

CAPITULO 3

MARCO METODOLOGICO

La investigación científica es un proceso metódico y sistemático dirigido a la solución de problemas o preguntas científicas, mediante la producción de nuevos conocimientos, los cuales constituyen la solución a tales interrogantes. Se utilizan un conjunto de procesos, técnicas e instrumentos para medir las variables que intervienen en la investigación al mismo tiempo. Para ello se debe delimitar el tipo y diseño de investigación.

3.1 Tipo de Investigación

La investigación corresponde a un estudio de tercer nivel, que se conoce como investigación Explicativa. Se encarga de buscar el porqué de los hechos mediante el establecimiento de relaciones causa-efecto. En este sentido, los estudios investigativos pueden ocuparse tanto de la determinación de las causas (investigación post-facto), como los efectos (investigación experimental). (Arias, Fidias; 2004)

3.2 Diseño de Investigación

Este tipo de investigación tiene un diseño experimental, consiste en la manipulación de una o más variables independientes (supuesta causa) para conocer la reacción que tiene en la variable (efecto provocado por la causa sobre la muestra)

En otra forma se explica de esta manera; la investigación experimental estudia la relación de causa y efecto entre la variable dependiente y la independiente. (Morales, Gabriela; 1999)

3.3 Metodología de extracción del principio activo

3.3.1 Destilación por Arrastre de Vapor

La destilación por arrastre con vapor es una técnica usada para separar sustancias orgánicas insolubles en agua y ligeramente volátiles, de otras no volátiles. Cuando se tienen mezclas de líquidos que no son miscibles entre sí, se tiene un tipo de destilación que sigue la ley de Dalton sobre las presiones parciales. Como resultado de este comportamiento, y



cuando uno de los componentes es agua, al trabajar a presión atmosférica, se puede separar un componente de mayor punto de ebullición que el del agua a una temperatura menor a 100° (96°C en La Hechicera, Mérida- Venezuela). [30]

Debido a lo anterior, con esta técnica se pueden separar sustancias inmiscibles en agua y que se descomponen a su temperatura de ebullición o cerca de ella, por lo que se emplea con frecuencia para separar aceites esenciales naturales que se encuentran en hojas, cáscaras o semillas de algunas plantas (té limón. menta, canela, cáscaras de naranja o limón, anís, pimienta, etc.). En este caso, se realizó esta destilación con clavo de olor para la extracción del Eugenol. [31]

Material y Equipo utilizado

1 Matraz Erlenmeyer

1 Refrigerante

2 Mecheros bunsen

3 Tapones de hule

2 Mangueras de hule

2 Balones

1 Termómetro

3 Pinzas de tres dedos

1 Tubo de vidrio doblado

1 Anillo de hierro

2 Telas de asbesto

Soporte universal.

Procedimiento Experimental

Se prepara el equipo de destilación. En el balón generador de vapor, se coloca agua destilada. En el balón de destilación, se coloca agua destilada con los clavos de olor bien triturados (no molido) para mejor rendimiento.

Se calienta con llama fuerte el balón generador de vapor y cuando comienza a entrar vapor al balón de destilación, se calienta el mismo pero con una llama suave.

Al comenzar a ebullición se controla el calentamiento para que la velocidad de destilado sea de unas 5 gotas por segundo, midiendo la temperatura cada 5 ml de destilado.

Se colecta el destilado y se deja reposar de 2-3 días para que pueda separarse las fases.

Luego se añade 3 gramos de NaCl por cada 5ml de aceite esencial recuperada.



Fig. 8. Destilación por arrastre de vapor

Muestra de Cálculo por Arrastre de Vapor:

Datos:

Masa (clavos de olor):	40g
Temperatura de la mezcla	95C

Presión atmosférica en el lab	640 mmHg
δ Eugenol	1,06 g/ml
δ H ₂ O	1 g/ml

P*H₂O: 633, 90 mmHg

Presión de vapor del Eugenol:

$$P = P_{H_2O}^* + P_{Eugenol}^*$$

$$P_{Eugenol}^* = P - P_{H_2O}^* = (640 - 633,90)mmHg = 6.1 mmHg$$

$$\left(\frac{Masa\ Eugenol}{Masa\ H_2O}\right)_{teórico} = \frac{P_{Eugenol}^* \cdot PM_{Eugenol}}{P_{H_2O}^* \cdot PM_{H_2O}} = \frac{6,1mmHg \cdot 164\frac{g}{mol}}{633,90mmHg \cdot 18\frac{g}{mol}} = \frac{0,088\ g\ Eugenol}{g\ H_2O}$$

$$\left(\frac{Masa\ Eugenol}{Masa\ H_2O}\right)_{experimental} = \frac{P_{Eugenol}^* \cdot V_{Eugenol}}{P_{H_2O}^* \cdot V_{H_2O}} = \frac{1,06\frac{g}{ml} \cdot 3ml}{1\frac{g}{ml} \cdot 97ml} = \frac{0,033\ g\ Eugenol}{g\ H_2O}$$

Relación g Eugenol/g H₂O:

	Relación g Eugenol/g H ₂ O
Teórico	0,088
Experimental	0,033

$$\% Rendimiento = \frac{Experimental}{Teórico} \cdot 100 = \frac{0,033\ g\ Eugenol / g\ H_2O}{0,088\ g\ Eugenol / g\ H_2O} \cdot 100 = 37,5\%$$

3.3.2 Hidrodestilación

La hidrodestilación, es un proceso para obtener aceite esencial de alguna materia prima vegetal mediante el uso de vapor saturado a presión atmosférica. La materia prima vegetal es cargada en un hidrodestilador, de manera que forme un lecho compactado. Su estado puede ser molido, cortado, entero o la combinación de éstos. El vapor de agua es inyectado con la presión suficiente para vencer la resistencia hidráulica del lecho. El vapor entra en contacto con el lecho, para calentar la materia prima y liberar el aceite esencial contenido, a su vez, se evapora, debido a su volatilidad. La mezcla, el vapor saturado y aceite esencial, fluye hacia un condensador o refrigerante y enfriada, hasta temperatura ambiente. A la salida del condensador o refrigerante, se obtiene un extracto líquido, el cual posteriormente se le da el tratamiento requerido. Este es uno de los procesos de extracción más común para la obtención de aceites esenciales. [32]

Material y equipo utilizado:

Balón de destilación.

Condensador o Refrigerante.

Manta de calentamiento.

Manguera de hule.

Soporte universal.

Pinzas tres dedos.

Trampa Clevenger.

Matraz Erlenmeyer.

Válvulas tres vías.

Procedimiento experimental:

Se prepara el equipo de hidrodestilación. En el balón de destilación, se coloca agua destilada con los clavos de olor bien triturados (no molido) para mejorar el rendimiento.

Se calienta la muestra en la manta de calentamiento para que de esta manera tenga una transferencia de calor uniforme.

Se la ayuda de la válvula de tres vías se deja en recirculación el flujo de agua y de esta manera tener mayor rendimiento.

Se extrae la mezcla aceite esencial, agua y se deja reposar de 2-3 días para que pueda separarse las fases. Luego se añade 3 gr de NaCl por cada 5ml de aceite esencial recuperada. [31]

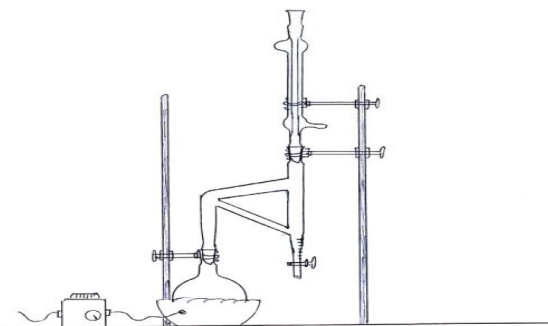


Fig. 9 Hidrodestilación

Datos experimentales:

Presión del laboratorio	640 mmHg
Temperatura de ebullición de la mezcla	95 °C
Temperatura reóstato	77 °C
Masa de clavos de olor	340 grs
Densidad del Eugenol	1,07 grs/cm ³
Peso molecular de Eugenol	164,20grs/mol

Muestra de cálculo:

$$P_{total}: P^V_{eugenol} + P^V_{agua}$$

$$P^V_{eugenol}: P_{total} - P^V_{agua}$$

$$P^V \text{ eugenol: } (640 - 633.9) \text{ mmHg}$$

$$P^V \text{ eugenol: } 6.1 \text{ mmHg}$$

$$\left(\frac{\text{masa de eugenol}}{\text{masa de agua}} \right)_{\text{teorica}}: \frac{P^V \text{ eug} \times P_{\text{Meug}}}{P^V \text{ agua} \times P_{\text{Magua}}}$$

$$\left(\frac{\text{masa de eugenol}}{\text{masa de agua}} \right)_{\text{teorica}}: \frac{6.10 \text{ mmHg} \times 164,20 \text{ grs/mol}}{633.9 \text{ mmHg} \times 18 \text{ grs/mol}}$$

$$\left(\frac{\text{masa de eugenol}}{\text{masa de agua}} \right)_{\text{teorica}}: 0.0878 \frac{\text{grs eugenol}}{\text{grs de agua}}$$

$$\left(\frac{\text{masa de eugenol}}{\text{masa de agua}} \right)_{\text{experimental}}: \frac{p_{\text{eug}} \times V_{\text{eug}}}{p_{\text{agua}} \times V_{\text{agua}}}$$

$$\left(\frac{\text{masa de eugenol}}{\text{masa de agua}} \right)_{\text{experimental}}: \frac{1.06 \text{ grs/ml} \times 2,3 \text{ ml}}{1 \frac{\text{grs}}{\text{ml}} \times 297,7 \text{ ml}}$$

$$\left(\frac{\text{masa de eugenol}}{\text{masa de agua}} \right)_{\text{experimental}}: 0.00819 \frac{\text{grs eugenol}}{\text{grs de agua}}$$

$$\% \text{ rendimiento: } \frac{\text{masa}^{\text{experimental}}}{\text{masa}^{\text{teorica}}} \times 100$$

$$\% \text{ rendimiento: } \frac{0.00819 \frac{\text{grs de eugenol}}{\text{grs de agua}}}{0.0878 \frac{\text{grs de eugenol}}{\text{grs de agua}}} \times 100$$

$$\% \text{ rendimiento: } 9,33\%$$



3.3.3 Extracción Soxhlet

La extracción Soxhlet, es una extracción de tipo sólido-líquido que se emplea con mucha frecuencia para extraer un producto natural a partir de su fuente natural. Para ello, se emplea un solvente que disuelva selectivamente el compuesto deseado, pero que deje los sólidos insolubles indeseados en la fuente natural. [12]

Para la extracción del aceite esencial eugenol contenido en clavos de olor, se montará un sistema continuo Soxhlet empleando como disolvente etanol.

Materiales Y Equipos

Cámara central Soxhlet de 250 ml.

Balanza analítica

Manta de calefacción para balón de fondo redondo de 1000 ml

Dedal de extracción

Condensador de bolas

7 Perlas de ebullición

2 Mangueras de hule para aguas de condensador

Vaso de precipitado de vidrio de 250 ml

Soporte universal

3 Pinzas con aislamiento

Termocupla

Reóstato

Papel de filtro

REACTIVOS

Etanol naturalizado 96% de pureza. Marca Riedel-de Haen



25 gramos de clavos de olor

Procedimiento

Pesar 25 gramos de clavos de olor, colocarlos en un papel de filtro con la misma geometría del dedal, para evitar obstrucción de poros del dedal.

Insertar dentro del dedal la muestra de clavos con el papel de filtro y finalmente colocarlo dentro del aparato Soxhlet

Llenar el balón con 600 ml de etanol y colocar las perlas de ebullición.

Conectar el tubo refrigerante en la parte superior del Soxhlet con sus respectivas mangueras.

Insertar verticalmente el cable de la Termocupla desde la salida del refrigerante, internamente, hasta el fondo del balón.

Permitir que el sistema continúo realice 10 ciclos hasta que el etanol en el sifón se observe traslúcido.

Dejar enfriar y colocar la solución obtenida en un envase para, posteriormente realizar la destilación al vacío.

Datos experimentales

Temperatura inicial del reóstato:	75 °C
Temperatura en Termocupla	76,6 °C
Temperatura en primer ciclo	78 °C
Tiempo promedio entre cada ciclo	30 minutos
Numero de ciclos:	10 ciclos

Muestra de cálculo

$$\%EXTRACTO = \frac{PESO\ ACEITE\ EXTRAIDO}{PESO\ DE\ MUESTRA\ DE\ CLAVOS} \times 100$$

$$\%EXTRACTO = \frac{8,8117\text{ g}}{25\text{ g}} \times 100$$

$$\%EXTRACTO = 36,2468\%$$

3.3.4 Destilación al vacío

Debido a que muchas sustancias, que se desean separar por destilación, no pueden calentarse ni siquiera a temperaturas próximas a sus puntos normales de ebullición (a una atmósfera de presión), porque se descompondrían químicamente, o bien, otras sustancias con puntos de ebullición muy elevados demandarían gran cantidad de energía para su destilación a la presión ordinaria, se emplea el método de destilación al vacío o a presión reducida. El cual consiste en reducir la presión de operación para obtener la ebullición a temperaturas bajas, ya que un líquido empieza a hervir cuando su presión de vapor iguala la presión de operación. [33]

3.3.4.1 Sistema de destilación al vacío

Este sistema se utilizó para recupera el Etanol de la primera destilación Soxhlet, en la cual se utilizó como materia prima los clavitos que ya habían sido usados en la práctica de arrastre por vapor del laboratorio de química orgánica.

Materiales y Equipos

Balón para evaporación de 1000ml (Kimix)

Balón para recolección de 500ml (Kimix)

Columna de destilación fraccionada (Klax)

Refrigerante y mangueras



Termómetro de 260 °C

Baño de calentamiento (Memmer)

Bomba de vacío (General Electric, 1/3 hp)

Manguera para vacío

Soportes, nueces y pinzas

Procedimiento

Se prepara el equipo de destilación, pero en este caso la diferencia es que entre el refrigerante y el balón recolector se colocara una boquilla a la cual se conectara la bomba de vacío para bajar la presión del sistema.

En el balón de destilación se coloca el destilado obtenido en el soxhlet y se calienta por medio del baño de calentamiento.

Se recupera el etanol en el balón recolector y el remanente en el balón de destilación se desecha.

Datos Experimentales

Temperatura del vapor	22 °C
Temperatura de la mezcla	36 °C
Volumen de destilado usado	500ml
Etanol recuperado	300ml

3.3.4.2 Destilación con rotavapor

Este sistema se utilizó para separar el Etanol y el Eugenol de la segunda destilación Soxhlet, en la cual se usó como materia prima clavitos nuevos.

Materiales y Equipos

Balón para evaporación de 1000ml (Kimix)

Balón para recolección de 1000ml (Kimix)

Baño de calentamiento (Memmer)

Rotavapor (Büchi, velocidad: 3rpm)

Bomba de Vacío (General Electric, ¼ hp)

Manguera para vacío

Procedimiento

Se coloca el destilado obtenido en la destilación Soxhlet en el balón de evaporación.

Se conecta la bomba de vacío para disminuir la presión al sistema rota vapor.

Se posiciona el balón de evaporación dentro del baño de calentamiento.

Se conectan los balones al sistema rotavapor (el balón de evaporación y el balón recolector)

En el balón recolector se obtendrá el etanol y el remanente en el balón de evaporación será el eugenol.

Datos Experimentales

Temperatura del agua del baño de maría = 60 °C

Etanol inicial = 720ml

Etanol recuperado = 363ml

Rendimiento = 50.4166%

Eugenol obtenido = 25,7185g

3.3.5 Cromatografía

La cromatografía es un método analítico para separar, purificar e identificar sustancias orgánicas e inorgánicas cuyas propiedades físicas y químicas no difieren entre sí. Se basa en los principios generales de la distribución entre fases, ya que el método implica la separación selectiva de una fase que fluye sobre una fase inmóvil. La fase que fluye se denomina fase móvil, que puede ser líquida o gaseosa y la fase inmóvil que se conoce como fase estacionaria puede ser líquida o sólida.

En la cromatografía de capa fina, las sustancias se separan por acción de la adsorción que implica la distribución de un soluto entre dos fases inmiscibles de acuerdo a una mayor o menor adsorción del soluto en la superficie de la fase sólida.

Materiales y Equipos

Placas de sílica gel

Capilares

Estufa

Envases de vidrio

Papel aluminio

Reactivos

Hexano Recuperado (Laboratorio de Alimentos, ULA)

Acetato de etilo (Lab de Bioquímica)

Diclorometano (Riedel de-Haen)

Iodo Resublimado (Laboratorio de Alimentos, ULA)

Procedimiento

Se calientan las placas de sílica gel en la estufa por 3 horas para activarlas

Se mide la placa, y se le traza una recta que será el frente del solvente.

Se prepara la mezcla de solvente para la cromatografía, con la proporción de 6:4 de hexano y acetato de etilo y otra mezcla con 3:2 hexano y Diclorometano.

Luego de que las placas estén activadas se siembra el patrón (Con su R_f conocido para la mezcla de solvente) y al lado la muestra, esto se repite hasta que no queden muestras.

Las placas con las muestra y el patrón se introducen en un envase de vidrio que contiene el solvente, se deja ahí hasta que el solvente suba por la placa por acción de la capilaridad sin que pase el frente.

Se extrae del envase de vidrio y se deja secar.

Luego se introduce a otro envase de vidrio que contenga iodo y se deja hasta que se revele. Ver Figura 10.

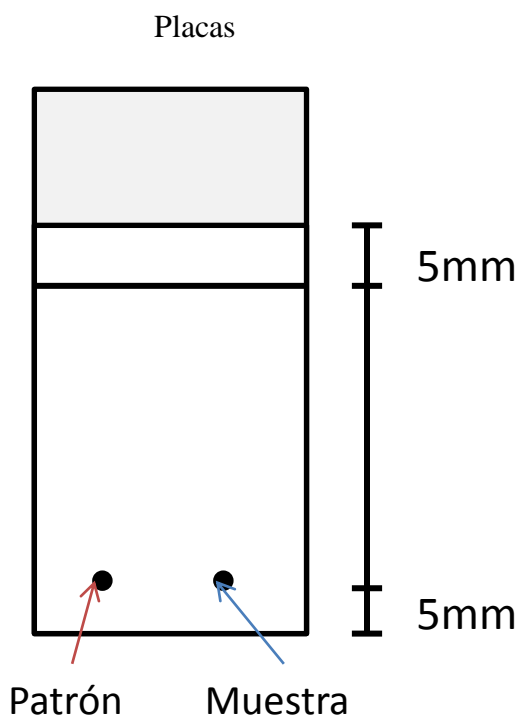
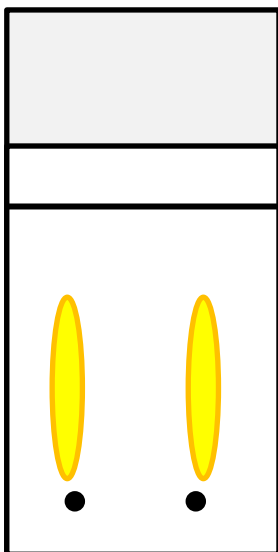


Fig. 10 Descripción de placa de cromatografía de capa fina.

Solvente: 6:4 hexano y acetato de etilo

R_f estimado del patrón: 0,85 [34]



Arrastre con vapor

Recorrido Total: 5cm

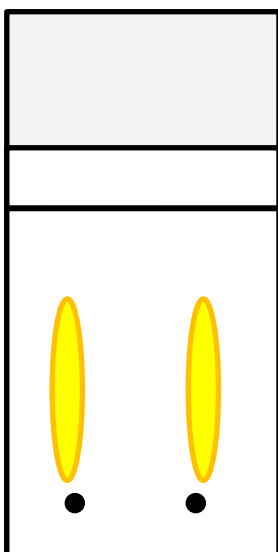
Recorrido Patrón: 4cm

Recorrido Muestra: 4cm

Rf Patrón: 0,8

Rf Muestra: 0,8

Fig. 11 Cromatografía con
arrastre con vapor



Hidrodestilación

Recorrido Total: 5,3cm

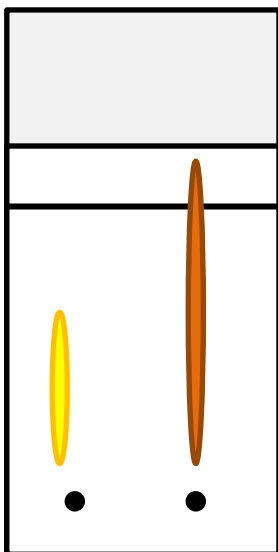
Recorrido Patrón: 4cm

Recorrido Muestra: 4cm

Rf Patrón: 0,755

Rf Muestra: 0,755

Fig. 12 Cromatografía con
Hidrodestilación



Extracción Soxhlet

Recorrido Total: 4,5cm

Recorrido Patrón: 4cm

Recorrido Muestra: +4,5cm

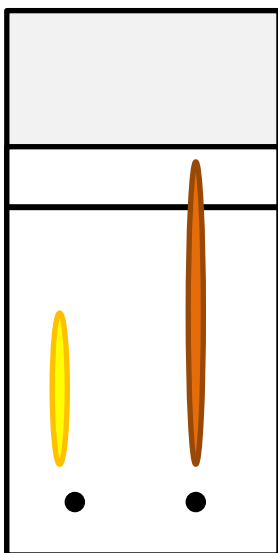
Rf Patrón: 0,88

Rf Muestra: No se puede calcular

Fig. 13 Cromatografía con Extracción Soxhlet

Solvente: 3:2 hexano y Diclorometano

Rf estimado del patrón: 0,31 [35]



Extracción Soxhlet

Recorrido Total: 4,9cm

Recorrido Patrón: 3cm

Recorrido Muestra: +4,9cm

Rf Patrón: 0,61

Rf Muestra: No se puede calcular

Fig. 14 Cromatografía con Extracción Soxhlet

3.4 Metodología de la Formulación

Los anestésicos locales bloquean en forma reversible la conducción de los impulsos en cualquier parte del sistema nervioso y en la totalidad de los nervios. Estos compuestos a menudo se utilizan para inducir una pérdida transitoria de la sensibilidad en un área circunscripta del cuerpo sin provocar una pérdida general de la conciencia. Este efecto se puede aprovechar para abolir la sensación de dolor en áreas corporales específicas. En consecuencia, los anestésicos locales se utilizan para evitar en procedimientos quirúrgicos u odontológicos.

La farmacología juega un papel importante en la elaboración de anestésicos, este se encarga del estudio de la reacción que tiene los principios activos sobre seres vivos, para la incorporación de un principio activo es necesario usar un vehículo. Los más utilizados en la realización de anestésicos tópicos son las emulsiones, debido a que esta proporciona mayor estabilidad y solubilidad al producto deseado.

Las emulsiones son dispersiones de dos o más líquidos inmiscibles generalmente aceite y agua termodinámicamente inestable, por lo que se requieren energía para su formación y en la presencia de un tercer componente que puede ser un surfactante para acentuar su estabilidad. Las emulsiones pueden ser de tipo agua en aceite (w/o) o aceite en agua (o/w). De acuerdo al tamaño de gotas dispersadas, estos sistemas se pueden clasificar como emulsiones submicrométricas y macroemulsiones.

Las emulsiones submicrométricas presentan en la actualidad gran interés y eso se debe a que las mismas presentan propiedades muy importantes, de las cuales carecen las emulsiones convencionales, como son: mayor estabilidad cinética, mejor distribución del aceite, mejor distribución de los aceites dispersados sobre la superficie de la piel.

La formulación de emulsiones submicrométricas es bastante compleja, se requiere de un conocimiento amplio de fisicoquímica del sistema para establecer los parámetros necesarios y lograr alcanzar el tamaño de gota y la estabilidad cinética adecuada. Existen

diferentes conceptos que ha sido propuesto para la formulación de emulsiones, uno del más usado es HLB.

El HLB del emulsificante intenta estimar la atracción simultánea que experimenta por las fases acuosa y oleosa.

El objetivo del presente trabajo es desarrollar un anestésico tópico bucal a partir del eugenol extraído de los clavitos de olor, usando emulsiones submicrométricas, además usando como variable de formulación el HLB de la mezcla de surfactante y establecer de esta manera los parámetros para obtener emulsiones con un diámetro de partículas pequeño.

3.4.1 Instrumentación

Las emulsiones submicrométricas, se obtuvieron mezclando composiciones diferentes de reactivos (span 20, tween 80, eugenol) en un agitador mecánico power control-visc, Kika-werke modelo Eurostar (50-2000 r.p.m) con turbina de paleta plana de 2 aspas. El anestésico tópico bucal se elaboró utilizando el mismo equipo de agitación.

El diámetro de gotas se midió en un medidor de tamaño de partícula malvern mastersizer, modelo 2000. Este equipo consta de una técnica de difracción láser para medir el tamaño de las partículas. Lo realiza mediante la medición de la intensidad de la luz dispersada, como un rayo láser que pasa a través de una muestra de partículas dispersas. Estos datos se analizan para calcular el tamaño de las partículas que crearon el patrón de dispersión.

La viscosidad se midió en un viscosímetro Brookfield Modelo RVT Massachussets.

3.4.2 Materiales

Los materiales utilizados están certificados por sus proveedores. Carboxilmetil celulosa, marca Xevara, distribuida por laboratorio FIRP, Propil-4-hidroxibenzoato (7427), marca Marck, distribuido por laboratorio FIRP, Span 20, marca Sigma, distribuido por laboratorio FIRP, Tween 80, marca Sigma-ald, agua destilada obtenida en el laboratorio de Membranas de la facultad de ingeniería, Eugenol obtenido en el laboratorio de alimentos de la facultad de ingeniería.

3.4.3 Procedimiento general

La formulación del anestésico tópico bucal se elaboró en dos etapas:

a) Optimización del protocolo de emulsiones a baja energía para obtener la emulsión submicrométrica base.

b) Incorporación de los demás componentes a la emulsión para la formulación definitiva del anestésico.

Antes de comenzar cada una de estas etapas se obtuvo el principio activo por extracción del clavo de olor por diferentes métodos y de esta manera ser usado para la formulación del anestésico tópico bucal.

Se prepararon diferentes emulsiones efectuando cálculos para la determinación de las cantidades necesarias de reactivos, y poder obtener emulsiones submicrométricas, se realizaron pesando en vasos de precipitado de 50 ml (marca kmax), tween 80, span 20, eugenol en diferentes composiciones, estas se mezclaron en un agitador power control-visc, Kika-werke y se le coloco aproximadamente 1 gota por segundo de agua en una bureta de 25 mL y de esta manera obtener las emulsiones (O/W). Este proceso se llevó a cabo temperatura ambiente (25 °C) y una velocidad constante de emulsión de 250 (r.p.m). En la tabla 1 se muestra un resumen de las composiciones y parámetros de emulsión para un sistema efectivo.

Componentes:		porcentaje
Fase oleosa	Eugenol	2 %
surfactante	Tween 80 Span 20	
Fase acuosa	Agua destilada	
Parámetros experimentales:		

Temperatura de emulsificación	Ambiente 25°C
Turbina	2 aspas
Velocidad de agitación	250 r.p.m

Tabla 1. Composición de la emulsión efectiva y condiciones experimentales de emulsificación.

Por otra parte, las diferentes emulsiones se estudiaron en base a la distribución del tamaño de gota y la estabilidad. El tamaño de gota se mide en el medidor de tamaño de partícula malvern mastersizer, el cual proporciona un inventario estadístico de la fragmentación de la fase dispersa y la representa en un histograma; para efecto práctico se usa un diámetro medio $D(3,2)$ (diámetro de Sauter). La estabilidad se determina observando la separación de fases en función al tiempo; la emulsión más estable es aquella que no presente cambios durante un periodo de tiempo suficiente para el propósito de la aplicación práctica.

Finalmente se procede a la elaboración del anestésico, agregando a la emulsión base el resto de los componentes. Conocidos los parámetros de la formulación de la emulsión submicrométrica. Se comienzan a incorporar el conservante propil-4-hidroxibenzoato y el agente viscosante Carboxilmetil celulosa, el propil-4-hidroxibenzoato se solubiliza en la fase oleosa, el agente viscosante se hidrata en la cantidad de agua adecuada, a una velocidad de 50 hasta 250 r.p.m por un periodo aproximado de 30 minutos. La tabla 2 muestra las composiciones del anestésico y los parámetros experimentales.

Componentes		
Emulsión base		
Principio activo	Eugenol	2 % p/p

Conservante	Propil-4-hidroxibenzoato	
Viscosante	Carboxilmetil celulosa	
Parámetros experimentales		
Mezclado	Velocidad	50-250 r.p.m
	Turbina	Ancla
	Tiempo	30 minutos
Temperatura		Ambiente (25 °C)
pH		
Donde r.p.m: revoluciones por minutos.		

Tabla 2. Composiciones del anestésico y parámetros experimentales

3.5 Obtención de la emulsión

Para la emulsión se conocen dos métodos, de baja energía y alta energía, para el caso del anestésico se empleó el de baja energía con inversión de fase, para lograr esto se realizó una variación de la formulación, las cuales son las características fisicoquímicas del sistema, esto corresponde al concepto de HLB. Las variables de composición se mantuvieron en todos los ensayos. Para la obtención de nano-emulsiones del tipo aceite-en-agua (O/W), el método consiste en agregar agua a una dispersión formada por aceite y surfactante hasta lograr la formación de la emulsión final. Incrementándose el contenido de agua en el sistema inicial se producen las transiciones o inversión de fases necesarias para formar una emulsión con tamaño submicrométrico.

Se estudió la formulación de emulsiones de fase oleosa (2% Eugenol) y fase oleosa 8% (2% Eugenol). Primero se realizó la emulsión base. Este proceso se llevó a cabo temperatura ambiente (25 °C) y 250 (r.p.m). Luego se añadió la fase acuosa (agua, propil-

4-hidroxibenzoato) a una velocidad constante de 250 r.p.m por un periodo aproximado de 30 minutos hasta observar la inversión de las fases, luego se añadió la solución madre del viscosante (Carboxilmetil celulosa) hasta obtener 50ml de emulsión final con una velocidad de 50 r.p.m para homogenizar.