E11	L	L + C	CO	CO	E22	L	L + C	CO	CO

Leyenda L: lechoso; C: cremado; L(A): lechoso-amarillo; CO: coalescencia; S: sedimentación

Estabilidad de las emulsiones seleccionadas

Observadas al microscopio óptico con luz ordinaria al inicio (Figura 1), a los 70 días de almacenadas en refrigeración (Figura 2) y en temperatura ambiente (Figura 3), se puede ver los cambios en los tamaños de las gotículas de las emulsiones.

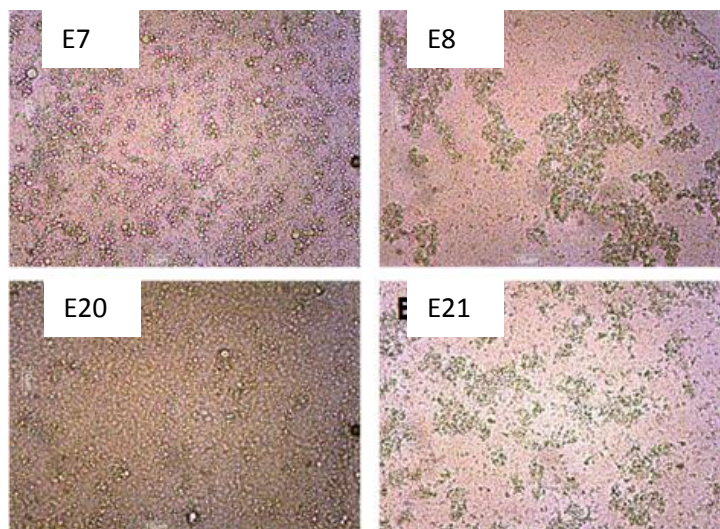


Figura 1. Microfotografías de las emulsiones recién elaboradas.

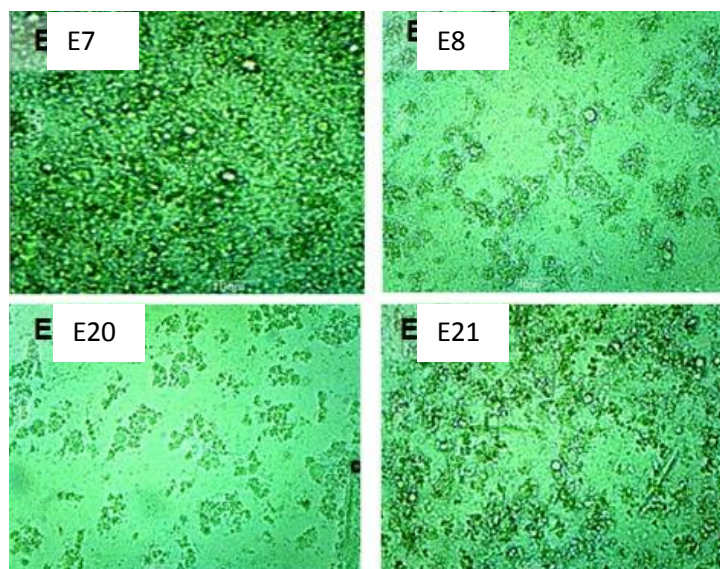


Figura 2. Microfotografías de las emulsiones almacenadas en refrigeración.

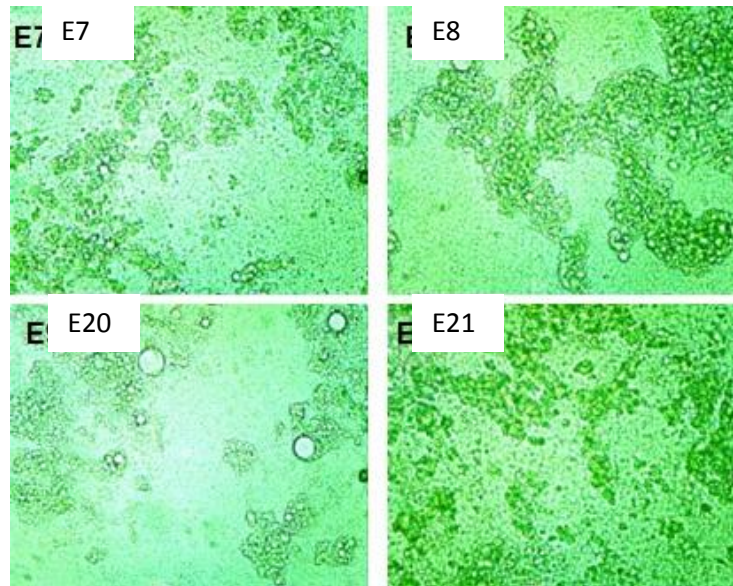


Figura 3 . Microfotografías de las emulsiones almacenadas en temperatura ambiente.

Los resultados del pH de las emulsiones almacenadas a temperatura ambiente y refrigeración se muestran en las Figura 4.

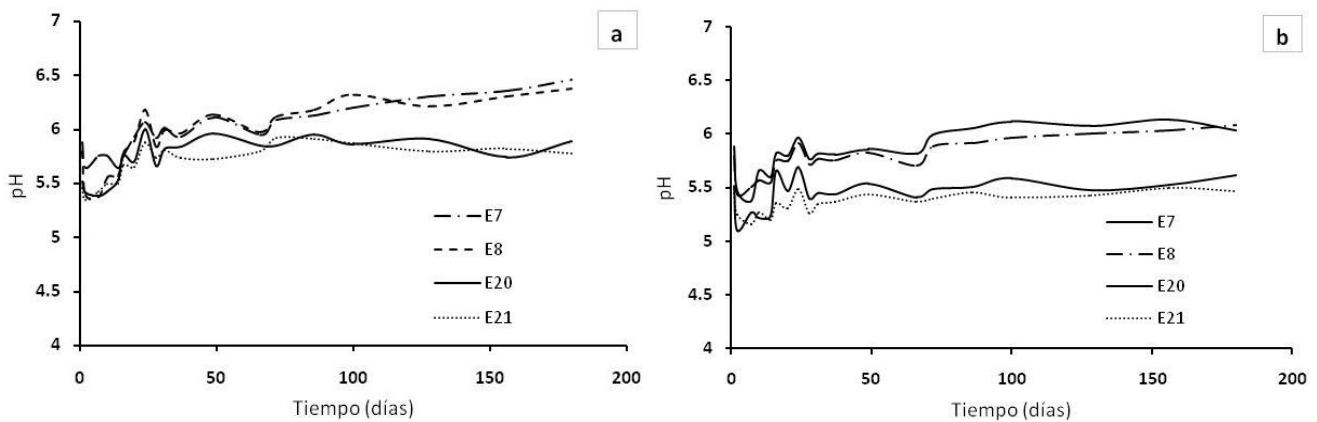


Figura 4. Variación del pH de de las emulsiones evaluadas (a Temperatura ambiente, b refrigeración).

Como era de esperar no se observaron modificaciones, durante las 48 horas después de la preparación de las emulsiones. Sin embargo, a partir de este momento se produjo un incremento del índice de cremado hasta aproximadamente 30 días, para los ensayos E7, E8 y E9. La emulsión E10 ofreció la mayor resistencia al incremento del índice de cremado, bajo el estrés de la temperatura de almacenamiento. Estos resultados confirman que el ensayo 10 es el más estable.

Con relación a las emulsiones almacenadas en refrigeración, no se observó formación de cremado, durante el período evaluado, a excepción del sistema E7. Estos resultados están en correspondencia con los obtenidos en la evaluación macroscópica de las emulsiones, las cuales mantuvieron un aspecto lechoso, en los ensayo E8, E9 y E10. Por lo tanto, la estabilidad de los sistemas ensayados, aumentó con el incremento del HLBn.

El comportamiento de la conductividad eléctrica de las emulsiones en el período evaluado se muestra en la Figura 5.

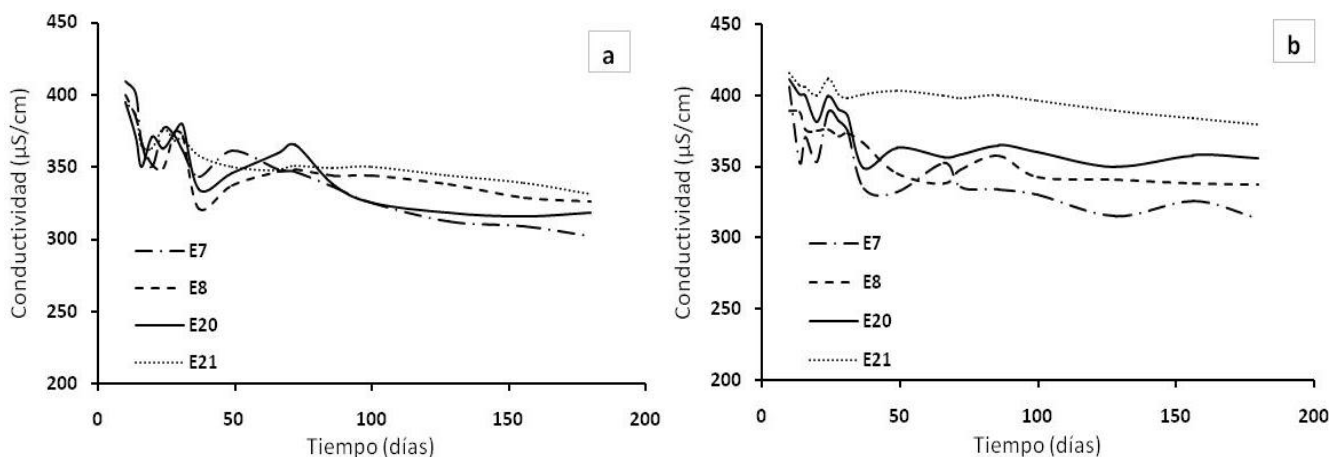


Figura 5. Variación de la Conductividad de las emulsiones evaluadas (a Temperatura ambiente, b refrigeración).

En la Figura 6 se resume el comportamiento de la turbidez de las emulsiones, en las condiciones de almacenamiento estudiadas.

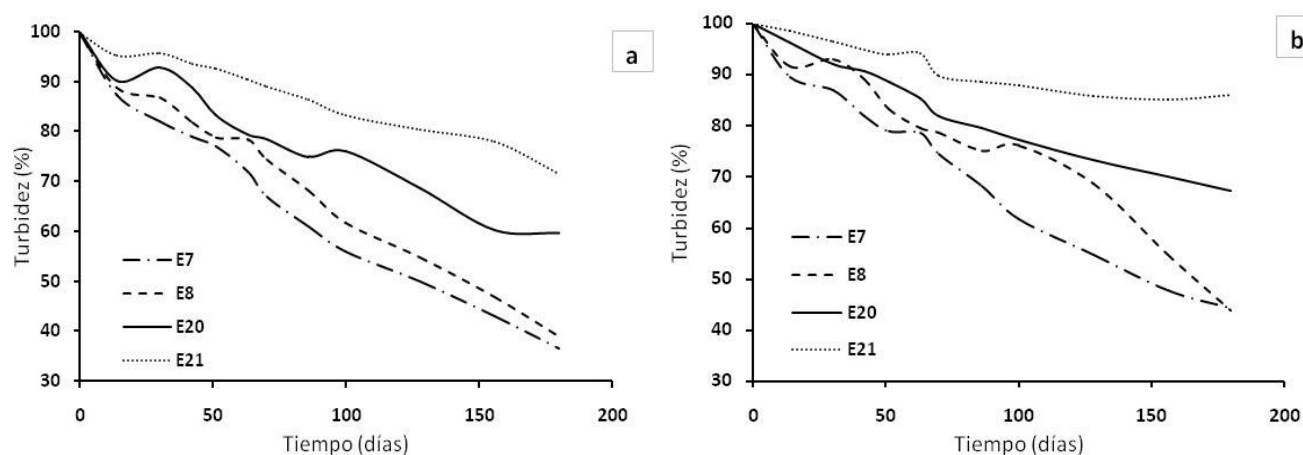


Figura 6. Variación de la Turbidez de las emulsiones evaluadas (a Temperatura ambiente, b refrigeración).

Evaluación de la actividad antimicrobiana

Los resultados de la evaluación de la actividad antimicótica del aceite de *Carapa guianensis* y las emulsiones seleccionadas se muestran en la Figura 7.

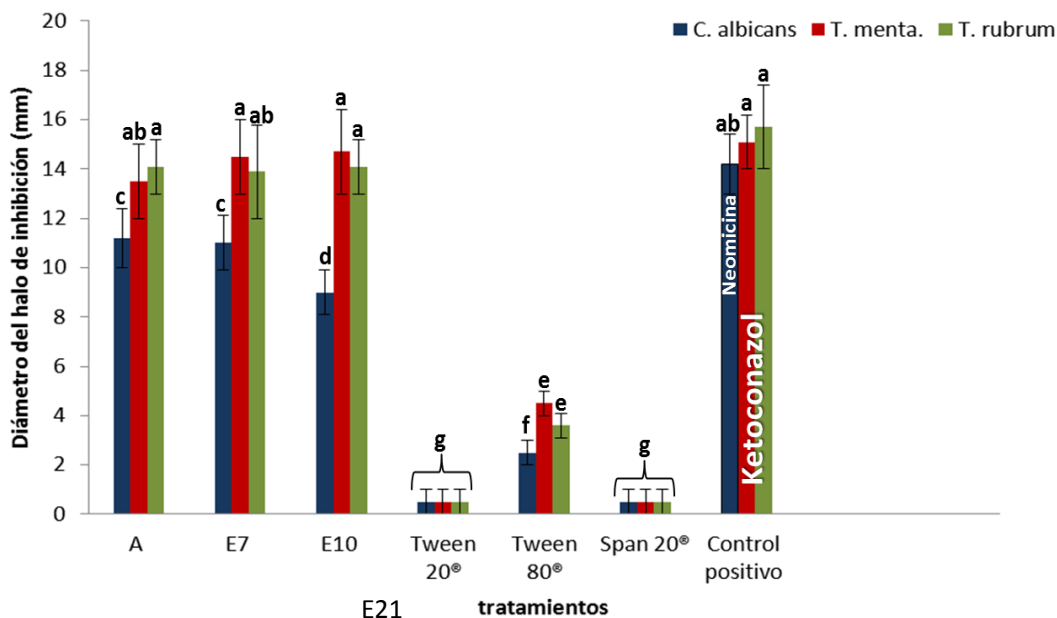


Figura 7. Evaluación de la actividad antimicótica de E7 y E21. Las letras representan una comparación múltiple de medias realizadas con la prueba de Tukey asumiendo un valor de $p < 0.05$.

Los resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana del aceite de *Carapa guianensis* y las emulsiones seleccionadas se muestran en la Figura 8.

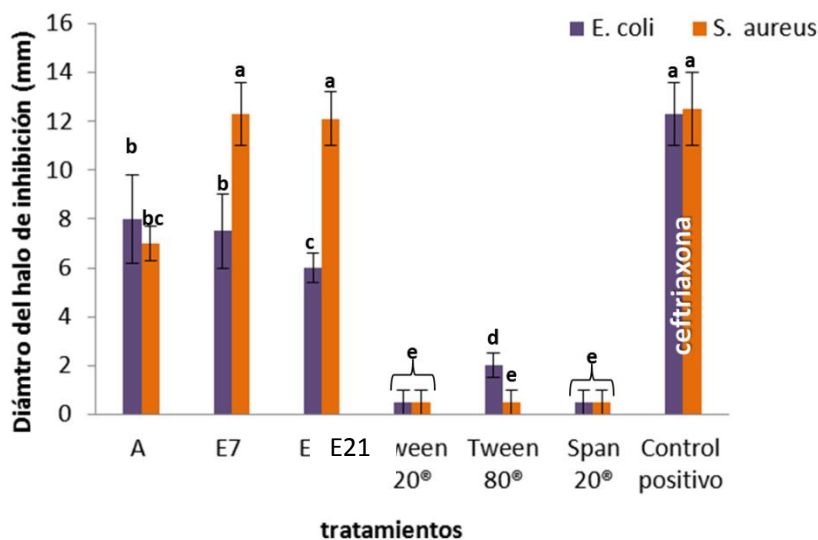


Figura 8. Evaluación de la actividad antibacteriana de E7 y E21. Las letras representan una comparación múltiple de medias realizada con la prueba de Tukey asumiendo un valor de $p < 0.05$.

Discusión

Como ha sido demostrado por Ferreira et al., 2010, el comportamiento de las emulsiones que contienen el aceite de *Carapa guianensis* como fase oleosa, tienen una dependencia con el HLBn. Las emulsiones estabilizadas por mezclas de surfactantes, o un surfactante, con bajos valores de HLBn mostraron más inestabilidad. Mientras que a mayores valores de HLBn se lograron sistemas más estables. Por ello, en la segunda fase del estudio fueron seleccionados los ensayos (E7, E8, E20, y E21), que resultaron ser las más estables.

Coincidiendo con lo señalado en la primera etapa del estudio, la manifestación de inestabilidad en los ensayos seleccionados (E7, E8, E20 y E21) fue el cremado. Lógicamente, los cambios fueron más notables a temperatura ambiente que en refrigeración, donde el aspecto lechoso se mantuvo hasta los 180 días, con excepción del sistema E7. El estrés producido por la temperatura ambiente fue mayor, de manera que a los siete días de almacenadas las emulsiones apareció el cremado.

Recién elaboradas las emulsiones presentaban gotas bastante pequeñas y dispersas. Transcurridos 70 días, predominaban gotículas con tamaños diferenciados entre sí: partículas pequeñas y, partículas grandes (gotas secundarias) resultantes de la aglomeración de las pequeñas. Este último aspecto se hizo más evidente a temperatura ambiente que en refrigeración. Estos resultados se corresponden con el aspecto visual de las emulsiones comentado anteriormente.

Los sistemas almacenados a temperatura ambiente mostraron una tendencia al incremento del pH (Figura 4a), aunque en todos los casos, los valores medios están comprendidos entre 5 y 6,5. Este fenómeno puede ser explicado por la liberación de ácidos grasos presentes en el aceite (Tadros, 2004; Ferreira et al., 2010) teniendo en cuenta la complejidad de la composición del aceite utilizado. En el caso de las emulsiones E20 y E21 la variación de pH, a igual temperatura, fue menor con respecto a los ensayos E7 y E8.

Un comportamiento diferente fue el observado en refrigeración (Figura 4b). La variación de pH fue mucho menor con respecto a las emulsiones almacenadas en temperatura ambiente, para todos los ensayos.

Los valores de conductividad obtenidos, independientemente de las condiciones de almacenamiento, son altos ya que son emulsiones directas (Figura 5). Estos resultados sugieren que las emulsiones, al tener mayor contenido de surfactantes hidrofílicos, y por tanto mayor HLBn, presentarán mayor conductividad. El grado de hidratación de las gotículas en la interfase se incrementa con la proporción de Tween, respecto a la de Span, permitiendo su enlazamiento con el agua. (Bisal et al., 1990)

El estrés producido por las temperaturas de almacenamiento, conllevó a la disminución de la conductividad en las emulsiones (Figura 5a). Sin embargo, al igual que para el pH, en las condiciones de refrigeración los valores de conductividad de los sistemas E20 y E21 son mayores, respecto al E7

y E8, con una tendencia hacia su mantenimiento (Figura 6b). Estos resultados confirman la mayor estabilidad alcanzada en las emulsiones E20 y E21.

Al analizar la turbidez de las emulsiones se observa que nuevamente el ensayo E21 es el que muestra mayor estabilidad. Igualmente se evidencia la influencia de la temperatura de almacenamiento, al observar mayores valores de turbidez al final del estudio en refrigeración (Figura 6b) con respecto a las almacenadas a temperatura ambiente (Figura 6a). Mayores valores de turbidez significan menores valores de transmitancias, por lo que los sistemas serían menos transparentes, lo que resulta importante para la estabilidad de las emulsiones. Song et al., 2002 reportan que los cambios en la turbidez, en función del tiempo, pueden relacionarse con inestabilidades en las emulsiones por procesos simultáneos de floculación y/o coalescencia. Según Ferreira et al., 2010, a mayor turbidez, mayor estabilidad, y por lo tanto, sistemas con HLBn más elevados resultarán más apropiados para contener el aceite de *Carapa guianensis*.

Evaluación de la actividad antimicrobiana

Tanto el aceite como las emulsiones ensayadas, tuvieron actividad inhibitoria sobre el crecimiento de las tres especies de hongos evaluadas. En el caso de la actividad inhibitoria sobre la especie *Candida albicans* se denota una diferencia estadística entre las emulsiones/aceite y el control utilizado (neomicina). Igualmente existen diferencias entre el aceite/emulsión E7, con respecto a la E21, resultando ser esta última la de menor actividad inhibitoria. En función de estos resultados es posible afirmar que la formulación E21 afecta la actividad antifúngica de los metabolitos presentes en el aceite. Estos resultados pueden estar atribuidos a la presencia del Tween 20[®] en la emulsión E21, a diferencia de E7 que contiene Tween 80[®], el cual mostró mayor actividad antifúngica que el Tween 20[®].

En el caso de los hongos filamentosos, tanto el aceite como las emulsiones, presentaron valores similares de actividad con respecto al ketoconazol; solo se detectaron ligeras diferencias estadísticas (menor actividad) para el caso del aceite evaluado de manera independiente, por lo que se puede afirmar que en este caso los componentes de la emulsión podrían estar potenciando o estabilizando los metabolitos responsables de la actividad antimicrobiana. De los tensoactivos empleados solo el Tween 80[®] generó pequeños halos de inhibición lo cual se corresponde con lo reportado por otros autores. (García, 2007)

El análisis de los resultados de la actividad antibacteriana arrojó que las emulsiones presentaron una elevada actividad contra *S. aureus* (Gram +), a diferencia del aceite, el cual, aunque mostró inhibición del crecimiento, los valores obtenidos fueron diferentes desde el punto de vista estadístico con respecto al de las emulsiones y el control positivo (ceftriaxona). Este resultado sugiere un efecto potenciador de la actividad antibacteriana en las emulsiones, presumiblemente debido a algún efecto

de los metabolitos del aceite pues los agentes tensoactivos no contribuyen de manera positiva con estos resultados. Este hallazgo resulta de gran importancia si se tiene en cuenta que los estafilococos son la variedad más virulenta de la familia de los cocos, y son responsables de un gran espectro de enfermedades dependientes de la producción de toxinas, que incluyen desde infecciones cutáneas, diarreas, vómitos y náuseas, hasta neumonías. En cambio, la actividad antibacteriana contra *E. coli* (Gram -) aunque potente, estuvo disminuida con respecto al control positivo y mostró diferencias entre las emulsiones. Estos resultados están en concordancia con otros reportes de la literatura en los que se han detectado que metabolitos derivados de aceites naturales han mostrado actividad inhibitoria contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. (Lehrer et al., 2003; García, 2007)

A partir de los resultados obtenidos en el estudio de estabilidad físico-químico de las emulsiones seleccionadas, a temperatura ambiente y refrigeración, se puede concluir que la estabilidad de sistemas que cotengan aceite de *Carapa guianensis* aumenta con el HLBn del sistema. La estabilidad de las emulsiones fue mejor en condiciones de refrigeración que a temperatura ambiente, siendo los ensayos E20 y E21 los más estables. Por lo tanto según las condiciones del estudio, se propone como HLBn del aceite entre 15 y 16, lo que se corresponde a resultados previos.

Se demostró que en las condiciones ensayadas, el aceite y las emulsiones tenían actividad antimicrobiana, predominantemente antifúngica.

Literatura citada

- Bisal S., Bhattacharya P.K., Moulik S.P. Conductivity study of microemulsions. Evaluation of hydration of oil/water microemulsions applying Bruggeman equation. Journal of Physical Chemistry. 1990, Vol. 94 (10), p 4212-4216.
- Fernández A.A. Preparación, caracterización y estabilidad de emulsiones y microemulsiones O/W. Tesis Doctoral de la Universidad de Granada, España. 2006.
- Ferraris F.K., Rodrigues R., Da Silva V.P., Figueiredo R., Penido C., Henriques M. Modulation of T lymphocyte and eosinophil functions in vitro by natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis*. International Immunopharmacology. 2010. (<http://www.siteulike.org>)
- Ferreira M.R.A., Santiago R.R., de Souza T.P., Egito E.S.T., Oliveira E.E., Soares L.A.L. development and Evaluation of Emulsions from *Carapa guianensis* (Andiroba) Oil. AAPS Pharm. Sci. Tech. 2010, Vol. 11 (3), 1383-1390.
- Forget P.M., Poncy O., Thomas R. S., Hammond D. S., Kenfack D. A new species of *Carapa* (*Meliaceae*) from Central Guyana. Brittonia. 2009, Vol. 61 (4), p 301-402.

- García, F. Diseminación de mecanismos de resistencia a antibióticos entre bacterias de origen humano, animal y agrícola: impacto en la Salud Pública y en el medio ambiente. Boletín Ciencia y Tecnología. 2007, Vol. 56.
- Griffin WC. Classification of Surface-active Agents by “HLB”. Journal of the SCC. 1954, p 4-5.
- Lehrer R.J., Tincu A., Taylor S., Menzel L., Waring A. Natural Peptide Antibiotics from Tunicates: Structures, Functions and Potential Uses. Integr. Comp. Biol. 2003, Vol. 43, p 313-322.
- Macedo J.P.F., Fernandez L.L.L., Formiga F.R., Reis M.F., Nagashima T., Soares L.A.L, Socrates T. E. Micro-emultocrit Technique: A Valuable Tool for Determination of Critical HLB Value of Emulsions. AAPS Pharm. Sci. Tech. 2006, Vol. 7 (1) Art. 21, 2006. (<http://www.aapspharmstech.org>).
- Nakanishi K. et al. Phytochemical survey of Malaysian plants. Chem. Pharm. Bull. 1965, Vol. 13(7), p 882-890.
- Nayak B.S., Kanhai J., Milne D.M., Pinto P.L., Swanston W.H. Experimental Evaluation of Ethanolic Extract of *Carapa guianensis* Leaf for Its Wound Healing Activity Using Three Wound Models. Oxford University Press, 2009. (<http://www.ecam.oxfordjournals.org>)
- Orafidiya L.O., Oladimeji F.A. Determination of the required HLB values of some essential oils. Int. J. Pharm. 2002, Vol. 237(1/2), p 241–9.
- Pingal R. Physical and Chemical Properties of Crabwood Oil, Requirements for Export. 2002, p1. (www.ceh-wallingford.ac.uk)
- Rahate A.R., Nagarkar J.M. Emulsification of vegetable oils using a blend of nonionic surfactants for cosmetic applications. Journal of Dispersion Science and Technology. 2007, Vol. 28 (7), p 1077-1080. (<http://www.redoc.fr>)
- Rodríguez-Rojo S., Varona,S., Núñez M.,Cocero M.J. Characterization of Rosemaryessential oilfor biodegradable emulsions. Industrial Crops and Products. 2012, Vol. 37 (1), p 137 - 140. (<http://www.sciencedirect.com>)
- Solans C., Esquena, J., Azemar N., García C.M.J. Sistemas Tensioactivos Coloidales: Microemulsiones y sus aplicaciones como medios de solubilización y reacción. Química e Industria, 2001, Vol. 522, p 423-430.
- Song M.G., Cho S.H., Kim J.Y., Kim J.D. Novel evaluation method for the water-in-oil (W/O) emulsion stability by turbidity ratio measurements. Korean Journal of Chemical Engineering. 2002, Vol. 19 (3), p 425-430.
- Soro Guevara L.M. Estudio de la obtención de quitosana a partir de la caparazón de camarón (*Penaeus Vannamei*) y su aplicación en la estabilidad de una emulsión aceite y agua. Guayaquil, Ecuador, 2007.

- Tadros T. Application of rheology for assessment and prediction of the long term physical stability of emulsions. *Advance Colloid Interface Science*. 2004, volume 108/109, p 227-258.
- Taylor L. *The Healing Power of Rainforest Herbs: A Guide to Understanding and Using Herbal Medicine*. Square One Publishers. 2004, ISBN-10: 0757001440, ISBN-13: 978-0757001444.
- Vila Jato J.L. *Tecnología farmacéutica. Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas*. Vila Jato J.L. (Editor). Editorial Síntesis. Madrid. 1997, Vol. I. p 260-314.