

# Aceites esenciales preparados en forma de nanoemulsión para la formulación de productos cosméticos

## Essential oils prepared in Nano-emulsion form for the formulation of cosmetic products.

Favio Armando Medina Calderón<sup>1</sup>; Luis Carlos Bautista Barrios<sup>2</sup>

DOI: <http://dx.doi.org/10.23850/24220582.177>

Recibido: 29-10-2015 Aceptado: 30-11-2015

### RESUMEN

En este trabajo se emplearon aceites esenciales con actividad antimicrobiana reportada (orégano, manzanilla, tomillo y limonaria), para obtener nanoemulsiones mediante una técnica de baja energía, en la cual se evaluaron diferentes relaciones de surfactante/aceite (1.5:1; 2:1; 2.5:1 y 3:1), y diferentes concentraciones de NaCl en la fase acuosa (0.01M, 0.1M y 0.5M). Las formulaciones que permitieron obtener nanoemulsiones fueron caracterizadas mediante microscopía de fuerza atómica y se incorporaron a diferentes concentraciones en formulaciones cosméticas (gel antibacterial y crema humectante) para evaluar el tamaño de gota, la actividad antimicrobiana y la capacidad que tienen de actuar como agentes conservantes. La nanoemulsión de orégano mostró los menores tamaños de gota, y una actividad antimicrobiana y capacidad conservante significativamente mayor, con respecto a las formulaciones control (productos sin nanoemulsión y con aceite esencial puro), cuando fue incorporado en formulaciones cosméticas.

**Palabras clave:** nanoemulsión; aceites esenciales; cosméticos; actividad antimicrobiana; agente conservante.

### ABSTRACT

In this study, essential oils with reported antimicrobial activity, (Origanum, Chamomile, Thymus and lemongrass) were employed to obtain Nano-emulsions, using a low energy technique, evaluating different relations of surfactant/oil ratio (1.5:1; 2:1; 2.5:1 and 3:1) and different NaCl concentrations within the aqueous phase (0.01M, 0.1M and 0.5M). The formulations that obtained nano-emulsions were characterized through atomic force microscopy and were incorporated in different cosmetic formulations (antibacterial gel and moisturizing cream) to evaluate the size of the droplet, the antimicrobial activity and the capacity they have to act as conservation agents. The origanum nano-emulsion evidenced the smallest droplet sizes and a significantly higher antimicrobial activity and conservation capacity than the control formulations (product without Nano-emulsions and with pure essential oil) when it was incorporated in cosmetic formulations.

**Key words:** Nano-emulsion; essential oils; cosmetics; antimicrobial activity; conservation agent.

<sup>1</sup>Colombiano. Microbiólogo. Instructor Servicio Nacional de Aprendizaje SENA. Centro Agropecuario La Granja. Red Agrícola. Grupo de Ciencia, Tecnología e Innovación SENAGROTIC. Correo electrónico: fmedinac@misena.edu.co

<sup>2</sup>Colombiano. Ingeniero químico. Talento TecnoParque, Línea de biotecnología y nanotecnología, Servicio Nacional de Aprendizaje SENA. Centro Agropecuario La Granja. Correo electrónico: lcbautistab@gmail.com

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, diversas naciones alrededor del mundo están promoviendo el desarrollo de productos naturales, para lo cual han establecido una normatividad más exigente que procure el cuidado del medio ambiente; por lo tanto, el aprovechamiento sostenible de nuestros recursos naturales para la fabricación de nuevos productos que sustituyan los productos sintéticos utilizados actualmente se ha convertido en una necesidad.

Por muchos años se le ha atribuido distintos tipos de propiedades a los extractos de las plantas aromáticas y medicinales (Adilson y Machado, 2004; Juárez y Castro, 2010). Estas propiedades hacen que los aceites esenciales tengan aplicaciones en diferentes industrias y que su interés comercial esté en crecimiento. En el caso particular de la industria cosmética, se han estudiado las propiedades de los aceites esenciales y se ha determinado que las principales actividades biológicas que presentan estos extractos y que los hace aptos para ser utilizados en formulaciones cosméticas son las actividades antimicrobianas, antioxidantes y antiinflamatorias (CENIVAM, 2008).

Por otra parte, en el caso particular de las actividades antimicrobianas de los aceites esenciales, existe la posibilidad de establecer la capacidad que tienen de actuar como agentes conservantes de productos cosméticos terminados y de evaluar la actividad bactericida e incluso antifúngica durante la aplicación tópica del producto en la piel (Aburjai *et al.*, 2003; Varvaresou, 2009; Kunicka *et al.* 2010).

Para darle un valor agregado y un mayor grado de innovación a los productos cosméticos, se ha planteado la utilización de los aceites esenciales para la preparación de nanoemulsiones. Estas son obtenidas cuando el tamaño de las gotas de una emulsión alcanza aproximadamente 100-500 nm (Shah *et al.*, 2010), el pequeño tamaño de gota es responsable de que puedan resistir la desestabilización física causada por separación gravitacional, floculación o coalescencia (Bernardi *et al.* 2011).

Así pues, las nanoemulsiones se han convertido en vehículos potenciales para la entrega controlada de cosméticos, en productos adecuados para la formulación de cosméticos de uso tópico y para la dispersión optimizada de ingredientes activos en las diferentes capas de la piel. De forma similar a los liposomas, las nanoemulsiones soportan la penetración de ingredientes activos y así incrementan su concentración en la piel (Shah *et al.*, 2010).

El objetivo del proyecto es desarrollar prototipos de productos cosméticos que contengan aceites esenciales nanoemulsionados, con el fin de evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica durante la aplicación tópica en la piel, y la capacidad de actuar como agentes conservantes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos y materiales

Los aceites esenciales de orégano, manzanilla, limonaria y tomillo, y el aceite vegetal de almendras fueron proporcionados por Green Andina Ltda; el carbopol 940, el propilenglicol y la trietanolamina, ingredientes utilizados para la formulación de productos cosméticos, de grado USP, fueron suministrados por Laboratorios San Jorge; los medios de cultivo para la realización de pruebas microbiológicas fueron marca Difco™, mientras que los solventes y sustancias químicas utilizadas durante el desarrollo del trabajo (diclorometano, éter de petróleo, hexano, metanol) fueron de grado reactivo y de marca Sigma y Aldrich.

### Preparación de nanoemulsiones

Las nanoemulsiones se prepararon de acuerdo con los métodos presentados por Heurtault *et al.*,(2002), tal y como lo indica la Tabla 1.

**Tabla 1:**

Variables de formulación de las nanoemulsiones preparadas

Ensayo	Relación S/A	Concentración NaCl, M	HLB (Balance hidrofílico-lipofílico)
1	1,5:1	0,01	óptimo
2	2:1	0,01	óptimo
3	1,5:1	0,1	óptimo
4	2:1	0,1	óptimo
5	2,5:1	0,1	óptimo
6	3:1	0,1	15
7	3:1	0,5	15

Fuente: Autores.

El procedimiento consistió en someter la mezcla emulsionada a ciclos de calentamiento y enfriamiento, haciendo seguimiento de su apariencia para determinar la temperatura de inversión de fase (PIT por sus siglas en inglés) (Heurtault *et al.*, 2011). El seguimiento de la apariencia se llevó a cabo de forma visual. La apariencia traslúcida de la mezcla fue el indicador que el sistema alcanzaba el PIT.

Las variables de formulación en los ensayos fueron la relación Surfactante/Aceite (S/A), y la concentración de sal en la fase acuosa. Las relaciones S/A que se analizaron en el presente estudio fueron: 1.5:1, 2:1, 2,5:1 y 3:1. La fase acuosa de las emulsiones estuvo compuesta por solución salina al 0.01, 0.1 y 0.5 M de NaCl (Heurtault *et al.*, 2002; Zhen *et al.*, 2011). La fracción másica de la fase acuosa y el peso total de las emulsiones fue de 70% y 50 g respectivamente para todas las pruebas.

Con el fin de mejorar la estabilidad de las nanoemulsiones obtenidas, se establecieron previamente para cada aceite los valores óptimos de HLB de la mezcla de surfactantes. La Tabla 2 muestra los valores óptimos de HLB definidos para cada aceite.

**Tabla 2:**

HLB óptimo de los aceites esenciales

Aceite esencial	HLB óptimo
Limonaria	11
Manzanilla	12
Orégano	11
Tomillo	10

Fuente: Autores.

Los valores óptimos de HLB obtenidos fueron 11, 12, 11, 10 para limonaria, manzanilla, orégano y tomillo respectivamente. Para los ensayos posteriores se utilizó Tween 80 (HLB=15) como surfactante para la preparación de nanoemulsiones con todos los aceites.

### Microscopía de fuerza atómica AFM

La prueba se realizó en el microscopio de fuerza atómica marca Nanosurf. EasyScan 2 Flex. Las nanoemulsiones se caracterizaron añadiendo 4  $\mu$ l de una dilución  $10^{-2}$  sobre una mica de 2x2 cm. Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente por 3 horas. Mientras que las muestras se secaron, se activó el software correspondiente y se determinó con cual punta se realizaría el análisis (contacto o no contacto), para este caso se trabajó con la punta de no contacto. Cuando las muestras estuvieron secas y listas para el análisis, se montaron en la base del portamuestras del microscopio de fuerza atómica (AFM por sus siglas en inglés) y se configuró el equipo. Finalmente, se puso en marcha el análisis topográfico y se obtuvieron las imágenes de las muestras.

### Gel antibacterial

Los geles antibacteriales se formularon de acuerdo a la metodología planteada por Méndez (2008). Las sustancias excipientes usadas durante la formulación de los geles fueron: Carbopol 940 (gelificante), glicerina (agente humectante), trietanolamina (alcalinizante).

Para evaluar la actividad antimicrobiana de la nanoemulsión base, se prepararon cinco formulaciones de gel antibacterial a diferentes concentraciones de nanoemulsión antibacteriana (la nanoemulsión antibacteriana se refiere a nanoemulsión de orégano durante todo el estudio). En la Tabla 3 se muestran las formulaciones de gel antibacterial que se evaluaron.

**Tabla 3:**  
Formulaciones de gel antibacterial por cada 100 g

Sustancia	F1	F2	F3	F4	F5
Nanoemulsión antibacteriana, g	0	9,83	17,68	24,1	0
Aceite esencial, g	0	0	0	0	5,0
Alcohol antiséptico, g	62,5	55,5	50,0	45,4	59,0
Excipientes c.s.p	100g	100g	100g	100g	100g

Fuente: Autores.

### Crema humectante

El procedimiento para la preparación de las cremas humectantes se basó en la metodología presentada por Villareal (2004). Los excipientes utilizados en las cremas fueron: Carbopol 940 (gelificante), propilenglicol (agente humectante), fragancia, trietanolamina (alcalinizante) y agua.

Con el fin de evaluar la acción conservante de la nanoemulsión antibacteriana y de comparar su comportamiento con respecto a la acción de un agente conservante sintético convencional; en este caso metilparabeno, se prepararon dos formulaciones de cremas humectantes utilizando los dos tipos de agentes conservantes mencionados anteriormente. Adicionalmente, fueron añadidos a la fórmula nanoemulsión de manzanilla y aceite de almendras, que proporcionaron ingredientes activos cosméticos para la piel. En la Tabla 4 se describe la fórmula detallada de las cremas humectantes.

**Tabla 4:**  
Formulaciones de crema humectante por cada 100 g

Sustancia	F1	F2
Metilparabeno, g	0,0	0,5
Nanoemulsión antibacteriana, g	10,0	0,0
Nanoemulsión Manzanilla, g	27,7	27,7
Aceite de almendras, g	15,0	15,0
Excipientes c.s.p	100 g	100 g

Fuente: Autores.

### Control de calidad microbiológico

Los microorganismos patógenos que se evaluaron fueron: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella entérica* NCTC 6017, recomendados por la farmacopea de Estados Unidos (USP), de Europa (EP), y

por el organismo de control en Colombia (INVIMA), para la evaluación y métodos de análisis de productos cosméticos.

### Difusión en placa

Para evaluar la efectividad de las formulaciones de gel antibacterial durante la aplicación tópica en la piel y la capacidad que tienen de actuar contra microorganismos patógenos, se llevó a cabo la prueba de difusión en placa. En esta prueba se estableció la concentración de nanopartículas para que el gel antibacterial tuviera la efectividad esperada.

El medio de cultivo que se utilizó para la realización de la prueba fue el Mueller Hinton Agar. La metodología detallada para llevar a cabo el procedimiento completo se encuentra en Ministerio de Salud del Perú (2002).

El parámetro que se utilizó como indicador para establecer el grado de inhibición de las formulaciones de gel antibacterial fue el porcentaje de inhibición, el cual se calculó a partir de la Ecuación 1.

$$\%I = \left( \frac{D_h - D_d}{D_h} \right) * 100 \quad (1)$$

Donde  $D_h$  es el diámetro del halo de inhibición.  $D_d$  es el diámetro del disco de inhibición; este parámetro es constante y tiene un valor de 0,6 cm.

### Evaluación microbiológica

Para establecer la acción conservante de los agentes antimicrobianos adicionados a las cremas humectantes formuladas, se llevó a cabo el análisis microbiológico por medio de la metodología recomendada en la NTC 4833, en la cual están establecidos los límites máximos permisibles para que un producto cosmético sea considerado seguro y pueda ser ofertado en el mercado. En las Tablas 5 y 6 se muestran los límites permitidos para microorganismos indicadores de calidad y microorganismos patógenos respectivamente, que fueron establecidos en la NTC 4833.

**Tabla 5:**

Límites máximos permisibles de contaminación por microorganismos indicadores de calidad

Microorganismos	Cosméticos bebé y área de los ojos	Cosméticos en general
Mesófilos aerobios	<100 UFC/ml	<1000 UFC/mL
Mohos y levaduras	<50 UFC/ml	<100 UFC/mL

Fuente: Autores.

**Tabla 6:**

Límites máximos permisibles de contaminación por microorganismos patógenos

Microorganismos	Ausencia	Presencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	X	
<i>Escherichia coli</i>	X	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	X	
<i>Salmonella spp.</i>	X	

Fuente: Autores.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Preparación de nanoemulsiones

En trabajos realizados anteriormente, se reportó la influencia que tienen algunos parámetros de la formulación sobre la formación de los mecanismos de nanoemulsificación y sobre el PIT (Santana *et al.*, 2013; Anton y Vandamme, 2009; y Salager, 1998). La relación S/A, el HLB, la concentración de sal en la fase acuosa y el orden de adición de los componentes son los parámetros que más han demostrado influencia sobre la preparación de nanoemulsiones (Santana *et al.*, 2013).

La ejecución de la metodología de preparación de nanoemulsiones permitió establecer que la utilización del HLB óptimo de cada aceite, no garantiza la obtención de nanoemulsiones estables con tamaño de partícula a escala nanométrica. Para lograr disminuir el tamaño de gota dispersa en una emulsión, mediante el método

de temperatura de inversión de fase, es indispensable proporcionar una cantidad de surfactante en exceso a la mezcla, que garanticen tener moléculas de surfactante disponibles para cubrir el área entera de las gotas dispersas cuando disminuyen su tamaño, dado que la relación superficie/volumen aumenta drásticamente al disminuir el tamaño de las partículas (Salager, 1998). Por lo tanto, se ha establecido previamente por otros autores que variables como la relación S/A tienen una mayor influencia durante la formación de nanoemulsiones (Anton y Vandamme, 2009).

Con respecto a la relación S/A y la concentración de sal en la fase acuosa, se pudo observar que una mayor relación S/A mejora notablemente la facilidad del sistema para formar mecanismos de nanoemulsificación; y una mayor concentración de sal en la fase acuosa disminuye el PIT del sistema. En la Tabla 7 se muestra el PIT para cada ensayo y aceite esencial.

Por otra parte, fue posible establecer la influencia que tiene las estructuras químicas de la mezcla de componentes de los aceites esenciales sobre la formación de mecanismos de nanoemulsificación, debido a que dentro del rango de las variables de formulación evaluadas en el presente estudio, solo los aceites esenciales de orégano y manzanilla formaron las nanoemulsiones. Para la realización de los análisis posteriores (formulación de productos cosméticos, caracterización en el AFM y pruebas microbiológicas) solo fueron utilizadas las nanoemulsiones de orégano y manzanilla.

**Tabla 7:**

Temperatura de inversión de fase de las nanoemulsiones formuladas

Ensayo	Temperatura de inversión de fase, °C			
	Limonaria	Manzanilla	Orégano	Tomillo
1	>97	82-84	>98	>95
2	>95	86-89	>95	>96
3	>95	82-85	>96	>95
4	>85	>94	>91	>94
5	>96	74-82	50-75	>95
6	>97	93-98	77-89	>97
7	>98	84-88	67-80	>97

Fuente: Autores.

### Caracterización de nanoemulsiones en AFM

Para la caracterización de las gotas de las nanoemulsiones, se utilizó la técnica de Microscopía de fuerza atómica, por medio de la cual se determinó la forma y el tamaño de las gotas obtenidas a partir de las diferentes formulaciones preparadas.

Las gotas caracterizadas en el AFM presentaron una forma similar a un elipsoide, por lo tanto, fue posible calcular el volumen de las gotas ( $V_g$ ) a partir de la solución analítica de la función integrada de una elipse, como se muestra en la Ecuación 2.

$$V_g = \frac{\pi}{3} h_g r_g^2 \quad (2)$$

Donde  $h_g$  y  $r_g$  son la altura y el radio de la gota respectivamente. Para estimar el diámetro medio de las gotas se supuso una morfología regular y se determinó el diámetro como si la gota fuera completamente esférica.

El diámetro medio de las gotas ( $D_e$ ) se calculó a partir de la Ecuación 3.

$$D_e = \sqrt[3]{\frac{6V_g}{\pi}} \quad (3)$$

Las formulaciones que se caracterizaron en el AFM presentaron una apariencia translúcida, con cierto grado de diferencia en su turbidez y se seleccionaron, principalmente, las emulsiones con un PIT definido. En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos durante la caracterización de las nanoemulsiones en el AFM.

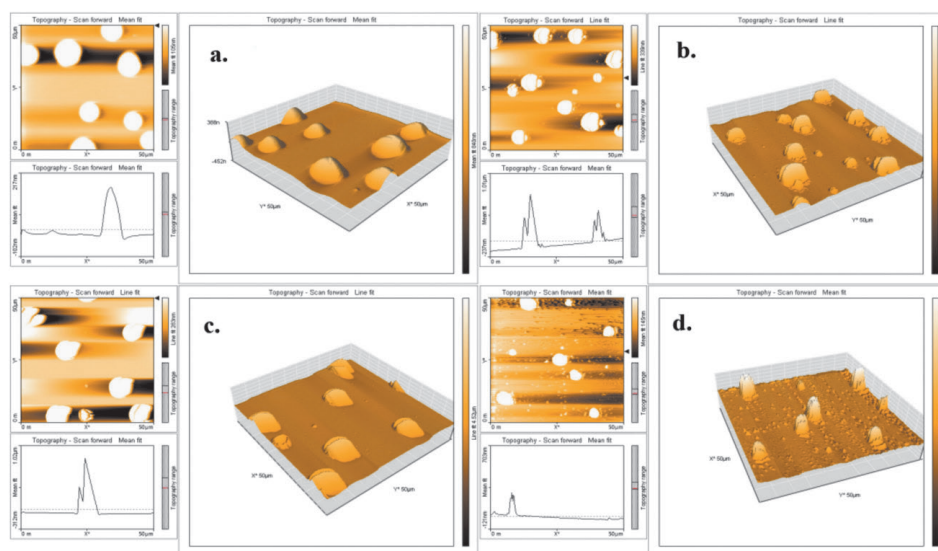
Para la toma de datos en el AFM, se hicieron lecturas del equipo en diferentes posiciones de la muestra; en cada lectura se caracterizó el tamaño de las nanopartículas, midiendo el diámetro y la altura de las gotas. La Figura 1 muestra algunas de las imágenes tomadas en el AFM durante la lectura de las muestras.

**Tabla 8:**

Tamaño de partícula de las nanoemulsiones caracterizadas en el AFM

Ensayo	Aceite	$r_g$ ,	$h_g$ ,	$V_g$ ,	$D_e$ ,
6	Manzanilla	6381,0	255,1	263092653	740,0
6	Orégano	5496,4	657,7	3291222511	1332,9
7	Manzanilla	4840,0	554,3	933176158	1139,6
7	Orégano	2860,8	299,4	276588787	631,5

Fuente: Autores.



**Figura 1.** Caracterización de nanoemulsiones en el AFM. a. Manzanilla ensayo 6; b. Manzanilla ensayo 7; c. Orégano ensayo 6; d. Orégano ensayo 7

Fuente: Autores.

Se caracterizaron en total 10 gotas por cada muestra; los valores de radio, altura y volumen de las gotas (ver Tabla 8) fueron calculados como el valor promedio de las 10 mediciones realizadas para cada gota en cada muestra. El diámetro medio de las gotas ( $\bar{D}_g$ ) se determinó a partir de la Ecuación 3, y también se tomó como el valor promedio de todas las mediciones realizadas.

Para que las gotas de una nanoemulsión sean consideradas nanométricas, se estableció previamente un rango para el diámetro medio de las gotas. Según lo reportado en la literatura, el diámetro medio de las gotas debe estar en un rango entre 100-500 nm (Shah *et al.*, 2010; Anjali *et al.*, 2012).

Las preparaciones de nanoemulsiones caracterizadas en el AFM estuvieron por fuera del rango recomendado para considerar a estos sistemas como nanométricos. Sin embargo, las cuatro formulaciones que fueron referenciadas en el presente trabajo se consideraron nanoemulsiones, por la capacidad que tuvieron de formar mecanismos de nanoemulsificación a las condiciones establecidas.

Con los resultados obtenidos fue posible determinar que la nanoemulsión de manzanilla preparada en el ensayo 6; tuvo menores tamaños de partícula en comparación con la preparada en el ensayo 7. Por lo tanto, se evidencia que el

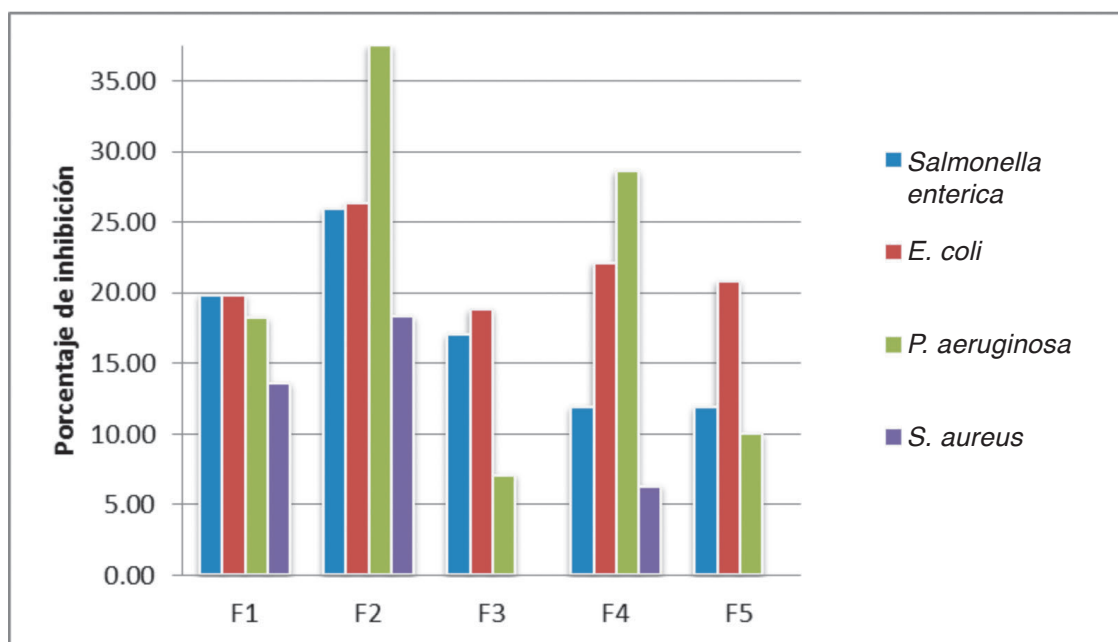
incremento de la relación S/A y de la concentración de sal en la fase acuosa, no tuvo una incidencia positiva sobre la formación de nanoemulsiones con pequeños tamaños de partícula.

En el caso de las nanoemulsiones de orégano, ocurrió un fenómeno completamente contrario, ya que el incremento de la relación S/A y el incremento de la concentración de sal en la fase acuosa favorecieron la formación de nanoemulsiones con tamaños de partícula más pequeños y disminuyeron la temperatura de inversión de fase de los sistemas nanoemulsificados.

#### Actividad antimicrobiana de geles antibacteriales

En este trabajo se incorporaron nanoemulsiones de aceites esenciales en diferentes formulaciones de geles antibacteriales, con el fin de evaluar la influencia que tiene la concentración de nanopartículas sobre el porcentaje de inhibición de microorganismos patógenos.

La Figura 2 muestra los resultados obtenidos durante la realización de la prueba de difusión en placa, donde se observa el porcentaje de inhibición de los microorganismos frente a cada formulación de gel. Cabe aclarar que los ensayos fueron realizados por cuadruplicado y que el porcentaje de inhibición fue el valor promedio de los cuatro ensayos.



**Figura 2.** Porcentaje de inhibición de microorganismos patógenos en las formulaciones de gel antibacterial.

Fuente: Autores.

Las desviaciones estándar de los porcentajes de inhibición se muestran en la Tabla 9.

**Tabla 9:**

Desviación estándar de los porcentajes de inhibición de microorganismos patógenos

Microorganismo	Desviación estándar				
	F1	F2	F3	F4	F5
<i>Salmonella entérica</i>	0,121	0,121	0,021	0,112	0,112
<i>E. coli</i>	0,121	0,138	0,083	0,110	0,100
<i>P. aeruginosa</i>	0,100	0,100	0,046	0,225	0,148
<i>S. aureus</i>	0,138	0,160	0,000	0,083	0,000

Fuente: Autores.

Para comparar el efecto bactericida entre las formulaciones que contienen nanoemulsiones de orégano, con respecto a las formulaciones control que contienen alcohol y alcohol + orégano puro como agentes antimicrobianos, se prepararon las formulaciones 1 y 5 respectivamente. Los resultados demuestran que la incorporación de nanoemulsiones a concentraciones cercanas al 9.83% (w/w) mejora el porcentaje de inhibición con respecto a los porcentajes de inhibición arrojados por las formulaciones control. Sin embargo, a medida que se aumenta la concentración de la nanoemulsión en el gel, el efecto bactericida se reduce y se evidencia que ciertos microorganismos tienen mayor sensibilidad a las formulaciones 1 y 5.

En este orden de ideas, se observó que el incremento en la concentración de nanoemulsión en los geles antibacteriales, ocasionó la inestabilidad en las formulaciones 3 y 4, un efecto adverso sobre la actividad antimicrobiana del producto, probablemente originado por el incremento en el tamaño de las nanopartículas de aceite esencial. En trabajos anteriores se ha estudiado la influencia entre el tamaño de las nanopartículas y la actividad antimicrobiana. Sin embargo, (Donsi *et al.*, 2011) definieron que es difícil establecer una correlación directa entre el tamaño de gota con la actividad antimicrobiana, debido a que es factible que algunas moléculas con actividad antimicrobiana se degraden durante el proceso de nanoemulsificación.

Las formulaciones, en general, demostraron una actividad antimicrobiana significativa contra *Salmonella entérica*, *E. coli*, y *Pseudomonas aeruginosa*. Por otra parte, se evidenció una inhibición moderada, y en ciertos casos nula, contra la cepa de *Staphylococcus aureus*.

#### Evaluación microbiológica de cremas humectantes

En este trabajo se evaluó la capacidad de las nanoemulsiones de actuar como agentes conservantes al ser incorporadas en formulaciones cosméticas de crema humectante (Manou *et al.*, 1998; Kunicka *et al.*, 2009; Kunicka *et al.*, 2010). Para la evaluación de la capacidad

conservante de las nanoemulsiones se compararon los resultados de la evaluación microbiológica de la crema que utiliza la nanoemulsión de orégano como sistema preservante (fórmula 1); contra los resultados de la evaluación microbiológica de una formulación que utiliza un conservante sintético convencional (fórmula 2). Los reportes de la evaluación microbiológica de las dos formulaciones se muestran en las Tablas 10 y 11.

**Tabla 10:**

Conteo de UFC/ml de microorganismos indicadores de calidad

Microorganismo	Fórmula 1	Fórmula 2
Mesófilos aerobios, UFC/ml	160	520
Hongos y levaduras, UFC/ml	20	<10
Coliformes totales, UFC/ml	<10	<10
Coliformes fecales, UFC/ml	<10	<10

Fuente: Autores.

**Tabla 11:**

Ausencia o presencia de microorganismos patógenos en las muestras a 24 h

Microorganismo	Fórmula 1		Fórmula 2	
	A*	P**	A	P
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	X		X	
<i>Escherichia coli</i>	X		X	
<i>Staphylococcus aureus</i>		X		X
<i>Salmonella spp.</i>	X		X	

\*Ausencia; \*\*Presencia

Fuente: Autores.

La evaluación microbiológica de las formulaciones preparadas demostró que la población de microorganismos indicadores de calidad (microorganismos aerobios mesófilos, hongos y levaduras, coliformes totales y coliformes fecales) en las dos cremas; medida en UFC/mL, estuvo por debajo de los estándares definidos en la NTC



4833. Sin embargo, la evaluación de microorganismos patógenos mostró que las dos cremas no inhibieron el crecimiento de la cepa *Staphylococcus aureus*.

Al comparar la evaluación microbiológica de las dos cremas, se observó que la fórmula 1 tuvo mayor efecto bactericida contra microorganismos aerobios mesófilos que la fórmula 2; es decir, que los mecanismos de acción de las nanopartículas de orégano fueron más efectivos que el metilparabeno para controlar la población de microorganismos aerobios mesófilos en el producto terminado. Por otra parte, la fórmula 2 tuvo mayor capacidad de controlar la población de hongos y levaduras en comparación con la fórmula 1; por lo tanto, la nanoemulsión de orégano no tiene una actividad antifúngica significativa.

Con respecto a la población de coliformes totales y coliformes fecales; y la presencia/ausencia de microorganismos patógenos, las dos formulaciones no evidenciaron diferencias significativas. Por consiguiente, se puede establecer que la acción antibacteriana de los agentes conservantes contra estos microorganismos es similar.

## CONCLUSIONES

Apesar que el diámetro medio de las gotas de las emulsiones superaron el tamaño máximo previamente establecido para que el sistema sea considerado nanométrico, durante el desarrollo del trabajo consideramos los ensayos 6 y 7 de las emulsiones de orégano y manzanilla como nanoemulsiones, por su apariencia traslúcida, la evidente formación de mecanismos de nanoemulsificación y la obtención de gotas con tamaños inferiores a 1  $\mu\text{m}$  o 1000 nm. Adicionalmente, con la realización de estos ensayos logramos observar la influencia de las variables de formulación sobre los tamaños de gotas de las nanoemulsiones, razón por la cual se sugiere ajustar en trabajos posteriores estas variables, para obtener nanopartículas que se encuentren en el rango de la escala nanométrica; esto con el fin de mejorar las características y propiedades de las nanoemulsiones preparadas.

El máximo porcentaje de inhibición contra microorganismos patógenos en los geles antibacteriales se obtuvo con una formulación que contenía la menor concentración de nanopartículas de orégano, por lo tanto, las nanoemulsiones de aceites esenciales se proyectan como una alternativa factible para la formulación de productos de interés comercial, debido a que son agentes antibacteriales efectivos a bajas concentraciones.

Probablemente, el incremento de la cantidad de nanoemulsión en la formulación, disminuyó la actividad antimicrobiana en el gel antibacterial, debido a que las nanopartículas de aceite esencial de orégano se desestabilizaron a bajas concentraciones cuando fueron incorporadas a las formulaciones de gel. Esto ocasionó un incremento en el tamaño de las partículas, de modo que los mecanismos de acción de las nanoemulsiones sobre los microorganismos se pudieron inhibir y disminuir su efecto antimicrobiano.

La presencia de *Staphylococcus aureus* en las cremas pudo deberse a contaminación cruzada en el momento de la elaboración del producto, y no a la resistencia del microorganismo a los agentes antimicrobianos. Por lo tanto, se recomienda realizar pruebas de actividad antimicrobiana a diferentes concentraciones de los agentes antimicrobianos, para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y establecer específicamente la resistencia o sensibilidad del *Staphylococcus aureus* a los agentes antimicrobianos estudiados.

## REFERENCIAS

- Aburjai, T. Natsheh, Feda M. (2003). Plants used in cosmetics. *Phytoter. Res*, 17, 987-1000.
- Adilson, A. L., Machado, C., Delarmelina, G. M., Figueira, M. C. Duarte, V., y Rehder, L. (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil, *Brazilian Journal of Microbiology* 35, 275-280.
- Anjali, C. H., Sharma, Y., Mukherjee, A., handrasekaran, N. (2012) Neem oil (*Azadirachta indica*) nanoemulsion-a potent larvicidal agent against *Culex quinquefasciatus*. *Pest Manag Sci*, 68, 158-163.
- Anton, N. & Vandamme, T. F. (2009). The universality of low-energy nano-emulsification. *International Journal of Pharmaceutics*, 377, 142-147.
- Bernardi, D. S., Pereira, T., Maciel, N., Bortoloto, J., Viera, G., Oliveira, G., Rocha-Fiho, P. (2011). Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: in vitro and in vivo assessment. *Journal of nanobiotechnology*, 9(44), 1-9.
- Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM. (2008). *Aplicaciones cosmecéuticas de los aceites esenciales y compuestos naturales en el cuidado de la piel*. Bucaramanga: Dirección de Planeación de Colciencias.

- Donsi, F., Annunziata, M., Sessa, M., Ferrari, G. (2011). *Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods*. *LWT. Food Science and Technology*, 44,1908-1914.
- Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J., & Benoit, J. (2002). A Novel Phase Inversion-Based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharmaceutical Research*, 19(6), 875-880.
- Juárez, J., Castro, A. J. (2010). *Composición química, actividad antibacteriana del aceite esencial de Citrus sinensis L. (Naranja dulce) y formulación de una forma farmacéutica*, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Kunicka, A., Sikora, M., Kalembe, D. (2009). Antimicrobial activity of lavender, tea tree and lemon oils in cosmetic preservative systems, *Journal of Applied Microbiology*.
- Kunicka, A., Sikora, M., Kalembe, D. (2010). Lavender, tea tree and lemon oils as antimicrobials in washing liquids and soft body balms, *International Journal of Cosmetic Science*, 33, 52-61.
- Manou, I., Bouillard, L., Devleeschouwer, M. J., Barel, A.O. (1998). Evaluation of the preservative properties of Thymus Vulgaris essential oil in topically applied formulations under a challenge test. *Journal of Applied Microbiology*, 84,368-376.
- Méndez, E. (2008). *Elaboración, control de calidad y evaluación "In vivo" de la actividad antibacteriana de un gel obtenido del extracto alcaloidal del chocho*. (Tesis de grado). Facultad de Ciencias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Ministerio de Salud del Perú. Serie de Normas Técnicas N° 30. (2002). *Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión*. Lima, Perú.
- Salager, J.L. (1998). Formulación HLB, PIT, R de Winsor. *Laboratorio de formulación, interfaces, reología y procesos*, Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela.
- Santana, R.C., Perrechil, F.A., Cunha, R.L. (2013). High- and Low-Energy Emulsifications for Food Applications: A Focus on Process Parameters. *Food Eng Rev*, DOI 10.1007/s 12393-013-9065-4.
- Shah P., Bhalodia D., Shelat P. (2010). Nanoemulsion: A Pharmaceutical Review. *Sys Rev Pharm*, 1, 24-32.
- Varvaresou, A., Papageorgiou, S., Tsirivas, E., Protopapa, E., Kintziou, H., Kefala, V., Demetzos, V. (2009). Self-preserving cosmetics. *International Journal of cosmetic science*, 31,163-175.
- Villareal, A. (2004). *Formulación de una nanoemulsión dermocosmética, nutritiva, y regeneradora de la piel*. (Tesis de maestría). Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela.
- Zhen, M., Jian, X., Dejun, S. (2011). O/W nano-emulsion with tunable PIT induce by inorganic salts. *Colloids and surfaces A: physicochem. Eng. Aspects*, 375, 102-108.