

ARTÍCULO ORIGINAL

## Estabilidad en anaquel (segundo año) de un gel de *Rhizophora mangle* L.

Tania Pérez<sup>1</sup>, Dulce María Soler<sup>1</sup>, Yanet Rodríguez<sup>1</sup>, A. Escobar<sup>1</sup>, Yamilka Riverón<sup>1</sup>, I. Morales<sup>II</sup>, Zulema Pérez<sup>1</sup>, Marisleidys Llanes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de Las Lajas, Mayabeque, Cuba.  
Correo electrónico: [bueno@censa.edu.cu](mailto:bueno@censa.edu.cu); <sup>II</sup>Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM),  
Ave. 26 No. 1605, Plaza, La Habana, Cuba

**RESUMEN:** La estabilidad en anaquel, de larga duración o *shelf life* de una formulación es un factor fundamental para obtener un producto de calidad, más aún en los productos naturales pues son a menudo propensos al deterioro, especialmente durante el almacenamiento. Se evaluó la estabilidad a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  durante el segundo año, de tres lotes pilotos de un semisólido en forma de gel, obtenido a partir del extracto acuoso de la corteza de *Rhizophora mangle* L. Los lotes fueron producidos a escala piloto y envasados en tubos de aluminio de 25 g con laqueado interior. Se evaluaron los indicadores físico-químicos y microbiológicos a los 24 meses de almacenamiento y se compararon con los obtenidos a tiempo inicial y a los 12 meses. Como resultado todos los lotes mostraron estables sus propiedades organolépticas, pH de 6 a 7, área de extensibilidad de 30-50 cm<sup>2</sup>, límite microbiano  $<10^2$  UFC/g, actividad antimicrobiana entre 8-10 mg/g y comportamiento reológico de un fluido no newtoniano del tipo Herschel Bulkley, sin diferencias significativas con los tiempos anteriores. La concentración de taninos totales presentó variación en el tiempo, no obstante este indicador estuvo dentro del límite de aceptación para la formulación de 13-30 mg/g. Estos resultados permiten proponer un período de validez del producto de 2 años bajo las condiciones de almacenamiento ensayadas.

**Palabras clave:** estabilidad, gel, *Rhizophora mangle* L.

---

### Stability on shelf (second year) of a gel from the *Rhizophora mangle* L.

**ABSTRACT:** A long-term shelf stability or shelf life of a formulation is a critical factor in obtaining a quality product; moreover in natural products since they are often prone to deterioration, especially during storage. The stability of three pilot batches of a semisolid gel was evaluated at  $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$  during the second year. They were obtained from *R. mangle* L bark aqueous extract. Lots were produced at pilot scale and packaged in internally lacquered aluminum tubes of 25 g. Physical-chemical and microbiological indicators were evaluated after 24 months of storage and compared with those obtained at the initial time and after 12 months. All batches showed stable organoleptic properties, pH 6 to 7, extensibility area of 30-50 cm<sup>2</sup>, microbial limit  $<10^2$  CFU/g, antimicrobial activity between 8-10 mg/g and rheological behavior of a non-newtonian fluid type Herschel Bulkley, without significant differences with the earlier times. The concentration of total tannins showed variation over time; however, this indicator was within the acceptance limit for a 13-30 mg/g formulation. These results allowed proposing a shelf life of the product of two years under the storage conditions tested.

**Key words:** stability, gel, *Rhizophora mangle* L.

---

### INTRODUCCIÓN

Los estudios de estabilidad en anaquel constituyen un requisito indispensable en las buenas prácticas de producción (BPP), estos suministran las evidencias de

cómo la calidad del producto varía con el tiempo bajo la influencia de una diversidad de factores ambientales, tales como la temperatura, la humedad y la luz, y de factores relacionados con el producto, entre los que sobresalen las propiedades físico-químicas del princi-

pio activo y de los excipientes, la forma farmacéutica y su composición, los procesos de fabricación y la naturaleza y propiedades del envase utilizado (1).

En los últimos años se demostraron varias propiedades farmacológicas del extracto acuoso de la corteza de *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo), debidas fundamentalmente a su composición polifenólica. Estas incluyen: eficacia en la curación de las heridas (2), propiedades antimicrobianas (3), antiinflamatorias (4), antioxidantes (5) antiulcerogénicas (6), entre otras. Además, se desarrollaron ensayos con formulaciones de mangle rojo que confirmaron su seguridad e inocuidad, al no presentarse alteraciones en las estructuras de la piel en el área tratada, ni en los órganos internos, relacionadas con procesos irritativos (7)

Entre las formulaciones farmacéuticas desarrolladas se encuentra un semisólido en forma de gel, para su uso en heridas en la piel, el que fue evaluado con resultados satisfactorios en estudios de estabilidad acelerada (8) y en anaquel durante 12 meses (9).

Teniendo en consideración los resultados de los estudios antes mencionados es posible extender el período de validez del producto, cumpliendo los requerimientos descritos por la autoridad reguladora (CECMED), por lo que se propone como objetivo del presente trabajo la evaluación de la estabilidad en anaquel de un gel tópico de mangle rojo, durante el segundo año de producido.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El extracto acuoso de la corteza seca y molinada de *Rhizophora mangle* L. (10), proveniente de árboles adultos, recolectada al sur de la provincia de Mayabeque y certificada por especialistas del Jardín Botánico Na-

cional, fue utilizada para producir tres lotes pilotos de un semisólido en forma de gel (11) Los lotes manufacturados consecutivamente (identificación 011107, 021107, 031107) y evaluados durante 12 meses con resultados satisfactorios (9), fueron utilizados para estudiar su comportamiento en el tiempo hasta alcanzar los 24 meses de estabilidad.

Durante todo el tiempo el producto estuvo almacenado en tubos colapsibles de aluminio con laqueado interior, de 25 g de capacidad, abertura con sello metálico y tapa de polietileno con perforador, a temperatura de  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ .

### Índices de Calidad estudiados

En la Tabla 1 se muestran las especificaciones de calidad estudiadas con sus límites de aceptación y a continuación se describen los métodos empleados.

- Propiedades organolépticas: Se evaluaron sensorialmente los geles, teniendo en cuenta los aspectos de apariencia: facilidad de aplicación, textura (homogénea o no homogénea), consistencia (fluida, semiviscosa o viscosa), color y olor.
- pH: Se determinó con un pHmetro inoLab pH 730.
- Taninos totales (TT): Se realizó mediante una precipitación cuantitativa de los taninos presentes en 1 g de la formulación, con albúmina sérica y su posterior determinación colorimétrica con cloruro férrico (12).
- Área de extensibilidad: Se midió utilizando placas de vidrio de 20 x 20 cm, se colocó la placa inferior sobre una hoja de papel milimetrado a la que se le trazaron diagonales sobre un sistema de ejes cartesianos y se situó una muestra de 2 g de gel sobre el punto de intersección. Se pesó y colocó la placa superior, trans-

**TABLA 1.** Índices de calidad estudiados y límites de aceptación./ *Quality indexes studied and acceptance limits*

Índice de calidad	Límite de aceptación
Propiedades organolépticas	Preparado untuoso, homogéneo, viscoso, libre de grumos, brillante, de color pardo rojizo oscuro y olor característico
pH	6,0-7,0
Taninos totales	13-30 mg/g
Extensibilidad	30-50 cm <sup>2</sup>
Límite microbiano	No más de 10 <sup>2</sup> UFC/g No deben estar presentes: <i>Pseudomona aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida</i> sp, <i>Salmonella</i> sp y otras enterobacterias
Actividad Antimicrobiana: Concentración mínima inhibitoria (CMI)	8-20 mg/g
Características reológicas	Fluido no newtoniano del tipo Herschel Bulkley (Potencial modificado)

currido 1 minuto se tomaron los valores de los 8 radios formados desde el punto de aplicación hasta el borde del semisólido extendido. Se calculó el área de extensibilidad  $A_E$  según la expresión:  $A_E = \pi(rp)^2$ ; donde:  $rp$  es el radio promedio de las 8 mediciones en centímetros (13).

- Límite microbiano: Se determinó por el método de placa invertida el conteo de microorganismos viables aerobios, así como la identificación de las especies de microorganismos aislados (14).
- Actividad Antimicrobiana: Se determinó la mínima concentración del producto que es capaz de inhibir el crecimiento de la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29740 en un período de 24 horas (15).
- Características reológicas: Se realizó en un roto viscosímetro HAAKE de cilindros concéntricos, que lleva acoplado el sistema M5/SV2 y utiliza un programa computarizado ROT.23 versión 2.3 HAAKE. Se trabajó en un ambiente termostataado a 25°C. El gradiente de velocidad empleado fue de 0 a 100 s<sup>-1</sup>, con una duración de 2 minutos y la velocidad de cizalla fue de 0-200 Pa. Se realizaron mediciones tras el aumento y la disminución de la velocidad de deformación con el objetivo de obtener las curvas ascendentes y descendentes de los gráficos de fluidez. Se graficó la tensión de cizalla  $\tau$  (Pa) contra la velocidad de cizalla  $\dot{\gamma}$  (s<sup>-1</sup>).

Para cada técnica se evaluaron tres réplicas por lote, se determinó la media y la desviación estándar. Los resultados de la evaluación de los lotes se compararon con los obtenidos al inicio cuando fueron elaborados y a los 12 meses.

## Procesamiento estadístico de los resultados

Para el procesamiento estadístico de los resultados se realizó una prueba no paramétrica (Kruskal-Wallis) para determinar la existencia o no de diferencias significativas entre los tiempos de evaluación, para un nivel de confianza de 95 %.

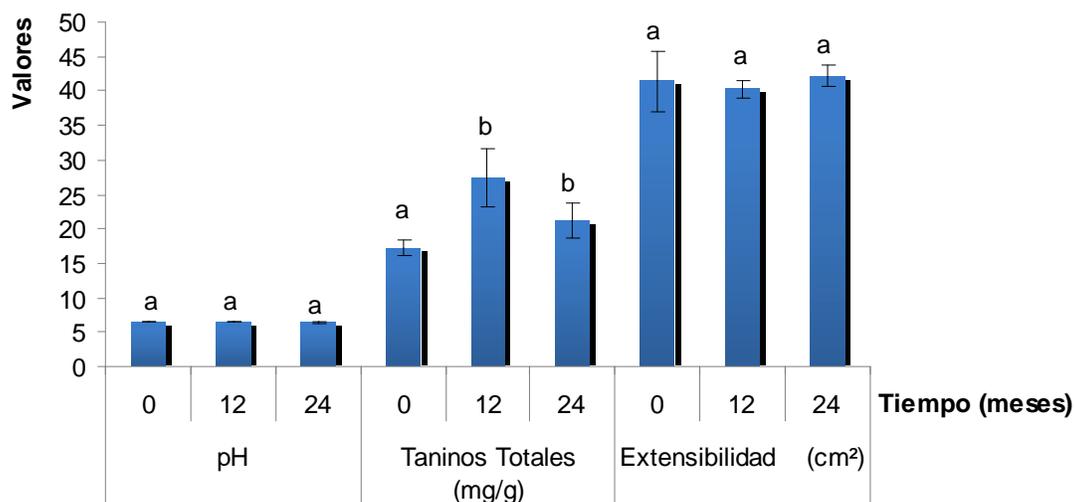
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al evaluar las propiedades organolépticas de los tres lotes a los 24 meses de producidos, estos se mostraron como un preparado untuoso, homogéneo, viscoso, libre de grumos, brillante, de color pardo rojizo oscuro y olor característico a la droga vegetal, coincidiendo con lo descrito en su evaluación inicial y a los 12 meses de producidos (9).

La Figura 1 muestra los resultados de la evaluación del pH, TT y extensibilidad, comparados con los valores de partida e intermedio (12 meses).

Es importante tener presente que en las preparaciones de aplicación en la piel, el pH debe estar comprendido entre 3,0-8,0, de modo que no se produzca irritación y daño a la piel (16), en esta formulación el intervalo de aceptación establecido es entre 6,0-7,0. Al evaluar el producto, los valores de pH de los tres lotes desde el inicio y hasta los 24 meses se mantuvieron con un valor promedio de 6,5±0,1 (Figura 1), no se observaron diferencias significativas ( $p=0,17$ ) entre los tres tiempos estudiados lo que es un indicador de estabilidad física.

El extracto acuoso de la corteza de *R. mangle* presenta un alto contenido de polifenoles, representados



**FIGURA 1.** Comportamiento de los lotes de gel, recién elaborados, 12 y 24 meses a 5±3°C. / Behavior of batches of gel, freshly prepared, 12 and 24 months at 5±3°C.

en su mayoría por taninos condensados (80 %) y taninos hidrolizables (20 %); destacándose la presencia de epicatequina, catequina, ácido clorogénico, ácido gálico, ácido elágico, así como galotaninos y elagitaninos (17). Estos compuestos mayoritarios definen la actividad biológica del extracto vegetal (18), donde no se puede enmarcar a uno solo como el responsable de las acciones farmacológicas (19).

En este estudio los taninos totales mostraron un comportamiento promedio de  $22 \pm 5$  mg/g en el período de evaluación. Como se observa en la Figura 1, se hallaron diferencias significativas ( $p=0,049$ ) entre el tiempo inicial y las determinaciones a los tiempos de 12 y 24 meses, no ocurriendo así al comparar el tiempo de 12 meses con el muestreo a los 24 meses ( $p=0,13$ ), a pesar de que se observó una disminución en el contenido de TT en este último.

El incremento en la concentración de taninos totales pudo estar relacionado con una polimerización espontánea de los polifenoles en el tiempo, similar a lo que le ocurre a la planta *Rhizophora mangle* L. durante su envejecimiento, donde desaparecen las estructuras de bajo peso molecular favoreciendo la polimerización (20). Este aspecto provoca un aumento en los valores de TT cuantificados por la técnica colorimétrica empleada debido al principio del método (12). Por otra parte, la tendencia a la disminución de la concentración de TT a los 24 meses puede relacionarse con procesos de oxidación de los grupos fenólicos.

Otro aspecto que pudo estar influyendo en la variación de los resultados es la variabilidad intrínseca de la técnica, donde los coeficientes de variación mostraron la influencia del cambio de analista, el día de análisis y el lote de reactivo color (12). Sin embargo, todos los lotes mantuvieron este indicador entre los límites de aceptación establecidos de 13-30 mg/g (21) (Figura 1), no mostrándose afectación en los resultados de eficacia del producto, aspecto corroborado en los ensayos de concentración mínima inhibitoria (Tabla 2).

La extensibilidad se define como el incremento de superficie que experimenta una cierta cantidad de semisólido cuando se le somete a la acción de un peso, este ensayo es muy valioso para estimar la consistencia en semisólidos, a pesar de ser una prueba

de baja exactitud y reproducibilidad. En la determinación del área de extensibilidad no se mostraron diferencias significativas ( $p=0,08$ ) entre los tiempos de evaluación, algunos autores (22) recomiendan valores de área de extensibilidad de 30-40  $\text{cm}^2$  pues a mayor extensibilidad, menor consistencia y por tanto, mayor facilidad de aplicación del producto, en este caso, los valores del área de los tres lotes estuvieron dentro del límite de aceptación establecido de 30-50  $\text{cm}^2$  (Figura 1).

En la Tabla 2 se muestran los resultados del límite microbiano y la actividad antimicrobiana de los lotes a los tres tiempos de evaluación.

Como se observa, el cumplimiento del límite microbiano establecido y la ausencia de microorganismos patógenos demuestran que los lotes no se encuentran contaminados, lo que indica que el proceso de elaboración del producto cumplió con las BPP.

El efecto antimicrobiano del extracto acuoso de la corteza de *R. mangle* fue demostrado *in vitro* contra varios microorganismos patógenos (23), estando la CMI para *Staphylococcus aureus* en 8 mg/mL. En este estudio la CMI fue de 10 mg/g al cabo de 24 meses, lo que garantiza su actividad biológica pues el producto está formulado a una concentración de sólidos solubles totales tres veces mayor.

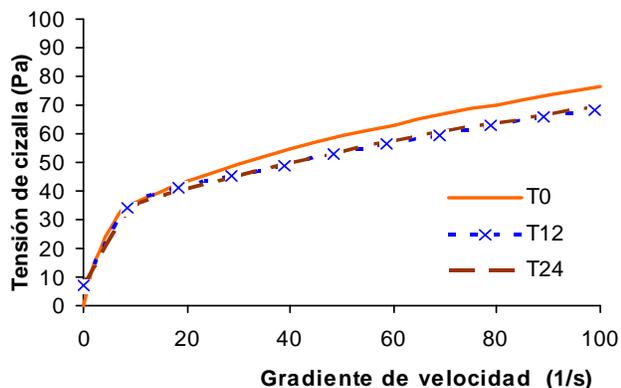
La Figura 2 muestra el comportamiento reológico que siguen los lotes recién elaborados y en su evaluación al cabo de 12 y 24 meses. En todos los tiempos la formulación coincidió con un cuerpo con flujo newtoniano de tipo plástico no ideal, debido a que no existe una relación constante entre la viscosidad y el gradiente de velocidad, además la relación entre el esfuerzo cortante y el gradiente de velocidad demostró que al aplicar un esfuerzo inicial mínimo el sistema comienza a fluir.

Al realizar el análisis de las curvas fluidimétricas ascendentes estas se ajustaron al modelo Herschel Bulkley ( $R^2=0,99$ ), este modelo se representa como  $\tau = \tau_0 + a\dot{\gamma}^n$ , donde:

- $\tau_0$ : esfuerzo de cizalla inicial o tensión de fluencia
- a: coeficiente de consistencia
- n: índice de flujo

**TABLA 2.** Resultados del estudio de estabilidad en anaquel a  $5 \pm 3$  °C hasta 24 meses./ *Results of the shelf stability study at  $5 \pm 3$ °C up to 24 months.*

Parámetro	Tiempo inicial	12 meses	24 meses
Límite microbiano	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g	$<10^2$ UFC/g
Concentración mínima inhibitoria	8-10 mg/g	8-10 mg/g	8-10 mg/g



**FIGURA 2.** Reogramas de los lotes producidos a tiempo inicial (T0), transcurridos 12 (T12) y 24 meses (T24) a 5°C./ *Rheograms of each batch produced at initial time (T0) and after 12 (T12) and 24 months (T24) at 5°C.*

Con este estudio se pudo demostrar la estabilidad mecánico-estructural de los lotes, indicativo de su estabilidad física durante 24 meses.

Al integrar los resultados de las evaluaciones físico-químicas y microbiológicas, unido a la evaluación preclínica (21) podemos plantear que los lotes fueron estables durante 24 meses, esto indica que el producto obtenido será capaz de penetrar la piel y cumplir las funciones para las que fue diseñado (antiséptico y estimulador de la curación de heridas), y se garantiza así su estabilidad terapéutica y su correcta formulación desde el punto de vista galénico, por lo que se propone un período de validez del producto de 2 años almacenado en refrigeración de 2-8°C.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Amalia Núñez Drake, a la técnico Yisel Sánchez Vivó y a la Ing. Vlanelys Vega Céspedes por su contribución en las evaluaciones microbiológicas y físico-químicas.

## REFERENCIAS

- CECMED. Regulación 23: Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de productos farmacéuticos nuevos y conocidos. 2000. Disponible en: [http://www.cecmec.sld.cu/Docs/RegFarm/DRA/LicProd/1992-2000/Reg/Reg\\_23-00.pdf](http://www.cecmec.sld.cu/Docs/RegFarm/DRA/LicProd/1992-2000/Reg/Reg_23-00.pdf).
- Fernández O, Capdevila JZ, Dalla G, Melchor G. Efficacy of *Rhizophora mangle* L. aqueous bark extract in the healing of open surgical wounds. *Fitoterapia*. 2002;73(7/8):564-568.
- Melchor G, Fernández O, Álvarez E, Fragas I, Lobo E. Evaluación del efecto antiséptico *in vivo* del CIKRON-H. *Rev Mex Ciencias Farm*. 2001;32(2):25-30.
- Marrero E, Sánchez J, de Armas E, Escobar A, Melchor G, et al. COX-2 and sPLA<sub>2</sub> inhibitory activity of aqueous extract polyphenols of *Rhizophora mangle* (red mangrove). *Fitoterapia*. 2006;77:313-15.
- Sánchez J, Faure R, Martínez G, Vega E, Fernández O. Propiedades antioxidantes de *Rhizophora mangle* L. y su relación con el proceso de curación de heridas en ratas. *Rev Salud Anim*. 2009;31(3):170-175.
- Sánchez LM, Escobar A, Souccar C, Remigio MA, Mancebo B. Pharmacological and toxicological evaluation of *Rhizophora mangle* L., as a potential antiulcerogenic drug: Chemical composition of active extract. *J Pharmacognosy Phytother*. 2010;2(4):56-63.
- Sánchez LM, Escobar A, Valcárcel L. Caracterización preliminar de la materia prima de *Rhizophora mangle* L. en la obtención de productos farmacéuticos procedentes de tres zonas geográficas de Cuba. *Rev Salud Anim*. 2005;27(2):115-23.
- Soler DM, Rodríguez Y, Pérez T, Riverón Y, Morales I. Estabilidad acelerada de un gel de *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo) para heridas y quemaduras. *Rev Cubana Farm*. 2011;45(4):563-74.
- Soler DM, Rodríguez Y, Pérez T, Riverón Y, Morales I. Estabilidad en anaquel de un gel a partir *Rhizophora mangle* L. para el tratamiento de heridas y quemaduras. *Rev Cubana Farm* 2012;46(4).
- Pérez T, Rodríguez Y, Díaz E, Domínguez A, Riverón Y, Núñez A. Influencia de la preparación de la corteza de *Rhizophora mangle* L. en el proceso de extracción sólido-líquido. *Rev Cubana Plant Med*. 2011;16(1):94-104.
- Vasallo Y. Desarrollo y evaluación de un gel de mangle rojo [Tesis de Grado]. CENSA-Facultad de Farmacia: Universidad de La Habana; 2008.
- Travieso MC, Betancourt A, Escobar A, Linares A, Rodríguez Y, Pérez T. Validación del método de

- cuantificación de taninos totales en formulaciones semisólidas de *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo). Rev Cubana Plant Med. 2011;16(1):82-93.
13. Procedimientos normalizados de trabajo: PN/1/CP/003/00 Determinación de extensibilidad [monografía en Internet]. Formulario Nacional 1ª edición; 2003. Disponible en: <http://www.azfarmacia.com/formula/detExte.doc>.
  14. USP 30. United States Pharmacopoeia: 61 Microbial Limit Tests. E-book of the U. S. Pharmacopoeia 30-NF 25. The Standard of Quality, 2007. p 83.
  15. CENSA. PNO-AM-004: Determinación de la CMI para mangle semisólido. 2008. Disponible en: <http://sig.censa.edu.cu/sig/Documentos/Calidad/PNO/PNO-AM-020.pdf>.
  16. Muñoz M. Síntesis y caracterización de geles como vehículos de Meloxicam y Acetato de Vitamina E de aplicación tópica terapéutica y cosmética [Tesis doctoral]. Editorial Universidad de Granada: ISBN: 84-338-3300-6; 2005. Disponible en: <http://www.digibug.ugr.es/bitstream/10481/560/1/15381870.pdf>.
  17. Sánchez LM, Melchor G, Álvarez S, Bulnes C. Caracterización química y toxicológica de una formulación cicatrizante de *Rhizophora mangle* L. Rev Salud Anim. 1998;20(2):69-72.
  18. Sánchez LM, Valcárcel L, Escobar A, Noa M. Polyphenol and phytosterols Composition in an antibacterial extract from *Rhizophora mangle* L. bark. J Herbal Pharmacother. 2008;7(3-4):107-128.
  19. Del Carlo M, Sacchelli G, Di Mattia C, Compagnone D, Mastrocola D, Liberatore L, et al. Contribution of the phenolic fraction to the antioxidant activity and oxidative stability of olive oil. J Agric Food Chem. 2004; 52(13):4072-4079.
  20. Kandil F, Grace M, Seigler D, Cheeseman J. Polyphenolics in *Rhizophora mangle* L. leaves and their changes during leaf development and senescence. Trees-Structure and Function. 2004;18(5):518-528.
  21. Pérez T. Obtención de una formulación semisólida (gel) a partir del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. Informe final. La Habana: MINSAP-CENSA; 2008.
  22. García O, Suárez Y, Mishig M, DaoThanh T. Desarrollo y optimización de una jalea de piroxicam 0,5 %. Rev Cubana Farm. 2009;43(4):4-19.
  23. Armenteros M, Ginorio MC. Determination of the minimum inhibitory concentration of *Rhizophora mangle* L. (red mangrove) against different microorganisms. Rev Salud Anim. 1999;21(2):135.
- Recibido: 1-3-2012.**  
**Aceptado: 8-8-2012.**