

## **Balance hidrófilo-lipófilo de la quitosana derivada de quitina de langosta (*Panulirus argus*) empleando tensoactivos no iónicos**

Hydrophilic- lipophilic balance of chitosan derived from lobster chitin  
(*Panulirusargus*) using non-ionic surfactants

Nilia de la Paz Martín-Viaña<sup>1</sup> 

Mirna Fernández Cervera<sup>2\*</sup> 

Dania Pérez Ricardo<sup>2</sup> 

Yaima La Rosa Kessell<sup>3</sup> 

Antonio Nogueira Mendoza<sup>1</sup> 

Oscar García Pulpeiro<sup>4</sup> 

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. La Habana, Cuba.

<sup>2</sup>Universidad de la Habana, Instituto de Farmacia y Alimentos. La Habana, Cuba.

<sup>3</sup>Laboratorios MedSol. La Habana, Cuba.

<sup>4</sup>Empresa Laboratorio Farmacéutico Roberto Escudero. La Habana, Cuba.

\* Autor para la correspondencia: [mirnafc@ifal.uh.cu](mailto:mirnafc@ifal.uh.cu)

### **RESUMEN**

**Introducción:** Un parámetro indispensable para una formulación óptima de emulsiones es el valor del balance hidrófilo-lipófilo que tiene el agente emulgente.

**Objetivo:** Determinar el valor del balance hidrófilo-lipófilo de la quitosana derivada de quitina de langosta, en emulsiones de aceite en agua, por el método de Griffin.

**Métodos:** Se elaboraron emulsiones aceite en agua con un 3 % de mezcla emulgente, compuestas por el biopolímero y tres tipos de polisorbato, en diferentes proporciones, se consideraron adecuadas aquellas con menor volumen de fase acuosa separada transcurridos 14 días. Se seleccionaron tres emulsiones empleando polisorbato 80/quitosana, en relación 30:70, 20:80 y 10:90, se comprobó que con el incremento de la concentración de quitosana aumentaba la estabilidad del sistema. La emulsión seleccionada (E9) fue evaluada durante 45 días en diferentes condiciones térmicas.

**Resultados:** A partir de las 48 horas y hasta el final del tiempo de estudio las emulsiones que contenían un 80 %, 90 % y 100 % del biopolímero, del total de la mezcla de emulgente, se mantuvieron estables y el valor de balance hidrófilo-lipófilo de la quitosana, derivada de quitina de langosta, es entre 11 y 12. Al aumentar la concentración de quitosana el aspecto visual fue mejorando, la tensión en la interfase aceite-agua disminuyó, mientras que la viscosidad de la fase continua y la estabilidad de la emulsión se incrementaron.

**Conclusiones:** Las emulsiones elaboradas con quitosana y polisorbato 80, como mezcla emulgente, mostraron mayor estabilidad con la disminución de la tensión interfacial entre las fases y el aumento de la viscosidad de la fase continua al incrementarse la concentración del biopolímero, siendo el mecanismo principal de estabilización de los polímeros, lo que permitirá el empleo de la quitosana, derivada de quitina de langosta, como estabilizante de sistemas dispersos para uso farmacéutico.

**Palabras clave:** balance hidrófilo-lipófilo; emulsión aceite en agua; quitosana.

## ABSTRACT

**Introduction:** An essential parameter for an optimum formulation of emulsions is the value of the hydrophilic- lipophilic balance that has the emulsifying agent.

**Objective:** To determine by the Griffin's method the value of the hydrophilic- lipophilic balance of chitosan derived from lobster chitin in oil-in-water emulsions.

**Methods:** There were developed oil-in-water emulsions with a 3 % of emulsifying mixture composed by the biopolymer and three types of polysorbate in different proportions; there were considered appropriate those with lower volume of aqueous phase separated after 14 days. Three emulsions were selected using polysorbate 80/chitosan in relation 30:70, 20:80 and 10:90; and it was found that with the increase of the chitosan concentration increased the stability of the system. The emulsion selected (E9) was assessed during 45 days in different thermal conditions.

**Results:** From the 48 hours and until the end of study time, the emulsions containing an 80 %, 90 % and 100 % of the biopolymer of the total mixture of emulsifier remained stable and the value of hydrophilic- lipophilic balance of chitosan derived from lobster chitin was between 11 and 12. When increasing the concentration of chitosan the visual appearance was improving, the tension on the oil-water interface decreased, while the viscosity of the continuous phase and the emulsion stability increased.

**Conclusions:** The emulsions prepared with chitosan and polysorbate 80, as an emulsifying mixture, showed greater stability with the decrease of the interfacial tension between the phases and the increased viscosity of the continuous phase to increase the concentration of the biopolymer being the main mechanism of stabilization of polymers, which will allow the use of chitosan derived from lobster chitin as stabilizer of dispersed systems for pharmaceutical use.

**Keywords:** hydrophilic- lipophilic balance; oil in water emulsion; chitosan.

Recibido: 01/10/2018

Aceptado: 04/07/2019

## Introducción

El término emulsionante se refiere a sustancias capaces de disminuir la tensión superficial entre dos líquidos inmiscibles, lo que permite la formación de una emulsión mediante la agitación mecánica. Sin embargo, existen sustancias que aunque no tengan capacidad superficial o tienen poca, logran estabilizar emulsiones por otros mecanismos.<sup>(1)</sup> A estas sustancias se les conoce, como estabilizadores, ya que le confieren estabilidad al sistema disperso.

En muchas aplicaciones los polímeros son utilizados como espesantes para modificar la reología de la fase continua. En algunos casos forman una estructura gelatinosa debido a la asociación o entrecruzamiento de las largas cadenas, lo que les permite crear una red tridimensional en la fase discontinua inmovilizando de esta manera la fase dispersa. El efecto espesante obliga a las gotas dispersas a permanecer suspendidas en el medio, lo que suprime su flotación y sedimentación.

Sin embargo, algunos polímeros no tienen por qué adsorberse en la interfase de la emulsión, por lo tanto, no previenen la coalescencia de las gotas por este mecanismo. La mayoría de los polímeros hidrófilos solubles en agua, por ejemplo, los polisacáridos, muestran una actividad tensoactiva casi nula en la interfase agua-aceite.<sup>(2)</sup>

Un estabilizador se puede definir como un componente químico individual que confiere una estabilidad a la emulsión de larga duración; la que podría darse por un mecanismo de adsorción, aunque no es el único mecanismo para alcanzar la estabilidad. Los estabilizadores son, regularmente, biopolímeros (proteínas o polisacáridos). Sin embargo, los tensoactivos de reducido tamaño molecular no son tan efectivos para conferir una estabilidad de larga duración. La principal acción de estabilización de los polisacáridos ocurre a través de la modificación de la viscosidad de la fase continua acuosa. Las proteínas, por otro lado, tienden a adsorberse en la interfase aceite-agua para formar capas estabilizantes alrededor de las gotas de la fase oleosa y así poder cumplir con las funciones de emulsificación y estabilización.<sup>(3)</sup>

Para que un biopolímero sea más efectivo en la estabilización de partículas dispersas o gotas de emulsión, debe tener las siguientes características: fuerte adsorción, recubrimiento completo de la superficie (presencia de suficiente polímero para saturar la superficie), formación de una capa gruesa de estabilización estérica (el polímero es predominantemente hidrofílico y de alta masa molecular) y formación de una capa eléctricamente cargada estabilizante (la presencia de una capa cargada en el polímero es indispensable).<sup>(3)</sup>

La quitosana, como la quitina, es un polisacárido biodegradable, biocompatible, de baja toxicidad, abundante en la naturaleza y renovable.<sup>(4)</sup> Diversos estudios se han basado en las propiedades emulsificantes de la quitosana para obtener emulsiones estables del tipo aceite/agua, esto se debe a la estabilización electrostática y a la viscosidad que esta aporta al sistema a medida que se incrementa su concentración.<sup>(5,6)</sup>

La quitosana puede utilizarse en la preparación de emulsiones estables: sin ningún otro tensoactivo,<sup>(5,6,7)</sup> junto con otros aniónicos e iónicos,<sup>(8,9)</sup> en conjugación con diferentes proteínas<sup>(10,11,12)</sup> o en capas múltiples con componentes aniónicos.<sup>(13,14,15,16)</sup> *Payet y Terentjev*

demonstraron que se podían obtener emulsiones estables de parafina en disolución acuosa agregando quitosana como único emulgente.<sup>(17)</sup>

Un parámetro indispensable para una formulación óptima de emulsiones es el valor del balance hidrófilo-lipófilo (HLB) que tiene el agente emulgente. *Schulz* y otros. investigaron las propiedades de la quitosana como emulgente a través de la evaluación de la tensión interfacial y conductividad eléctrica de emulsiones agua/aceite/agua. El valor de HLB para la quitosana, que determinaron por el método de medición del diámetro de la gota de tolueno, fue de 36,73.<sup>(5)</sup> El objetivo del presente estudio es evaluar las propiedades estabilizantes de la quitosana en sistemas semisólidos, a través de la determinación del valor del balance hidrófilo-lipófilo de la quitosana, derivada de quitina de langosta, la evaluación y estudio de estabilidad de las emulsiones de quitosana y polisorbato 80.

## Métodos

La quitosana derivada de quitina de langosta (*Panulirus argus*) fue obtenida en el Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM, Cuba), según el procedimiento tecnológico reportado por de la *Paz* y otros.<sup>(18)</sup> La quitosana correspondió a un polvo con 6,3 % de humedad, 0,5 % de cenizas sulfatadas, 0,3 % de material insoluble, 79,9 % de grado de desacetilación y 310 000 g/mol de masa molecular.

Todos los emulgentes (polisorbato 20, 60 y 80) fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania), el petrolato líquido pesado por Dilube SA (España) y el ácido acético glacial p.a por Panreac (España).

### **Elaboración de las emulsiones para la determinación del balance hidrófilo-lipófilo (HLB) de la quitosana**

Para la determinación del HLB de la quitosana se utilizó el método de Griffin.<sup>(19,20)</sup>

Las emulsiones fueron elaboradas siguiendo la composición de la mezcla de emulgentes hidrofílicos (quitosana/polisorbato) que se presenta en la tabla 1. Los emulgentes fueron pesados en balanza analítica (SartoriusTE 214S, Alemania).

Todas las emulsiones del tipo aceite/agua contenían un 30 % de petrolato líquido pesado (HLB = 12) y un 3 % de la mezcla de emulgentes hidrofílicos.

Para la preparación de las emulsiones se disolvió el polisorbato 20, 60 y 80 en agua destilada (pH = 5,2) a temperatura ambiente, con agitación magnética moderada durante media hora (MAG-MIX, Estados Unidos).

La quitosana fue disuelta en disolución de ácido acético 1 % (pH = 2,9), con agitación mecánica (Heidolph, Alemania) de 1 a 2 horas. Transcurridas 24 horas se observó si había presencia o no de material insoluble. Teniendo en cuenta la composición de las emulsiones (Tabla 1) se mezcló la disolución del polisorbato con la del biopolímero, con agitación mecánica durante media hora. El petrolato líquido pesado se adicionó a la preparación, mientras, se emulsificaba en un

homogeneizador de alta velocidad modelo Ultra-Turrax (IKA, mod. T-25, Staufen, Alemania) a  $13\ 500\ \text{min}^{-1}$ , durante cinco minutos. Tres series independientes de emulsiones fueron preparadas para cada tipo de composición.

**Tabla 1** - Composición de la mezcla de emulgentes y valores de HLB de la quitosana

Ensayo	Masa polisorbato (g)	Masa quitosana (g)	HLB quitosana		
			Polisorbato 20	Polisorbato 60	Polisorbato 80
E1	3,0	0,0	-	-	-
E2	2,7	0,3	-	-	-
E3	2,4	0,6	-	0,40	0,00
E4	2,1	0,9	1,03	5,23	5,00
E5	1,8	1,2	4,95	7,65	7,50
E6	1,5	1,5	7,30	9,10	9,00
E7	1,2	1,8	8,87	10,07	10,00
E8	0,9	2,1	9,99	10,76	10,71
E9	0,6	2,4	10,83	11,27	11,25
E10	0,3	2,7	11,48	11,68	11,67
E11	0,0	3,0	12,00	12,00	12,00

Las emulsiones se colocaron en probetas de 100 mL durante 14 días, se evaluó periódicamente su apariencia visible y se midió el volumen de fase acuosa separada. Cuando concluyó el estudio las proporciones de mezcla emulsionante que se consideraron adecuadas fueron aquellas en las que se observó menor volumen de fase acuosa separada.

### Evaluación de las emulsiones

A partir de los resultados de la determinación del valor de HLB, fueron seleccionadas las emulsiones correspondientes a los ensayos E8, E9 y E10 (mezcla de emulgente: quitosana/polisorbato 80) para realizar su evaluación transcurridas 72 horas de elaboradas. Se determinó la densidad por picnometría de la fase acuosa (agua destilada/polisorbato 80), la fase oleosa (petrolato líquido pesado) y de la disolución de ácido acético al 1 %. Las tensiones interfaciales entre la disolución de ácido acético 1 % y el petrolato líquido pesado, así como entre la fase acuosa y oleosa de cada una de las emulsiones, se midieron a  $25\ ^\circ\text{C}$  en un tensiómetro (KRÜSS modelo K-8, Alemania).

Para la determinación de la viscosidad aparente de la fase continua de cada emulsión se empleó un rotoviscosímetro Haake, modelo RV 20 (Alemania) acoplado a un ordenador mediante un Rheocontroller, modelo RC 20, como interfase y a un ultratermostato, modelo F 3, ambos de la firma Haake. Se utilizó el sistema de medición M5 y el sensor NV estándar de cilindros concéntricos, a una velocidad de  $108\ \text{s}^{-1}$ . Se trabajó a una temperatura de  $25 \pm 0,1\ ^\circ\text{C}$  y el

programa utilizado para el análisis de los datos en el ordenador fue el ROT 2.3 de la propia firma.

Se estudió el envejecimiento de las emulsiones en el tiempo al someterlas al proceso de centrifugación durante 2 horas, equivalente a 14 días. Se utilizó una centrífuga (Janetzki modelo T32C, Alemania) con radio de giro de 0,15 m y una velocidad de centrifugación de  $1000 \text{ min}^{-1}$ .<sup>(21)</sup>

Se pesaron 20 g de cada emulsión y envasaron en tubos de ensayo (modelo TRIMEX®, España), por triplicado.

### Estabilidad de la emulsión seleccionada

Para estudiar la estabilidad de las emulsiones se empleó la emulsión E9 y se llevó a cabo a través del estudio a largo y corto plazo, evaluándose la influencia de la concentración de quitosana. En el estudio a largo plazo la emulsión se almacenó a temperatura ambiente ( $30 \pm 2$  °C) y refrigeración ( $5 \pm 2$  °C), durante 45 días. Para el estudio a corto plazo se expuso a estrés térmico consistente en almacenamientos consecutivos durante 48 horas a cada una de las siguientes temperaturas:  $40 \pm 2$  °C,  $5 \pm 2$  °C y  $40 \pm 2$  °C.<sup>(22)</sup> Además, se sometieron a desestabilización por centrifugación durante 7 horas, tiempo equivalente a 45 días de estudio de estabilidad.<sup>(21)</sup> Se evaluó la apariencia visible, el volumen de fase acuosa separada, el pH, la conductividad, viscosidad, el comportamiento reológico y la turbidez.<sup>(23,24,25,26)</sup>

La viscosidad aparente y el comportamiento reológico se determinaron con el equipamiento descrito en la evaluación de las emulsiones. El intervalo de gradiente de velocidad fue entre 0 y  $100 \text{ s}^{-1}$  y se emplearon 9 mL de la emulsión como porción de ensayo. Para el análisis de la turbidez las emulsiones fueron homogeneizadas, a continuación, se tomaron 5 mL disolviéndolos en agua destilada y se llevaron a un volumen de 25 mL con igual disolvente. El porcentaje de transmitancia (% T) fue medido a 600 nm,<sup>(23)</sup> previamente determinada al agua destilada como blanco, de acuerdo con los estudios de *Ferreira* y otros.<sup>(25)</sup> Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro (Rayleighmod. UV-1601, China). Se consideró al 100 % la transmisión del blanco, la turbidez de la emulsión diluida fue calculada con la siguiente ecuación y el análisis se realizó por triplicado.

$$\text{Turbidez} = 100 - \%T \quad (1)$$

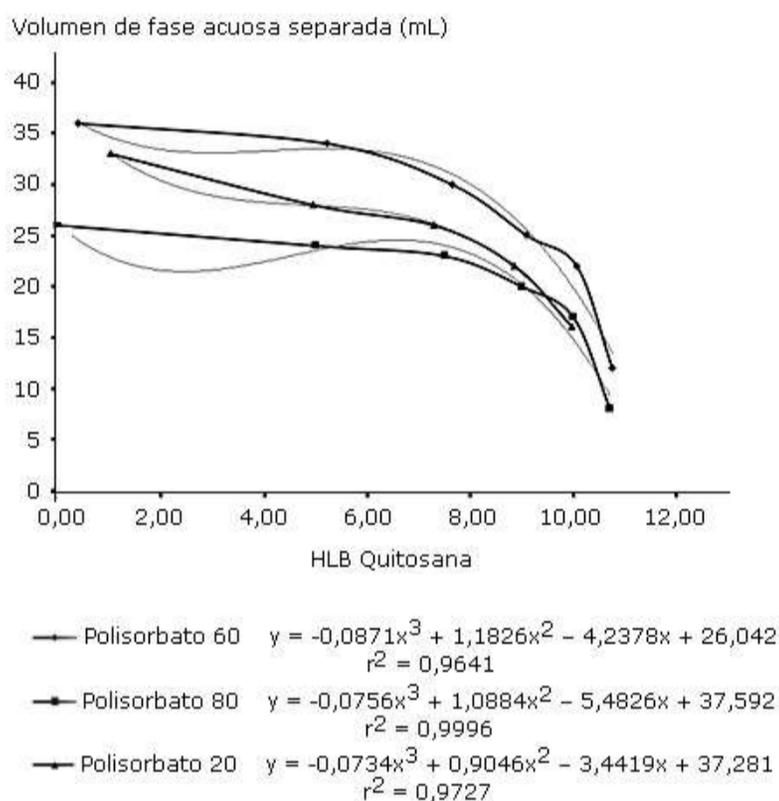
## Resultados

Las emulsiones elaboradas permanecieron estables sin cambios visuales durante 24 horas, independientemente de la mezcla de tensoactivo empleada, ya que todas tenían un aspecto lechoso. Transcurridas 48 horas de su elaboración, en las emulsiones de los ensayos E1 a E8 se detectó modificación visual relacionada con la separación de las fases, siendo mayor en aquella que contenía polisorbato 20. Para el resto de los ensayos (E9, E10 y E11) no se apreciaron inestabilidades por lo que se seleccionaron para el cálculo del valor del HLB. Este comportamiento físico se mantuvo durante el tiempo de estudio para los tres polisorbatos. Para

la mezcla quitosana-polisorbato 80 se obtuvieron los menores volúmenes de fase acuosa separada, mientras que con el polisorbato 20 fueron mayores.

A partir del análisis y cálculo realizado se obtuvieron valores de HLB para la quitosana entre 11 y 12, demostrándose que independientemente del tensoactivo no iónico empleado hubo poca influencia sobre el valor del HLB estimado.

La figura 1 muestra la correlación entre el volumen de fase acuosa separada y el HLB de la quitosana según el polisorbato empleado, ajustándose al modelo del tercer polinomio. La ecuación se derivó para cada polisorbato, calculándose el HLB para el cual el volumen de la fase acuosa separada era mínimo, corroborándose los valores obtenidos.



**Fig. 1** - Correlación entre el volumen de fase acuosa separada y el HLB de la quitosana para cada polisorbato.

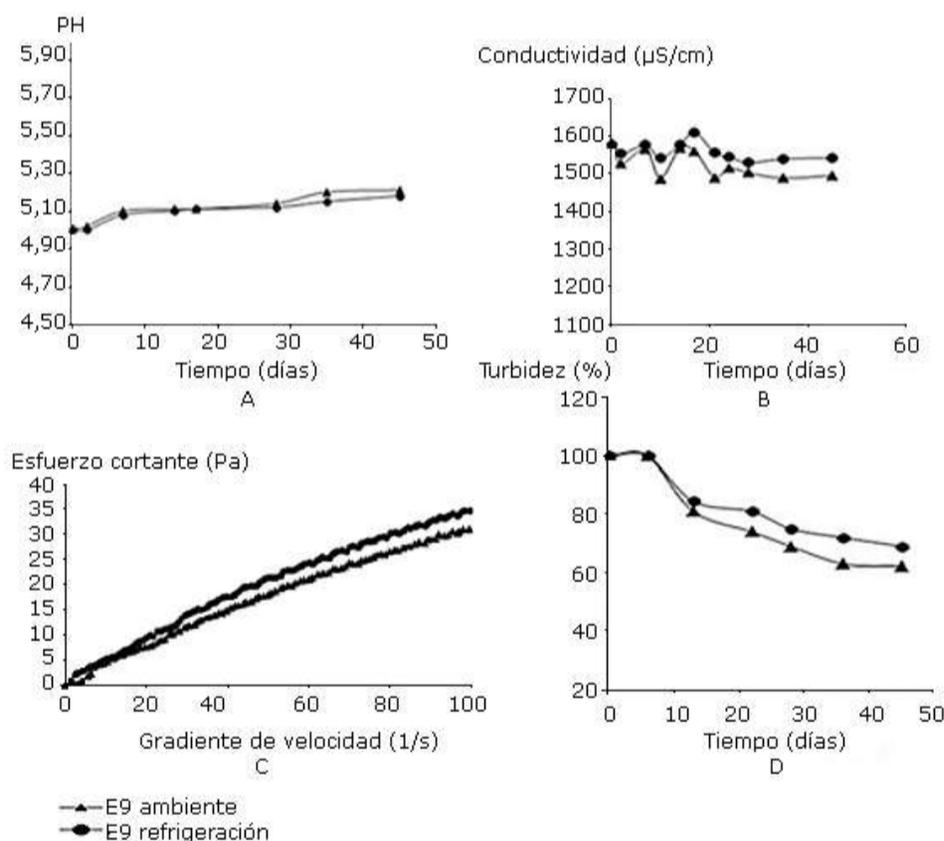
La tabla 2 muestra los valores de las densidades de las fases acuosas, oleosa y disolución de ácido acético al 1 % de las emulsiones E8, E9 y E10. Mientras que la tensión interfacial para E8 fue de 1,69 mN/m, 1,46 mN/m para E9 y 1,11 mN/m para E10, y la del blanco (disolución de ácido acético 1 % - petrolato líquido pesado) de 5,32 mN/m, resultando una disminución notable de dicho valor al emplearse la mezcla emulgente (quitosana y polisorbato 80).

Las emulsiones evaluadas durante el estudio de desestabilización por centrifugación (2 horas) mostraron un comportamiento similar al observado a los 14 días. En cuanto al volumen de fase acuosa separada, en la emulsión E8 fue de 2 mL, en E9 y E10 no se observaron separaciones, lo que demuestra que la estabilidad de las emulsiones aumentó con el incremento de la concentración de quitosana. A partir de estos resultados se decidió continuar los estudios de estabilidad, durante 45 días, con la emulsión E9.

**Tabla 2** - Densidad y viscosidad de las fases de la emulsión

Fase de la emulsión	Densidad (g/mL)	Viscosidad (Pa.s)
Acuosa E8	1,037 ± 0,04	0,166 ± 0,00
Acuosa E9	1,017 ± 0,01	0,342 ± 0,01
Acuosa E10	0,997 ± 0,04	0,367 ± 0,01
Oleosa	0,864 ± 0,01	-
Disolución de ácido acético 1 %	1,000 ± 0,00	-

En la figura 2A se puede observar el comportamiento del pH después de 45 días de elaborada la emulsión, el que muestra una tendencia a su mantenimiento, independiente de las condiciones de almacenamiento, además, sus valores se alejan del valor del pKa de la quitosana. Este resultado se corresponde con la evaluación macroscópica.



**Fig. 2** - Efecto del pH (A), la conductividad (B), la fluidez (C) y la turbidez (D) en la estabilidad de la emulsión E9 almacenada a temperatura ambiente y refrigeración, durante 45 días.

Los valores de conductividad para la emulsión almacenada a temperatura ambiente y refrigeración son ilustrados en la figura 2B. Se aprecian valores altos de conductividad, lo que es característico de las emulsiones directas (aceite/agua). En condiciones de refrigeración la variación de los resultados del pH y la conductividad es menor respecto a los obtenidos a temperatura ambiente, esto se debe a que a temperaturas más bajas se favorece la estabilidad de la emulsión.

De acuerdo a lo observado en las curvas fluidimétricas (Fig. 2C), reológicamente el sistema se ajustó a un flujo newtoniano. La viscosidad de las disoluciones de quitosana aumenta con el incremento de la concentración del biopolímero, una disminución de la temperatura trae consigo un descenso del valor de este parámetro físico.

La viscosidad de la emulsión E9 (Tabla 3) no presentó variaciones en el tiempo de estudio, lo que evitó la unión de las gotas de aceite, favoreciendo la estabilidad de la emulsión al reducir la velocidad de difusión y movimiento browniano de las gotículas.

**Tabla 3** - Viscosidad aparente(Pa.s) de la emulsión E9 en las condiciones de almacenamiento

Emulsión	3 días	Temperatura	5 días	45 días
E9	0,345 ± 0,01	Ambiente	0,341 ± 0,03	0,331 ± 0,00
		Refrigeración	0,342 ± 0,01	0,343 ± 0,01

En la figura 2D, se observa que la emulsión de mayor estabilidad es la que presentó mayor turbidez, lo que corresponde a la almacenada a temperatura de refrigeración.

## Discusión

En los tensoactivos el comportamiento superficial depende del tamaño de la molécula, para bajas concentraciones el polisorbato 80 presenta una mayor actividad superficial que el 20, por lo que el primero podría producir un mayor recubrimiento superficial. El polisorbato 80 le confiere a la gotícula de aceite un diferencial de carga negativo, debido a los grupos electronegativos que presenta en su estructura (-O-, -OH-). Esto explica que al combinarlo con la quitosana puede ocurrir una atracción electrostática, adsorbiéndose sobre las gotículas de la fase oleosa formando una barrera electrostática más gruesa, lo que previene la coalescencia de los glóbulos que constituyen la fase dispersa y favorece la estabilidad de la emulsión. A medida que aumenta la concentración de quitosana, la emulsión es más estable, disminuyendo la separación de las fases. La quitosana es un polisacárido catiónico que posee zonas hidrofílicas ricas en glucosamina e hidrofóbicas ricas en N-acetil glucosamina y, en dependencia de su grado de desacetilación será capaz de estabilizar emulsiones, por lo que cuando este sea alto (> 70 %) estabilizará emulsiones del tipo aceite en agua, por el contrario, cuando el valor sea menor favorecerá la formación de emulsiones tipo agua en aceite. Debido al método mecánico de agitación de alto cizallamiento empleado para la preparación de las emulsiones se pudieron haber formado gotículas de aceite de pequeño tamaño provocando un aumento de la viscosidad, existiendo una mayor área superficial de las gotículas con un incremento de la interacción entre ellas, lo que unido al incremento de la viscosidad que aportó la quitosana, en relación directa con su concentración, favoreció la estabilización de la emulsión.

A partir del análisis y cálculo realizado se obtuvieron valores de HLB para la quitosana entre 11 y 12, demostrándose que independientemente del tensoactivo no iónico empleado hubo poca influencia sobre el valor del HLB estimado. La figura 1 muestra la correlación entre el volumen de fase acuosa separada y el HLB de la quitosana según el polisorbato utilizado, ajustándose al modelo del tercer polinomio. La ecuación se derivó para cada polisorbato, calculándose el HLB para el cual el volumen de la fase acuosa separada era mínimo, corroborándose los valores obtenidos. Los que fueron similares a los reportados para la goma arábiga, polímero de similar estructura y propiedades emulgentes (HLB = 8 -12).<sup>(26)</sup>

La goma arábiga es un emulsionante genuino, cuyas características estructurales y propiedades funcionales son similares a la quitosana. Este polímero es una mezcla compleja y variable de oligosacáridos, arabinogalactánidos, polisacáridos y un pequeño porcentaje de glicoproteínas. Los polisacáridos de dicha mezcla son de baja masa molecular. La presencia en su estructura de carbohidratos hidrofílicos y proteínas hidrofóbicas le confieren propiedades emulsionantes y estabilizantes.

Su carácter emulsionante viene dado por la flexibilidad estructural que le permite la interacción superficial con las gotas de grasa (en general, la fase dispersa).<sup>(3)</sup> Su funcionalidad no solo está dada por la modificación de las propiedades reológicas de la fase acuosa, sino, también, por conducir a la formación de una capa macromolecular estabilizante alrededor de las gotas de aceite. Produce emulsiones estables con la mayoría de los aceites en un amplio rango de pH y en presencia de electrolitos, sin la necesidad de un agente estabilizante secundario.

Para que un polímero sea efectivo como emulsionante debe poseer actividad interfacial, es decir, debe ser capaz de disminuir la tensión en la interfase aceite-agua. Mientras menor es la tensión interfacial, mayor es la extensión sobre la que las gotas pueden ser dispersadas durante una agitación intensa o un flujo turbulento.

Al aumentar la concentración de quitosana en la fase acuosa disminuyó la tensión en la interfase aceite agua, esto demuestra la capacidad del biopolímero de adsorberse sobre las gotículas de la fase oleosa para formar capas estabilizantes alrededor de las gotas de la fase oleosa durante el tiempo de estudio. A medida que aumenta la concentración de quitosana en la fase acuosa, el valor de viscosidad es mayor, lo que está en correspondencia con lo reportado por trabajos anteriores.<sup>(5,7)</sup>

Los hidrocoloides y polímeros acuosos al añadirse a las fases acuosas o continuas y ser disueltos en ellas incrementan su viscosidad, favoreciendo así la estabilidad de la emulsión, debido a que ocurre una disminución en la movilidad de las gotas del sistema. De ahí que la quitosana permita la estabilización de la interfase aceite agua ayudando a la estabilidad de la emulsión al aumentar la viscosidad.

En las diferentes condiciones térmicas no se observó inestabilidad física en la emulsión seleccionada. Esta estabilidad de la emulsión depende de la carga electrostática del emulgente, del pH del medio y de la fuerza iónica en la fase acuosa. La quitosana es un biopolímero catiónico que posee grupos aminos en su estructura y debido a este grupo es que se ve afectada por el pH. Lo que quiere decir, que a medida que el pH de la emulsión se aproxime al pKa de

la quitosana ( $\approx$  6-7) el sistema será más inestable porque la carga positiva de la quitosana desaparece, reduciéndose la repulsión entre las gotas. El mantenimiento de esta carga positiva permite la atracción electrostática con el polisorbato 80.

La emulsión E9 mostró adecuada estabilidad físico y química en el tiempo, en las condiciones de estudio ensayadas, aunque, es mayor en la almacenada a temperatura de refrigeración. Se demostró que la estabilidad de la emulsión depende de la concentración de quitosana en la mezcla emulgente, permitiendo obtener una emulsión aceite en agua estabilizada por la repulsión electrostática entre las gotículas de aceite y la viscosidad de la fase externa. La estabilización electrostática y la viscosidad que aporta al sistema, por el incremento de la concentración de la quitosana, permitieron lograr emulsiones estables con elevados valores de turbidez. Se plantea, que la agregación de las gotículas dispersas provoca un aumento en el porcentaje de transmitancia de la muestra y con ello la disminución de la turbidez.<sup>(25)</sup>

Se puede concluir que, el valor de HLB determinado por el método de Griffin para la quitosana, derivada de quitina de langosta, está comprendido entre 11 y 12. Las emulsiones elaboradas con quitosana y polisorbato 80, como mezcla emulgente, muestran mayor estabilidad con el incremento de la concentración del biopolímero, como resultado del aumento de la viscosidad de la fase continua y la disminución de la tensión interfasal entre la fase acuosa y oleosa. La emulsión seleccionada muestra una adecuada estabilidad físico y química bajo las condiciones de almacenamiento estudiadas.

### Referencias bibliográficas

1. Kim YD, Morr CV, Schenz TW. Microencapsulation properties of Gum Arabic and Several Food Proteins: Liquids Orange Oil Emulsion Particles. *J Agric Food Chem.* 1996;44:1308-13.
2. Dickinson E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids.* 2003;17(1):25-39.
3. Aranberri BP, Binks JH, Clint PDI Fletcher. Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensioactivos. *Revista Iberoamericana de Polímeros.* 2006;7(3):211-31.
4. Singla AK, Chawla M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects-an update. *J PharmPharmacol.* 2001;53:1047-67.
5. Schulz P, Rodriguez M, Del Blanco L, Pistonesi M, Agullo E. Emulsification properties of chitosan. *Colloid and Polymer Science.* 1998;276(12):1159-65.
6. Del Blanco LF, Rodríguez MS, Schulz PC, Agulló E. Influence of the deacetylation degree on chitosan emulsification properties. *ColloidPolymSci.* 1999;277(11):1087-92.
7. Rodríguez MS, Albertengo LA, Agulló E. Emulsification capacity of chitosan. *CarbohydrPolym.* 2002;48:271-76.
8. Mallawarachchi DR, Amarasinghe ADUS, Prashantha MAB. Suitability of chitosan as an emulsifier for cationic bitumen emulsion. *Construction and Building Materials.* 2016;102(1):1-6.

9. Jumaa M, Furker FH, Müller BW. A new lipid emulsion formulation with high antimicrobial efficacy using chitosan. *Eur J Pharm Biopharm.* 2002;53:115-23.
10. Babiker EE. Effect of chitosan conjugation on the functional properties and bactericidal activity of gluten peptides. *Food Chemistry.* 2002;79:367-72.
11. Song MG, Cho SH, Kim JY, Kim JD. Novel evaluation for the water in oil (w/o) emulsion stability by turbidity ratio measurements. *Korean J ChemEng.* 2002;19:425-30.
12. Usui M, Tamura H, Nakamura K, Ogawa T, Muroshita M, Azakami H, Kanuma S, Kato A. Enhanced bactericidal action and masking of allergen structure of soy protein by attachment of chitosan through Maillard-type protein-polysaccharide conjugation. *Nahrung.* 2004;48(1):69-72.
13. Ogawa S, Decker EA, Mc Clements DJ. Influence of environmental conditions on the stability of oil in water emulsions containing droplets stabilized by lecithin-chitosan membranes. *J Agric Food Chem.* 2003;51(18):5522-27.
14. Ogawa S, Decker EA, McClements DJ. Production and characterization of o/w emulsions containing droplets stabilized by lecithin-chitosan-pectin multilayered membranes. *J Agric Food Chem.* 2004;52(11):3595-3600.
15. Aoki T, Decker EA, McClements DJ. Influence of environmental stresses on stability of o/w emulsions containing droplets stabilized by multilayered membranes produced by a layer-by-layer electrostatic deposition technique. *Food Hydrocolloids.* 2005;19:209-20.
16. Klinkesorn U. The Role of Chitosan in Emulsion Formation and Stabilization. *Food Reviews International.* 2013;29(4):371-93.
17. Payet L, Terentjev EM. Emulsification and stabilization mechanisms of o/w emulsions in the presence of chitosan. *Langmuir.* 2008;24(21):12247-52.
18. de la Paz N, Fernández M, López OD, Nogueira A, García CM, Pérez D, Tobella JL, Montes de Oca Y, Díaz D. Optimización del proceso de obtención de quitosano derivada de la quitina de langosta. *Rev Iberoam Polim.* 2012;13(3):103-116.
19. Griffin WC. Classification of surface-active agents by "HLB". *J SCC* 1949;1:311-26.
20. Laplante S, Turgeon SL, Paquin P. Effect of pH, ionic strength, and composition on emulsion stabilizing properties of chitosan in a model system containing whey protein isolate. *Food Hydrocolloids.* 2005;19:721-29.
21. Fernández AA. Preparación, caracterización y estabilidad de emulsiones y microemulsiones O/W [tesis de doctorado en Ingeniería Química]. [España]: Universidad de Granada; 2006.
22. Pasquali RC, Bregnei C. Emulsiones líquidas cristalinas estabilizadas con estearato de trietanolamina y ácido esteárico: Influencia del método de preparación en las propiedades y en la formación de gotas secundarias. *Ars Pharm.* 2006;47(2):219-37.
23. Orafidiya LO, Oladimeji F. Determination of the required HLB values of some essential oils. *International Journal of Pharmaceutics.* 2002;237(1-2):241-49.
24. Tadros T. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science.* 2004;108:227-58.

25. Ferreira MR, Santiago RR, de Souza TP, Egito ES, Oliveira EE, Soares LA. Development and evaluation of emulsions from Carapa guianensis (Andiroba) oil. *Aaps Pharmscitech*. 2010;11(3):1383-90.
26. Mun S, Decker EA, Mc Clements DJ. Influence of droplet characteristics on the formation of oil-in-water emulsions stabilized by surfactant–chitosan layers. *Langmuir* 2005;21(14):6228-34.

#### **Conflicto de intereses**

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

#### **Contribuciones de los autores**

*Mirna Fernández Cervera*: contribución a la idea original y al marco conceptual. Diseño del estudio. Búsqueda bibliográfica. Análisis de datos. Preparación del manuscrito. Revisión del manuscrito.

*Nilia de la Paz Martín-Viaña*: diseño del estudio. Búsqueda bibliográfica. Estudios experimentales. Análisis de datos. Análisis estadístico. Preparación del manuscrito

*Dania Pérez Ricardo*: Búsqueda bibliográfica. Estudios experimentales. Análisis de datos. Análisis estadístico. Preparación del manuscrito.

*Yaima La Rosa Kessell*: diseño del estudio. Búsqueda bibliográfica. Estudios experimentales. Análisis de datos Análisis estadístico.

*Antonio Nogueira Mendoza*: estudios experimentales. Análisis de datos.

*Oscar García Pulpeiro*: contribución a la idea original y al marco conceptual. Diseño del estudio. Análisis de datos.

#### **Financiación**

Institución que auspicia el trabajo: Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Código de Proyecto de Investigación 0808025.