

57
24.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN.

**CULTIVO Y PRODUCCION DE BIOMASA DE *Scenedesmus obliquus*
Y SU POSIBLE UTILIZACION COMO ACARREADORES DE COSMETICOS.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A

FRANCISCO ALBERTO RANGEL CAMARGO

ASESORES:

Q.F.B. ABELARDO CHAVEZ MONTES
Q.F.B. ELVIRA RIOS LEAL
M. en C. ROSA OLIVIA CAÑIZARES VILLANUEVA.

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX. 1997.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA ACADÉMICA
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN
P R E S E N T E .

ATN. Lic. Rafael Rodríguez Coballos,
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 48 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

"Cultivo y producción de hongo de biomasa de Agaricus

que recibe el título de Agaricus

que presenta al presentar Agaricus con número de cuenta 1001 para obtener el TÍTULO de Químico Farmacéutico Biólogo.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXÁMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Mex., a 5 de Septiembre de 1992.

PRESIDENTE D.E.B. Susana E. Miranda Castro

VOCAL D.E.B. Elizabeth Tartz García

SECRETARIO D.E.B. Abelardo Chávez Montes

PRIMER SUPLENTE D.E.S.S. Rodolfo Cruz Rodríguez

SEGUNDO SUPLENTE D.E.B. Rafael Villalobos García

Elizabeth Tartz García
Rafael Rodríguez Coballos
7/VII/92

Este trabajo se realizó en el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-IPN bajo la supervisión de la Q.F.B. Elvira Ríos Leal y la M. en C. Rosa Olivia Cañizares Villanueva.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo económico brindado por la Q.F.B. Elvira Ríos Leal jefe del Laboratorio de Cromatografía del CINVESTAV-IPN para la realización de este proyecto

Se agradece el apoyo brindado al I.Q. Cirino Rojas Chaves del Laboratorio de Cromatografía del CINVESTAV-IPN para la realización de los análisis de ácidos grasos en la muestra de la microalga.

Se agradece la valiosa colaboración del Sr. Rodolfo Robles del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por su ayuda en la toma de las micrografías electrónicas.

Se agradecen las facilidades y apoyo brindado por la Q.F.B. Rocío Castro Ríos del Laboratorio de Proyectos de Investigación en Productos Naturales de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Plantel Iztacala durante la realización de la prueba de inocuidad de la biomasa.

Se agradece la participación de los señores Vinicio Mena Villeda, José Luis Sánchez Figueroa y Alfredo Medina Dávila Técnicos del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-IPN.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	I
LISTA DE TABLAS	II
LISTA DE FIGURAS	III
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVOS	2
III. GENERALIDADES	
3.1 La piel	3
3.1.1 Anatomía y fisiología	3
3.1.2 Epidermis	4
3.1.2.1 Estrato corneo	4
3.1.2.2 Estrato granuloso	4
3.1.2.3 Estrato espinoso	4
3.1.2.4 Estrato basal	4
3.1.3 Dermis	5
3.1.3.1 Fibroblastos, colágeno y elastina	5

3.1.3.2 Células arboladas.....	5
3.1.3.3 Folículos pilosos y glándulas sebáceas.....	5
3.1.3.4 Glándulas sudoríparas.....	6
3.1.3.5 El color.....	6
3.2 Las algas.....	7
3.3 Cultivo.....	10
3.3.1 Medio de cultivo.....	10
3.3.2 Efecto del pH.....	11
3.3.3 Fuentes de carbono.....	11
3.3.4 Fuentes de nitrógeno.....	11
3.3.5 Iluminación y temperatura.....	12
3.3.6 Organismos contaminantes del cultivo.....	13
3.4 Métodos de evaluación del desarrollo de la biomasa.....	13
3.4.1 Rendimiento.....	15
3.4.2 Densidad celular.....	15
3.5 Sistemas de cultivo.....	15
3.5.1 Cultivo en lote.....	15
3.5.1.1 Cultivo en lote sincronizado.....	16
3.5.2 Cultivo continuo.....	16
3.5.2.1 Quimiostato.....	16
3.5.2.2 Cultivo semicontinuo.....	16
3.5.2.3 Cultivo en turbidostato.....	17
3.6 Aplicaciones.....	17
3.7 El género <i>Scenedesmus</i>.....	18

3.7.1	Requerimientos nutritivos y medio de cultivo	22
3.7.2	Cultivo masivo de <i>Scenedesmus</i> sp.....	23
3.7.3	Composición química	24
3.8	Las algas y los cosméticos	25
3.8.1	El efecto cosmético de los extractos de microalgas	26
3.9	Los cosméticos: una breve historia.....	26
3.10	La liberación de principios activos.....	30
3.11	Definición del proceso de difusión	31
3.11.1	Primera ley de Fick sobre difusión	31
3.11.2	Segunda ley de Fick sobre difusión	32
3.11.3	Modelos matemáticos propuestos por Higuchi y Peppas para el estudio de la liberación de activos	35
3.12	Plataformas de liberación de principios activos empleados en farmacia y química cosmética	37
3.12.1	Microcápsulas y nanopartículas	37
3.12.2	Liposomas.....	38
3.12.3	Células acarreadoras	39
 IV. PARTE EXPERIMENTAL.		
4.1	Materiales y equipo.....	40
4.2	Reactivos.....	41

4.3 Material Biológico.....	42
4.4 METODOS	
4.4.1 Diagrama de flujo de la parte experimental.....	42
4.5 Medios de cultivo.....	42
4.5.1 Medio de conservación de la cepa.....	42
4.5.2 Medio de crecimiento.....	42
4.6 Experimentos a nivel de matraz Fernbach.....	42
4.6.1 Cinética de crecimiento de <i>Scenedesmus obliquus</i>	42
4.7 Obtención de biomasa de <i>S. obliquus</i>	43
4.7.1 Preparación del inóculo.....	43
4.7.2 Producción de la biomasa.....	44
4.7.3 Cosecha de la biomasa.....	44
4.7.4 Liofilización de la biomasa.....	44
4.8 Determinaciones analíticas.....	46
4.8.1 Extracto etéreo de la biomasa de <i>S. obliquus</i>	46
4.8.2 Determinación de ácidos grasos.....	46
4.8.3 Determinación de vitaminas liposolubles.....	46
4.8.4 Determinación de fosfolípidos.....	47
4.8.5 Determinación de β -caroteno.....	47
4.8.6 Determinación de vitaminas hidrosolubles.....	48
4.9 Determinación de la inocuidad de la biomasa de <i>S. obliquus</i>	49
4.10 Cargado de las células de <i>S. obliquus</i>	50

4.10.1	Determinación de la cantidad de glicerol absorbible por las células de <i>S. obliquus</i> en presencia de diferentes concentraciones de cloruro de sodio.....	50
4.10.2	Cinética de liberación de glicerol absorbido en <i>S. obliquus</i>	51
4.11	Microscopía electrónica.....	51
4.11.1	Preparación de células liofilizadas de <i>S. obliquus</i>	51
4.11.2	Preparación de células cargadas con glicerol.....	51
4.11.3	Determinación del tamaño de las células de <i>S. obliquus</i>	52
V. RESULTADOS Y DISCUSION.		
5.1	Características de crecimiento del cultivo de <i>S. obliquus</i> en matraz.....	53
5.1.1	Cinética de crecimiento de <i>S. obliquus</i> en suspensión.....	53
5.2	Rendimiento celular del cultivo.....	54
5.3	Composición química de <i>S. obliquus</i>	54
5.4	Prueba de inocuidad de las células de <i>S. obliquus</i> sobre piel rasurada de conejo.....	56
5.5	Pruebas de liberación de glicerol a partir de células de <i>S. obliquus</i>	56
5.5.1	Determinación de la cantidad de glicerol absorbible por las células de <i>S. obliquus</i> en presencia de diferentes concentraciones de cloruro de sodio.....	56
5.5.2	Cinética de liberación de glicerol absorbido por <i>S. obliquus</i>	58
5.6	Microscopía electrónica.....	62

5.6.1 Comparación de las micrografías de <i>S. obliquus</i> liofilizadas vs cargadas con glicerol.....	62
5.6.2 Determinación del tamaño celular de <i>S. obliquus</i>	62
VI. CONCLUSIONES	67
VII. LITERATURA CITADA	68
APENDICE I	73
APENDICE II	74

RESUMEN

En el presente trabajo se llevo a cabo la producción de biomasa de *Scenedesmus obliquus* CDBB-A-15. Se cultivó en 10 l de medio líquido C64, a una temperatura de 28 ± 2 C, con agitación mediada por burbujeo de aire, iluminación con lámparas fluorescentes, en garrafones de 20 l de capacidad total, en condiciones de esterilidad, por 6 días. La biomasa se cosecho por centrifugación y se liofilizó.

Posteriormente se determinó el contenido de los compuestos con mayor interés en cosmetología: lípidos, fosfolípidos, ácidos grasos, β -caroteno y vitaminas hidrosolubles y liposolubles. Los análisis se llevaron a cabo por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) y por cromatografía de gases con detector de ionización de flama (DIF).

Se llevaron a cabo ensayos para determinar la utilización de las células de esta microalga como acarreadoras de glicerol. Se efectuó un estudio preliminar para determinar la cantidad de glicerol absorbible por las células en presencia de diferentes fuerzas iónicas: con cloruro de sodio, se observó que las células podían absorber aproximadamente 20 mg de glicerol por gramo de biomasa seca en un sistema hipotónico. Con estos resultados se procedió a llevar a cabo las cinéticas de liberación para determinar el perfil que este sistema proporciona.

Se tomaron micrografías electrónicas de la biomasa liofilizada y de la biomasa liofilizada inmediatamente después de haber sido cargada con glicerol.

Para demostrar la inocuidad de las microalgas sobre la piel, se llevo a cabo la prueba discriminativa en piel rasurada de conejo. Para ello se utilizaron tres conejos albinos machos, adultos de entre 2.5 y 3.5 Kg de peso, a los cuales se les rasuró el lomo y se les aplicó tópicamente un mililitro de una suspensión de 50 mg de células/mL en etanol cada 24 horas durante 4 días, sobre piel intacta y piel excoriada. Antes de cada aplicación no se observó la presencia de edema o entema sobre las zonas empleadas, lo que descarta la posibilidad de toxicidad sobre la piel.

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla I Productos obtenidos del cultivo masivo de microalgas y su valor agregado.	8
Tabla II Rendimiento de cultivos de microalgas comparado con el de otros cultivos.	9
Tabla III Características bioquímicas y fisiológicas de 7 especies de <i>Scenedesmus</i> .	21
Tabla IV Formulaciones de medios de cultivo salinos recomendados para crecimiento de <i>Scenedesmus</i> .	23
Tabla V Composición química de <i>Scenedesmus obliquus</i> producido independientemente por Cairo, Dortmund y Mysore	25
Tabla VI Formulación del medio de cultivo Bristol modificado	44
Tabla VII Condiciones de operación del cromatógrafo de gases para la determinación de la composición de ácidos grasos en <i>S. obliquus</i>	47
Tabla VIII Longitud de onda de máxima absorción y composición de la fase móvil utilizada para la determinación de vitaminas liposolubles en <i>S. obliquus</i>	47
Tabla IX Condiciones de inyección de muestras de la fracción insaponificable para la determinación de fosfolípidos en <i>S. obliquus</i>	47
Tabla X Condiciones de operación del cromatógrafo de líquidos empleado en la determinación de β -caroteno en <i>S. obliquus</i>	48
Tabla XI Condiciones de operación del cromatógrafo de líquidos para la determinación de vitaminas hidrosolubles en <i>S. obliquus</i> .	48
Tabla XII Longitud de onda a las que se ajustó el detector de UV para la determinación de vitaminas hidrosolubles determinadas en <i>S. obliquus</i> .	49
Tabla XIII Composición química de <i>S. obliquus</i> CDBBA 15.	55
Tabla XIV Promedios del porcentaje de glicerol absorbido en células de <i>S. obliquus</i> liofilizadas.	57

LISTA DE FIGURAS.

	Página.
Figura 1. Corte longitudinal de la piel.	3
Figura 2. Aplicaciones biotecnológicas el cultivo de microalgas.	9
Figura 3. Cantidad máxima de bióxido de carbono presente en el medio como una función del pH de la solución.	12
Figura 4 Curva de crecimiento ideal de microalgas en un cultivo de volumen limitado	14
Figura 5 Células de <i>S. obliquus</i> cepa D3	20
Figura 6 Modelo propuesto de la pared celular de <i>S. maximus</i>	21
Figura 7 Ciclo reproductor de <i>Scenedesmus</i> sp	22
Figura 8 Perfiles de concentración de activo para sistemas convencionales de liberación	31
Figura 9 Figura descriptiva de una celda para estudios de difusión	33
Figura 10 Diagrama de flujo de la parte experimental	43
Figura 11 Esquema de obtención de biomasa de <i>S. obliquus</i>	45
Figura 12 Superficie corporal dorsal del lomo de conejo	50
Figura 13 Dispositivo empleado para llevar a cabo la cinética de liberación de glicerol por células de <i>S. obliquus</i>	52
Figura 14 Curva de crecimiento de <i>S. obliquus</i> CDBB-A-15 en medio de cultivo líquido C64.	53
Figura 15 Absorción de glicerol por células liofilizadas de <i>S. obliquus</i> en presencia de diferentes fuerzas iónicas con NaCl.	57
Figura 16 Porcentaje de glicerol liberado por <i>S. obliquus</i> respecto al tiempo en medio hipotónico.	58

Lista de figuras (cont)

Figura 17 Aplicación de la ecuación de Peppas a los datos de liberación de glicerol en medio hipotónico encapsulado en células de <i>S. obliquus</i> al tiempo	59
Figura 18. Aplicación de la ecuación de primer orden para los datos de liberación de glicerol por células liofilizadas de <i>S. obliquus</i> en medio hipotónico	60
Figura 19 Aplicación de la ecuación del modelo de Higuchi a los datos de liberación de glicerol por células liofilizadas de <i>S. obliquus</i> en medio hipotónico	61
Figura 20 Fotografía de microscopio óptico de las células de <i>Scenedesmus</i> en medio Bristol modificado	53
Figura 21 Micrografía de barrido electrónico de las células de <i>S. obliquus</i> CDBB-A-15 liofilizadas	64
Figura 22 Micrografía de barrido electrónico de las células de <i>S. obliquus</i> CDBB-A-15 luego del proceso de encapsulación del glicerol.	65
Figura 23 Micrografía de barrido electrónico de las células de <i>S. obliquus</i> CDBB-A-15 liofilizadas	66

I. INTRODUCCION.

Durante los últimos años, el mercado cosmético ha ido cambiando debido a las exigencias del consumidor que ha puesto sus preferencias en los productos naturales que son muy codiciados por su seguridad, eficacia y rendimiento. A pesar de que a últimas fechas el entusiasmo por ciertos productos se ha perdido (e.g. jojoba, sábila) el interés en otros nuevos se ha incrementado (Chavez, 1995). Así mismo, y a la par de esta tendencia se encuentra aquella en la que al consumidor se le ofrecen productos derivados de nuevas tecnologías (Jellineck, 1987).

El uso de células como agentes acarreadores de activos se dio por primera vez en la década de los 80's con Ihier (1983) y Zimmerman (1976), que trabajaron independientemente con entrocitos. Estos cuidadosamente preparados, al tener un tiempo prolongado de circulación en el organismo y por que se ha demostrado que se pueden cargar con activos, los hace una plataforma idónea para su liberación con un perfil de liberación prolongado dentro del organismo (Donbrow 1992, Juliano 1987).

Las microalgas, son microorganismos que fueron utilizados por diversas culturas antiguas como la romana o la azteca para su consumo e para la producción de otros alimentos (Kubo, 1990). Su estudio sistemático se dio apenas a principios del siglo XX (Raymond, 1961). A mediados del presente se planteó la posibilidad de utilizarlas en el campo de la eliminación de contaminantes ambientales (Traveso, 1996) y como productores de metabolitos de interés para la industria química, alimenticia, farmacéutica y cosmética (Arredondo, 1991; Cysevski, 1992; De Roeck 1993). Por la revisión bibliométrica que para este documento se llevó a cabo, se puede decir que las microalgas pueden ser usadas sobre la piel pues son inocuas, permiten encapsular activos cosméticos actuando como microvesículas y pueden aportar a la piel sustancias con propiedades cosméticas (azúcares, vitaminas, aminoácidos, etc.). Además de que previamente han sido explotadas para la producción de químicos finos y excipientes para la industria química cosmética y farmacéutica (colorantes (Parson, 1961; Ben-Amotz, 1980), ácidos grasos (Dubinsky, 1978; Prato, 1985); glicerol (Ben-Amotz, 1980), vitaminas liposolubles (Jayasirre, 1985), etc.).

Por lo anterior y aprovechando la permeabilidad que presentan las membranas de los organismos unicelulares hacia ciertas moléculas, con el presente trabajo se pretende demostrar la utilización de células de microalgas como acarreadores naturales inocuos de un activo cosmético y proponerlas para su incorporación a formulaciones en sustitución de microcápsulas preparadas con polímeros biodegradables o no biodegradables.

II. OBJETIVO GENERAL.

Mostrar la utilidad de las células de la microalga *Scenedesmus obliquus* CDBB-A-15 como agentes acarreadores de activos cosméticos.

ACTIVIDADES A DESARROLLAR

Obtener biomasa de *Scenedesmus obliquus*

Determinar la composición química de la biomasa obtenida y mostrar su utilidad cosmética

Mostrar la inocuidad de la biomasa cuando se aplica tópicamente.

Determinar el potencial de *S. obliquus* como acarreador de un agente humectante (glicerol).

Determinar el perfil del glicerol contenido en las células.

III. GENERALIDADES:

3 1 GENERALIDADES SOBRE LA PIEL.

La tecnología del cuidado de la piel es extensa y difiere de la desarrollada para cualquier otro tipo de cosméticos debido a las características funcionales de varios de sus productos. Existen algunos que principalmente tienen efectos únicamente cosméticos mientras que otros tienen un efecto marcadamente farmacológico. Sin embargo, todos los productos cosméticos están diseñados para interactuar y tratar al más extenso órgano del cuerpo: la piel (Schmitt y Williams, 1992).

3.1 1 ANATOMIA Y FISIOLÓGIA

En la actualidad, y después de estudios específicos se consideró a la piel como un órgano que se extiende sobre la superficie del cuerpo en una lámina fina y extensa (Quiroga, 1986). Su ubicación y condición bifronte lo convierte en un órgano frontera, por lo tanto, tiene diversas funciones, incluyendo la de barrera protectora a la entrada de microorganismos infecciosos y contra las radiaciones solares, así como del control de la temperatura corporal, y la transmisión de estímulos desde su intrincada red nerviosa (Schmitt y Williams, 1992). Para entender completamente su anatomía y fisiología la figura 9 muestra un corte longitudinal de la piel que se empleará como referencia en el presente documento. La piel se encuentra dividida en las siguientes secciones:



Figura 1 Corte longitudinal de la piel que muestra la epidermis (I), la dermis (II), la hipodermis (III), el estrato córneo (1), estrato granuloso (2a), estrato espinoso (2b), estrato basal (2c), folículo piloso (3), glándula sebácea (4), glándula sudorípara eccrina (5) y la raíz del pelo (6) (Schmitt y Williams, 1992).

3 1.2 EPIDERMIS.

La epidermis esta formada por varias capas y varia en superficie, topografia y grosor (Schmitt y Williams, 1992) Carece de vasos sanguineos y esta formada por celulas epiteliales de tipo queratinocito. Su observacion microscopica permite distinguir en ella los estratos que a continuacion se describen (Quiroga, 1986)

3 1 2.1 ESTRATO CORNEO.

La capa mas superficial de la epidermis es el estrato córneo. Esta es la capa visible, y en la cual los estudios cosmeticos centran su atencion. Su estructura consiste en alrededor de 15 a 20 capas de celulas engrosadas (queratinocitos) que se descaman conforme migran hacia la superficie. Estas celulas se distinguen de las demas pues no contienen nucleo o contenido celular, y aunque estan muertas, tiene una funcion definida, la de proteger las capas interiores (Schmitt y Williams, 1992)

3 1 2 2 ESTRATO GRANULOSO.

La siguiente capa en la epidermis es el estrato granuloso o capa granulosa. Conforme las celulas migran hacia arriba, estas forman los granulos caracteristicos de esta capa (Schmitt y Williams, 1992)

3 1 2.3 ESTRATO ESPINOSO

Se encuentra debajo del estrato granuloso, tambien se le conoce como capa espinosa y se caracteriza por una apanencia espinosa y presencia de desmosomas. En esta area se forman los lipidos intracelulares que mantienen unidas a las celulas, y que son expulsados entre las celulas del estrato corneo conforme migran hacia la superficie. Dichos lipidos son similares al sebo excepto por la ausencia de ésteres de ceras y escualeno, asi como por la presencia de ceramidas (Schmitt y Williams, 1992).

3.1.2.4 ESTRATO BASAL

Es la capa mas interna de la epidermis y tambien se le conoce como estrato germinativo. Esta en contacto con la dermis y es en ella donde las celulas

epidérmicas se originan por la formación de queratinocitos, lo cual las diferencia conforme migran hacia la superficie. También produce las células de Langerhans. El ciclo completo de formación, diferenciación, migración y exfoliación desde el estrato basal hasta la pérdida de células en el estrato córneo, toma de 40 a 75 días en contraste con el ciclo del estrato córneo que es cerca de una tercera parte del total de la epidermis (Schmitt y Williams, 1992).

3.1.3 DERMIS.

Por debajo de la epidermis está la dermis, constituida por una trama fibrosa y compleja (Quiroga, 1982). La epidermis es dependiente de la dermis pues ésta es la fuente de nutrición. La dermis es un tejido conectivo que provee un sistema de soporte para la epidermis. Toda la sangre de la piel, nervios, linfa y estructuras externas, como los folículos pilosos con glándulas sebáceas, glándulas eccrinas y apocrinas, están ancladas en la dermis (Schmitt y Williams, 1992).

3.1.3.1 FIBROBLASTOS, COLÁGENO Y ELASTINA

La dermis tiene un componente fibroso compuesto por varios materiales. El primero de estos es el colágeno, con la menor cantidad de elastina y las menores proporciones de otros componentes fibrosos. La fuente de estos materiales fibrosos son los fibroblastos, los cuales son las células que abundan en la dermis.

3.1.3.2 CÉLULAS ARBOLADAS.

El segundo lugar en tamaño de las células de la piel está ocupado por las células arboladas. Son de naturaleza granular y hay mayor cantidad en donde hay capilares. Estas células participan en la liberación de enzimas y materiales para controlar la función o respuesta a los daños externos (Schmitt y Williams, 1992).

3.1.3.3 FOLÍCULOS PILOSOS Y GLÁNDULAS SEBACEAS.

La combinación de pelos, folículos, y la presencia de glándulas sebáceas es conocido como el sistema pilosebáceo. El folículo piloso está formado por tejido epidérmico que se extiende dentro de la dermis para cubrir con sus necesidades biológicas, en donde éste obtiene su fuente de nutrición y tiene el acoplamiento con los

músculos erectores pilosos. Este músculo puede mover el pelo en respuesta a señales tales como el frío, calor o emocionales

En general, una glándula sebacea es asociada a un folículo piloso. Estas forman y secretan sebo, una mezcla única de materiales lipídicos, que no se encuentra en ninguna otra parte del cuerpo. El sebo contiene triglicéridos, ácidos grasos, ésteres grasos, escualeno y ésteres de colesterol. Las glándulas sebáceas, cuando están activas, producen una secreción continua sin dañar las condiciones de la piel y el cabello (Schmitt y Williams, 1992)

3.1.3.4 GLÁNDULAS SUDORÍPARAS

Existen dos tipos de glándulas sudoríparas en el hombre. Las que más comúnmente se encuentran son las glándulas sudoríparas ecninas y son las que se encargan de controlar la temperatura del cuerpo. Se extienden desde la epidermis hasta la dermis y allí, están rodeadas por vasos sanguíneos. El sudor secretado por las glándulas ecninas es relativamente bajo en sólidos, constituido principalmente de cloruro de potasio.

Las glándulas apocninas, por su parte, se encuentran principalmente bajo los brazos y se asocian con el sexo del individuo. Estas glándulas son mucho más largas que las ecninas aunque se originan en la dermis. El sudor producido por ellas, está constituido de grandes cantidades de sólidos de naturaleza más compleja, es viscoso, lechoso y contiene grandes concentraciones de proteínas, además de colesterol, esteroides y otros lípidos (Schmitt y Williams, 1992)

3.1.3.5 EL COLOR.

El color de la piel y el cabello es debido principalmente a la presencia de cuerpos pigmentados conocidos como melanina. La melanina es producida por células melanocitos que se encuentran en el estrato basal. Los melanocitos, están presentes en la capa basal en gran cantidad y su número no difiere notablemente de individuo a individuo o en gente con más o menos color sobre su piel. La melanina puede ser producida en color amarillo/rojo o negro/café, además el color de la piel es determinado por la concentración y tipo de melanina producida. Uno de los factores que influyen en la

producción de melanina es la exposición a la luz solar y juega un papel importante en la protección de la piel contra ella (Schmitt y Williams, 1992)

3.2 LAS ALGAS.

Las algas son un grupo de organismos fotosintéticos que miden desde algunas micras (microalgas) hasta varios metros (macroalgas). Se cree que existen alrededor de 30 000 especies distintas de microalgas en la tierra (Arredondo, 1991). Se les puede encontrar prácticamente en cualquier hábitat pues soportan cambios drásticos de temperatura, salinidad y gases disueltos en el medio (Round, 1981). Las microalgas verdes son capaces de convertir compuestos inorgánicos en compuestos orgánicos por medio de la fotosíntesis, al igual que cualquier otro organismo que la pueda llevar a cabo (Behrens, 1993; Burlew, 1976).

Aun cuando los aztecas consumían biomasa de algas (Paniagua, 1994) y los romanos las empleaban como fertilizantes en agricultura (Kubo, 1990), el interés por las microalgas surgió en los años cincuenta y setenta al considerarseles una nueva fuente de proteína para la alimentación humana (Ben-Amotz, 1990). En los setentas el enfoque se tornó hacia el desarrollo de metodologías para el tratamiento de aguas de desecho. Posteriormente, se plantearon como un recurso viable para el proceso de bioconversión energética, o como fuente de obtención de sustancias químicas finas (Arredondo, 1991) y se planteó la posibilidad de utilizarlas en cosmetología (Nowak, 1985). En la tabla I se observa el costo de algunos de los productos obtenidos por el cultivo masivo de microalgas.

Entre las ventajas que presentan estos cultivos sobre otros microorganismos, están:

Su capacidad fotosintética para convertir la energía solar en biomasa. En condiciones favorables de crecimiento, los cultivos de microalgas pueden producir de 20 a 35 veces más proteína que la soya y 50 veces más que el arroz, trigo o maíz, considerando una misma área de cultivo, Tabla II,

Las microalgas se pueden cultivar y cosechar durante todo el año, aun en regiones andas y utilizando agua que no se emplea en la agricultura tradicional

El agua empleada para los cultivos de algas puede utilizarse posteriormente para irrigacion (Arredondo, 1991)

Tabla I Productos obtenidos del cultivo masivo de microalgas, y su valor comercial (Arredondo, 1991)

Producto	Usos	Valor aproximado*	Mercado aproximado*	Alga
Compuestos isotopicos	Medicina	> \$ 1 000	Pequeño	Variado
Ficobiliproteinas	investigacion investigacion Colorante para alimentos	>\$10 000	Pequeño	Roja
Farmacuticos	Anticancerigenos Antibioticos	Desconocido Muy alto	Desconocido	Azul-verdes
Vitaminas C y E	Vitaminas	C ~\$10 E ~\$50	Mediano	Verdes
b-Caroteno	Complemento alimenticio Colorante para alimentos	> \$ 500 \$ 300	Pequeño Mediano	Verdes
Aminoácidos	Prolina Arginina Acido aspártico	\$5-60 \$50-100 \$2-5	Grande	Verdes Azul-verdes

*Tamaño del mercado: Pequeño 1-10 mdd; mediano 10-100mdd; Grande >100 mdd (mdd miles de dolares americanos)

Las productores de materias primas para la industria alimenticia, farmaceutica y cosmetica mostraron un interes especial en la produccion de microalgas luego de que se demostrara que el cambio en los parametros de cultivo como la presencia de luz y su intensidad, la composicion del medio de cultivo, la temperatura, y el pH incrementaba significativamente la cantidad del metabolito de interes (Arredondo 1991). Por ello las aplicaciones comerciales se extendieron mas alla de la produccion de ácidos grasos, pigmentos o reactivos para diagnostico, incluyendo su cultivo para el tratamiento de aguas residuales y la remocion de metales pesados (Benemman, 1992) produccion de pigmentos (Borowitzka, 1988) y vitaminas (Newton, 1977), sustitutos de diesel (Nagle, 1990), etc Se pueden obtener compuestos de calidad farmaceutica dependiendo del control del proceso y de la esterilidad observada durante la fermentación (Barclay, 1993). En la figura 1 se presentan las posibles aplicaciones

biotecnológicas del cultivo de microalgas y su interrelación en los diferentes procesos (Arredondo, 1991).

Tabla II Rendimiento de un cultivo de microalgas comparado con el de otros cultivos (Arredondo, 1991)

Cultivos	Biomasa seca total (ton·ha·año)
Microalgas*	13.00
Maíz	2.02
Betabel	1.6-4.2
Tiño	0.8
Caña de azúcar	8.10

*Cultivo a cielo abierto

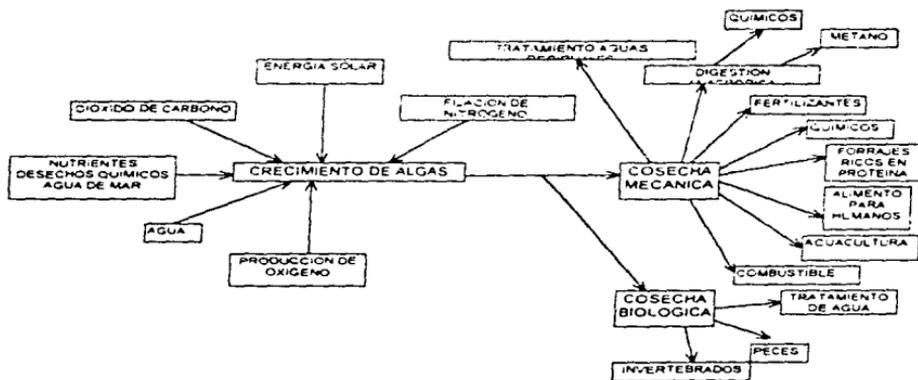


Figura 2. Aplicaciones biotecnológicas del cultivo de microalgas (Arredondo, 1991)

3.3 CULTIVO.

El objetivo de los cultivos de algas es producir continuamente una cantidad máxima de células a partir de un inóculo. Por lo tanto, al buscar un medio inorgánico que pueda producir células con determinadas características, es importante saber como las variaciones en los componentes del medio de cultivo pueden afectar la cantidad y calidad de las células producidas.

Los factores que influyen sobre el ambiente de las microalgas incluyen factores físicos y químicos. Los factores físicos, son la luz, que es la fuente de energía, y la temperatura, que se mantiene según los requerimientos del microorganismo en cuestión. Los factores químicos, son las materias primas necesarias que permiten la síntesis estructural y protoplásmica y que se encuentran en solución acuosa (Burlew, 1976).

3.3.1 MEDIO DE CULTIVO

Las sales inorgánicas se deben suministrar en forma de solución estable para el buen desarrollo del microorganismo (Raymond, 1951). La mayor parte de ellas son modificaciones de formulaciones previamente publicadas, algunas derivan de los análisis químicos efectuados al agua del hábitat natural del microorganismo en cuestión, y pocas son el resultado de estudios detallados de los requerimientos nutricionales del organismo. Dentro de las recomendaciones hechas para el desarrollo de formulaciones de medio de cultivo se encuentran las siguientes:

La concentración total de sal, depende necesariamente del origen ecológico del organismo.

La formulación debe contener en su mayor parte iones de potasio, magnesio, sodio, calcio, sulfato y fosfato.

La(s) fuente(s) de nitrógeno más ampliamente usada(s) son: nitratos, amonio y urea, cuyo uso depende de su asimilación por el organismo y el pH del medio. Se debe tomar en cuenta que el crecimiento depende en gran medida de la disponibilidad de nitrógeno que haya en el medio.

La fuente de carbono más ampliamente usada es el CO₂, en una mezcla con aire del 0.1 al 0.5%, y además se puede emplear bicarbonato.

El pH del medio de cultivo generalmente es ácido para evitar la precipitación de sales de calcio, magnesio y algunos elementos traza. Para promover el crecimiento se pueden agregar vitaminas (Borowitzka, 1988).

3.3.2 EFECTO DEL pH

El efecto del pH del medio en el que se desarrollan las microalgas puede tener varias repercusiones sobre sus procesos biológicos. Las algas exhiben una clara dependencia del pH del medio de cultivo y esta difiere de especie a especie. La distribución relativa de las especies de carbono (CO_2 , HCO_3^- , CO_3^{2-}) en el medio, está determinada por el pH como se aprecia en la figura 2. El efecto tóxico o la inhibición del crecimiento que presentan algunos elementos de la formulación pueden evitarse controlando el pH (Burlow, 1976).

3.3.3 FUENTES DE CARBONO

La fuente más común es el gas carbónico, pero se pueden agregar fuentes orgánicas de carbono para mantener la síntesis celular completa y continuada en la oscuridad (Raymond, 1961). Se ha demostrado que cantidades de CO_2 del 0.1 al 0.5 % disueltas en el medio de cultivo, son suficientes para mantener una fotosíntesis óptima. Dependiendo del pH inicial del medio de cultivo, un burbujeo constante de aire puede proveer CO_2 libre al medio, en la cantidad necesaria para el cultivo (Burlow, 1976).

3.3.4 FUENTES DE NITRÓGENO

Entre las microalgas la capacidad para utilizar iones nitrato (NO_3^-), nitrato (NO_2^-) o amonio (NH_4^+) parece ser algo generalizado (Razánka, 1983). Cuando se utiliza amonio como única fuente de nitrógeno, el pH del medio puede bajar rápidamente provocando efectos secundarios indeseables, pues se puede inhibir el crecimiento por las altas concentraciones de amonio. Los nitratos, también pueden servir como única fuente de nitrógeno para varias especies de algas, pero sólo a bajas concentraciones, pues en concentraciones elevadas se inhibe el crecimiento. Además de las sales

inorgánicas de nitrógeno. algunas especies pueden utilizar compuestos orgánicos como únicas fuentes (Burlew, 1976).

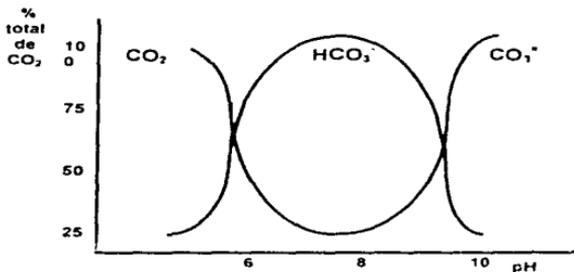


Figura 3 Cantidad máxima de dióxido de carbono presente en el medio de cultivo en sus tres formas, ácido carbónico libre (CO₂ y H₂CO₃), iones bicarbonato y carbonato como una función del pH de la solución (Burlew, 1976).

3.3.5 ILUMINACIÓN Y TEMPERATURA.

Para el cultivo de microalgas en el laboratorio, se recomienda el uso de lámparas fluorescentes de luz fría, pues el uso de lámparas incandescentes o luz solar directa, promueven un incremento en la temperatura superior a los 10°C. (Borowitzka-Borowitzka, 1988). La calidad del espectro de luz que utilizan las algas para su fotosíntesis y desarrollo, está definida por la absorción de luz por las clorofilas y pigmentos secundarios. Al escoger el tipo de iluminación artificial, se debe considerar la eficiencia, la intensidad y la calidad del espectro que proporciona. Además los cambios en la calidad de la incidencia luminosa puede tener un profundo efecto sobre los procesos metabólicos, y, en ello se basa la producción de varios metabolitos de interés (Razanka, 1983).

Se sabe que a algunas algas les puede tomar un amplio lapso de tiempo el adaptarse a variaciones en la cantidad de luz suministrada. Algunas especies de algas

no poseen la capacidad de adaptarse a la intensidad de luz y llegan a morir rápidamente, cuando se exponen a variaciones mínimas. Por lo tanto estas especies no son recomendables para producir biomasa (Rázanka, 1983)

En varias algas el desarrollo es función de la temperatura. Cada especie de alga tiene una temperatura óptima característica. La mayoría, son organismos cuya temperatura de desarrollo es relativamente baja y la óptima es menor a 30°C. Por lo tanto el rendimiento máximo de un cultivo se obtiene cuando la temperatura empleada es la óptima para la especie de alga cultivada (Cysewski, 1992). Además, la temperatura puede también afectar el metabolismo, los requerimientos nutricionales y la composición química de la biomasa (Rázanka, 1983)

3.3.6 ORGANISMOS CONTAMINANTES DEL CULTIVO

Las técnicas de cultivo puro no se aplican a los cultivos en gran escala a cielo abierto aunque se pueden llevar a cabo. Cuando esto se requiere, el desarrollo de bacterias y mohos en el medio de cultivo debe ser siempre menor comparado con el del alga, sin embargo cuando la contaminación por bacterias, mohos, protozoos y/o rotíferos es muy aguda, estos pueden llegar a destruir el cultivo (Raymond, 1961)

3.4 METODOS DE EVALUACION DEL DESARROLLO DE LA BIOMASA

Una vez que se inocularon los recipientes de cultivo, se debe llevar a cabo el registro del crecimiento para identificar la etapa de mayor densidad de microalgas, la cual indica el momento apropiado para cosecharlas. Esta etapa, también señala que el cultivo debe transferirse a un volumen mayor de medio de cultivo o diluirse si el recipiente tiene volumen disponible (Paniagua, 1994). El parámetro (e.g. densidad celular, determinación de clorofila) para monitorear el crecimiento de las algas se debe seleccionar cuidadosamente (Raymond, 1961). En el desarrollo de las microalgas se denotan las siguientes fases:

Fase de inducción: Es el periodo en el cual las células se adaptan al medio donde se inocularon y en el que no hay reproducción. Esta fase puede durar de 1 a 3 días, dependiendo del tamaño y estado del inóculo.

Fase exponencial: Una vez que las células se adaptaron al medio, la densidad de las microalgas aumenta en forma exponencial. Esta fase puede presentarse del segundo al tercer día después de inoculado el medio y prolongarse hasta el cuarto día.

Fase de declinamiento del crecimiento: En esta fase que puede durar de 1 a 2 días, empieza a manifestarse una disminución en la velocidad de reproducción de las células, debido a condiciones desfavorables (e.g. disminución en la cantidad de luz o nutrimentos) en el cultivo generadas en la fase anterior. Al final de esta fase la densidad del cultivo alcanza su máximo valor y permanece estacionaria, pero en algunos casos puede presentarse en su lugar la fase de muerte.

Fase de muerte: Al incrementarse el número de células muertas, las condiciones desfavorables, producto de la destrucción celular generan el colapso final del inoculo. En la figura 3 se muestra el patrón ideal de estas fases en un cultivo por lote (Paniagua, 1994).

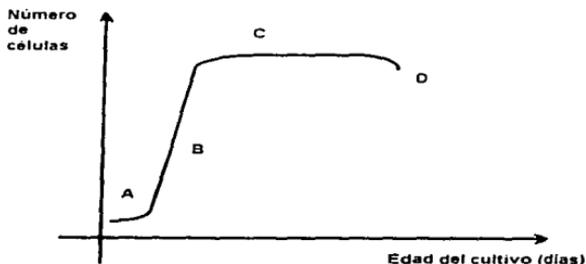


Figura 4 Curva de crecimiento ideal de microalgas en un cultivo de volumen limitado. A. Fase de inducción, B Fase de crecimiento exponencial, C. Fase estacionaria, D. Fase de muerte (Paniagua, 1994).

Una vez calculada la densidad de microalgas en tiempos sucesivos, se pueden describir las características de crecimiento del cultivo, utilizando la ecuación siguiente:

$$B_t = B_{t_0} e^{\mu t}$$

donde:

B_p = Biomasa (numero de celulas, peso seco, etc) al tiempo t_p .

B_{t_0} = Biomasa medida al tiempo t_0 .

e = Base de logaritmos naturales.

μ = tasa de crecimiento.

t = Intervalo de tiempo (horas, días) entre observaciones= $t_p - t_0$.

resolviendo para μ :

$$\mu = \frac{\ln(B_p/B_{t_0})}{t_p - t_0}$$

de esta formula se puede obtener el tiempo de duplicacion de la biomasa para un intervalo de tiempo considerado

$$t_d = \frac{\ln(2B/B)}{\mu} = \frac{\ln 2}{\mu}$$

3.4.1 RENDIMIENTO

Si consideramos un cultivo la produccion de celulas es la medida del rendimiento total, el cual se expresa como la cantidad de celulas producidas por unidad de volumen o por superficie de cultivo

3.4.2 DENSIDAD CELULAR

La concentracion celular se puede evaluar de varias maneras. El número celular puede obtenerse contando las celulas en un hematocitómetro. El volumen celular (mililitros de celula por litro) se obtiene centrifugando a volumen constante en tubos graduados una alicuota del cultivo (Raymond, 1961). El peso celular, (gramos de celulas por litro) se obtiene centrifugando una alicuota del cultivo, lavando las celulas con agua, pasandolas con la minima cantidad de agua a un cnsol tarado y desecandolas a 110° C, hasta peso constante. Entre vanos otros metodos semejantes a estos (Paniagua, 1989).

3.5 SISTEMAS DE CULTIVO.

3.5.1 CULTIVO EN LOTE.

En un cultivo en lote, no se remueve medio de cultivo con celulas ni se agregan soluciones de nutrimentos frescas durante el periodo de incubación. Esto quiere

decir que un cultivo en lote, puede soportar la multiplicación celular por un tiempo limitado, debido a la disminución progresiva de los componentes del medio y de la cantidad de luz que entra hasta el seno del cultivo como consecuencia del aumento en la densidad celular (Raymond, 1961)

3.5.1.1 CULTIVO EN LOTE SINCRONIZADO

Estos cultivos se utilizan para estudiar los patrones de crecimiento de las células cultivadas. Los cultivos sincronizados se pueden obtener por inducción de sincronía del ciclo de crecimiento, por repetición de las condiciones nutrimentales o ambientales que prevalecen, o por separación física de las células y un subsecuente reclutamiento de aquellas que se encuentran en el mismo estadio del ciclo celular.

3.5.2 CULTIVO CONTINUO (SISTEMA ABIERTO)

Este sistema se diferencia del cultivo en lote en que el suplemento de nutrientes se lleva a cabo de manera continua, es decir, agregándolos en la misma proporción en la que es retirado por lo que el volumen del sistema permanece constante. Esto, en teoría, permite que el cultivo se mantenga en crecimiento exponencial. Estos tipos de cultivo se pueden llevar a cabo por diferentes modos, entre ellos:

3.5.2.1 QUIMIOSTATO

El sistema de quimiostato consiste en un reservorio que contiene el medio de cultivo fresco, una bomba y el matraz de cultivo a volumen constante. El medio de cultivo abandona el matraz en la misma proporción en la que se agrega medio fresco. El cultivo debe estar mezclado homogéneamente lo que se consigue con flujo de aire, o por el uso de un agitador mecánico o magnético (Raymond, 1961).

3.5.2.2 CULTIVO SEMICONTINUO

Los cultivos semicontinuos son un tipo de cultivo en lote el cual se diluye a intervalos frecuentes. La concentración de biomasa se monitorea para estimar la frecuencia de dilución y el nivel de dilución (Raymond, 1961).

3.5.2.3 CULTIVO EN TURBIDOSTATO

Este tipo de cultivo depende de un monitoreo continuo de la biomasa por un medio optico que mide la turbidez y controla la tasa de dilucion, manteniendo el cultivo a una densidad optica definida. En este modo de cultivo los nutrimentos nunca son limitantes del crecimiento y la luz puede llegar a serlo a menos que el cultivo este muy diluido.

3.6 APLICACIONES

El cultivo de algas es factible si la produccion ofrece ventajas economicas (Paniagua, 1994). La produccion de algas se emplea, entre otras cosas para la alimentacion del hombre, de animales o para la obtencion de sustancias organicas especiales (Rios, 1994). Sobre la agricultura ordinaria hay varias ventajas potenciales: hay un mayor rendimiento de la produccion por hectarea cultivada; la temporada de cultivo puede ser ilimitada; se pueden producir grandes cantidades de proteinas, grasas y vitaminas con el minimo desperdicio de fibra cruda; por ultimo puede llevarse a cabo un mayor control posible del cultivo (Burlew, 1976).

La produccion de compuestos intra y extracelulares por medio de microorganismos es un hecho bien establecido actualmente. Estas sustancias desempeñan un papel importante en el crecimiento y desarrollo de las microalgas asi como en la cadena alimentaria y ecosistema acuatico natural (Markowitz, 1985).

Dentro de las areas de aplicacion actual de las microalgas se encuentra de manera importante la produccion de sustancias quimicas naturales (Jayasree, 1985). Actualmente existe especial interes en ciertas especies de algas como fuente para la obtencion industrial de productos de alto valor comercial como glicerol (Borowitzka, 1988), pigmentos (Borowitzka-Borowitzka, 1988) y lipidos (Dubynski, 1978).

Algunas algas se caracterizan por tener una elevada proporción de lipidos, que puede ir del 30% hasta el 80% en peso seco, dentro de los que se encuentran triacilgliceroles, esteroides, ceras, fosfolipidos, glicolipidos e hidrocarburos entre otros (Arredondo, 1992).

Los principales pigmentos de la mayoría de las algas son las clorofilas verdes y los carotenoides amarillos, rojos y anaranjados que constituyen del 0.5 al 5 % en peso seco de la célula (Payer, 1980). El β -caroteno o provitamina A es un constituyente común de la fracción carotenoides de las algas. Aunque de manera general constituye menos del 1 % del peso celular seco, puede llegar aun a niveles tales como el 10% en ciertas especies (Fried, 1981).

Las algas son una fuente importante de casi todas las vitaminas. Se han llevado a cabo estudios sobre el contenido de vitaminas en microalgas de agua dulce (Dubinsky, 1978) y en las marinas (Jayasree, 1986), y se han encontrado vitaminas del complejo B (Burlaw, 1976), ácido fólico, ácido ascórbico, colina, inositol, tocoferol (E) y ergotocóferol (Rios, 1994) entre otras.

Así mismo, las microalgas producen una gran variedad de productos de reserva (almidón, *cnosolaminana*, paramilón, glucógeno) y reguladores del crecimiento (glicerol, manitol, sorbitol). Los carbohidratos constituyen una fuente potencial como sustratos importantes para las fermentaciones microbianas y en el área de alimentos (Borowitzka-Borowitzka, 1988).

Actualmente, existe la tendencia de llevar a cabo el análisis químico de las microalgas por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) y por Cromatografía de Gases (CG), como técnicas estándar, dada su sensibilidad y especificidad, para la determinación cualitativa y cuantitativa de vitaminas, clorofilas, lípidos y carbohidratos. Los grandes avances de la tecnología en cuanto a columnas, equipo y detectores, hacen que estas técnicas sean las de elección para el desarrollo de métodos de referencia (Rios, 1994).

3.7 EL GENERO *SCENEDESMUS*

Algunos miembros de la familia Scenedesmeaceae han sido objeto de estudio en campos muy diversos, e.g. producción de biomasa para alimentación humana (Payer, 1980), producción de metabolitos de interés para la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética (hormonas (Burlaw, 1976), ácidos grasos, carbohidratos) y sobre todo en el campo de la contaminación ambiental bioindicadores (Round, 1981).

y remoción de metales pesados (Travieso, 1996)).

El género *Scenedesmus* pertenece a la familia *Scenedesmaceae*, división Chlorophycophyta (Richmond, 1986). Existen, por acuerdo, dos subgéneros, diferenciándose las especies espinosas (subgénero *Desmodesmus*) y las no espinosas (subgénero *Scenedesmus*) (Borowitzka-Borowitzka, 1988). Las especies de este género, se encuentran ampliamente distribuidas en agua dulce y el humus (Richmond, 1986).

Las células del género *Scenedesmus* son unicelulares de forma cilíndrica, con terminaciones redondeadas o agudas, se agrupan lateralmente en paquetes de 4 a 8 miembros y raramente de 16. Algunas especies poseen organelos especiales para provocar flotación (Richmond, 1986). En la figura 4 se aprecia un dibujo de células de *Scenedesmus* cepa D3.

En el género *Scenedesmus*, las diferencias fisiológicas son pequeñas. En la tabla III se resumen las características bioquímicas y fisiológicas de 7 especies diferentes de *Scenedesmus*:

La presencia de la enzima hidrogenasa permite suponer que todos los miembros del género *Scenedesmus* spp. son capaces, en presencia de luz, de liberar H_2 a bajas presiones parciales de O_2 e H_2 , y reducir CO_2 con H_2 y H_2S o donadores de hidrógeno orgánicos. En la oscuridad pueden producir H_2 y CO_2 a expensas de sustancias orgánicas oxidando H_2 con O_2 , y/o por el empleo de H_2 para la reducción de nitratos o nitritos.

La deficiencia al suministrar nitrógeno, fósforo o hierro, en el medio de cultivo puede inducir la formación de carotenoides secundarios (astaxantina, cantaxantina).

La licuefacción de la gelatina indica la liberación de proteasas extracelulares.

La hidrólisis de almidón muestra la liberación potencial de amilasas extracelulares.

La tolerancia al ácido, medida bajo condiciones estándar de Kessler, es relativamente baja.

La escasa tolerancia a las sales minerales confirma que las cepas de *Scenedesmus* son organismos de agua dulce

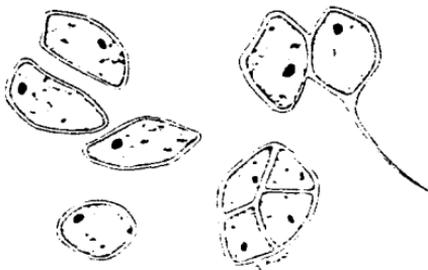


Figura 5 Dibujo de células de *S. obliquus* O3 (Burlew, 1976).

En las diferentes cepas, la respuesta al estrés térmico no es uniforme, lo que se atribuye a la especificidad de familia y no constituye un criterio para la diferenciación de las especies.

Las cepas del subgénero *Scenedesmus* poseen paredes celulares multilaminares. La pared interior contiene celulosa embebida en una matriz de hemicelulosa, mientras que la pared exterior, esta formada por compuestos de degradación del politerpeno, esporopolenina. En la figura 6 se aprecia el modelo propuesto para la pared celular de *S. maximus*.

La propagación de las células de *Scenedesmus* se lleva a cabo por cenobios, aunque también se da la reproducción por gametos biflagelados (e.g. *S. obliquus*). Antes de que se lleve a cabo la liberación celular, la capa más interna de celulosa se disuelve. El compuesto sintetizado inicialmente por la célula hija es el de la capa de esporopolenina, simultáneamente a la producción de la capa de celulosa que

Tabla III Características bioquímicas y fisiológicas de 7 especies de *Scenedesmus* (Richmond, 1986)

	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>S. communis</i> Hegew	-	+	+	+	5.0	0	52	1
<i>S. komarekii</i> (Hegew)	+	+	+	-	4.0	1	54	1
<i>S. armatus</i> Chod	+	+	+	-	5.0	1	55	2
<i>S. armatus</i> vars	+	+	+	+	5.5	1	55	4
<i>S. acutiformis</i> vars.	+	+	+	+	4.0	0	55	2
<i>S. obliquus</i> Schröd.	+	+	+	+(-) ^a	4.0	1	58	16
<i>S. bicellulans</i> (Turp) Kütz	+	+	+	-	4.0	1	61	1

1. actividad hidrogenasa, 2. carotenoides secundarios, 3. licuefacción de la gelatina, 4. Hidrólisis de almidón; 5. Tolerancia al medio ácido a un límite de pH, 6. Tolerancia a las sales (porcentaje de cloruro de sodio), 7. Composición de bases de ADN (% G+C), y 8. Número de cepas estudiadas

a. Esta propiedad no se observa en algunos casos.

comienza antes de la liberación de las células hijas. Con la ruptura de la capa remanente de esporopolenina de la célula madre, la cenobia hija se libera. Luego, comienza a fase de crecimiento, en donde se engrosa la capa de celulosa. El ciclo completo dura 24 horas o menos en condiciones de laboratorio, mientras que en condiciones menos favorables puede durar hasta 48 horas o más (Borowitzka-Borowitzka, 1988). Este proceso se describe en la figura 6.

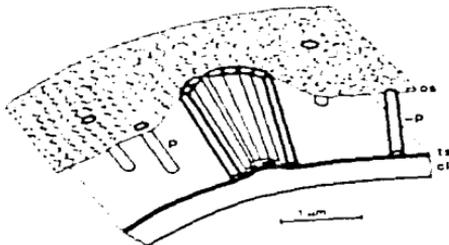


Figura 6 Modelo propuesto de la pared celular de *S. maximus*. Cl: capa de celulosa; ts: capa de esporopolenina intralaminar; os: capa superficial de esporopolenina con una estructura neta; p: soportes. En el centro se encuentra una sección (apertura apical) en cuya base hay protuberancias, de las cuales emergen grupos de estructuras de naturaleza proteica (30-100µm de longitud) (Borowitzka-Borowitzka, 1988).

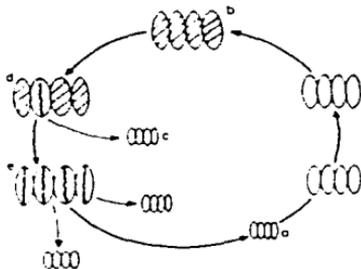


Figura 7 Ciclo reproductor de *Scenedesmus* sp. Las colonias jóvenes crecen (a) durante la fase de adaptación cuando han madurado (b), cada protoplasto se divide en dos. La nueva colonia (c) se libera de la célula madre (d). Rápidamente las células madre han liberado 4 colonias celulares. La pared celular de las colonias madre se mantiene en ellas (e) (Richmond, 1986)

3.6.1 REQUERIMIENTOS NUTRITIVOS Y MEDIO DE CULTIVO

Scenedesmus obliquus es un organismo que crece sin problemas en casi cualquier medio mineral para microalgas de agua dulce. En la tabla IV se enlistan distintas formulaciones recomendadas para *Scenedesmus* sp., las cuales se pueden utilizar también para otras especies.

Debido a la baja concentración de N y P, el medio de Bourrelly restringe la producción de biomasa a cantidades menores a 0.1g de biomasa seca por litro en cultivos en lote. El medio N8 es representativo de una solución mineral convencional diseñada para cultivos en lote. La concentración de algunos de los macroelementos es inusualmente alta. Esto provoca una pérdida de las capacidades celulares para expresar su potencial morfogénético en el sentido clásico del polimorfismo, sino que puede implicar también una reducción en el crecimiento, pero un incremento en la acumulación de sustancias orgánicas extracelulares (Borowitzka-Borowitzka, 1988).

Tabla IV Formulaciones de medios de cultivo salinos recomendados para crecimiento de *Scenedesmus* (Borowitzka-Borowitzka, 1988)

Elementos principales	Bourelly	Bristol mod	N8	Gons 1977	Fingermut	Lusse 1985
KNO ₃	200	-	1000	-	-	24
NaNO ₃	-	(250)	-	-	-	-
Urea	-	88.3	-	100	-	-
CaCl ₂	-	-	-	43	-	-
CaCl ₂ ·2H ₂ O	-	25	10	-	10	38
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	30	-	-	-	-	-
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	-	-	260	-	-	38
NaHCO ₃	-	-	-	-	-	34
Na ₂ CO ₃	-	-	-	20	-	-
Na acetato 3H ₂ O	-	-	-	-	2487	-
NaCl	-	25	-	-	-	-
KCl	-	-	-	25	-	-
KHCO ₃	-	-	-	-	-	9
K ₂ HPO ₄	40	75	-	50	-	-
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	-	-	-	-	75	-
KH ₂ PO ₄	-	175	740	-	-	0.7
MgSO ₄ ·7H ₂ O	30	75	50	50	50	64
NH ₄ Cl	-	-	-	-	400	-
FeCl ₃ ·6H ₂ O	1.5	-	-	-	-	0.5
FeEDTA	-	10	10	-	10	-
Na ₂ EDTA	-	-	-	4	-	-
NH ₄ Fe(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	-	-	-	5	-	-
H ₂ SO ₄ (0.2M, ml ⁻¹)	-	-	-	-	-	1.9
Extracto de soya ml/l)	10	-	-	-	-	-
pH	7.2	6.3	6.1	7	7.0	7

a. Ingredientes en mg/ml excepto donde se muestra.

3.7.2 CULTIVO MASIVO DE *Scenedesmus* sp

Uno de los cultivos a cielo abierto de *Scenedesmus* mas exitosos se practicó en Perú. Este se llevó a cabo con una cepa de *S. acutus* var *altmans* Nr 276-3a en una planta piloto en Casa Grande, localizada en Trujillo (Richmond, 1986).

La planta piloto está equipada con vanos estanques que en total cubren un área de 100 m² agitadas por paletas circulares. Las algas se cosecharon por centrifugación continua en un desecador de tambor (Richmond, 1986)

En esta planta se llevaron a cabo estudios acerca de la influencia de factores como incidencia de luz y temperatura sobre el crecimiento del cultivo. Se observó que en invierno declinaba la producción de *Scenedesmus* lo que se asocio inicialmente a la disminución en la temperatura, aunque el decremento en el número de

horas de luz debió haber ejercido también un efecto negativo sobre éste. Las cantidades de biomasa producidas en los meses de verano, indicaron que bajo ciertas condiciones, se obtenían hasta 25 g/m²/día que es equivalente a aproximadamente 90 tons de biomasa seca por año, con un contenido de 50 % de proteína por hectárea por año (Richmond, 1986)

3.7.3 COMPOSICION QUIMICA

La biomasa seca de *Scenedesmus* producida al aire libre tiene un contenido de proteína cruda del 50-56%. En la tabla V se muestra la composición química de *S. obliquus* reportada por diferentes autores. El patrón de aminoácidos en *Scenedesmus* SAG 276-3a le confiere un valor proteico elevado, el cual es muy favorable para la nutrición del hombre y animales monogástricos.

También se han encontrado constituyentes menores en la composición química de *Scenedesmus*, en Buigana se detectó la presencia de hidrocarburos volátiles, que son de interés comercial en la industria cosmética. Además de n-parafinas (de n-dodecano a n-octocosano), alcoholes de cadena larga (n-decanol a n-tetracosanol), farnesol, alcohol fenilético, monoterpenos, α - y β -pineno, limoneno entre muchos otros compuestos que se han aislado e identificado. Se ha reportado también la presencia de los monosacáridos: manosa, galactosa, glucosa, xilosa, rhamnosa, arabinosa y ácido galacturónico en hidrolizados de *S. obliquus*.

El contenido de ácidos grasos totales en *Scenedesmus* es del 5 % de la masa seca, de los cuales del 70-80% corresponden a ácidos grasos insaturados o poliinsaturados. Como en las plantas superiores, *Scenedesmus* produce terpenoides incluyendo sesquiterpenos, los cuales constituyen del 1-5 % de la biomasa seca. Los esteroides mayores que se encuentran en *S. obliquus* son Ponferasterol, ergost-5-enol y clionasterol.

Tabla V Composición química de *Scenedesmus obliquus* producido independientemente por Cairo, Dortmund y Mysore (Borowitzka-Borowitzka, 1988).

A. Composición total (% masa seca)	Cairo	Dortmund	Mysore
Proteína cruda	50-54	50-56	45-55
Lípidos	7-9	12-14	8-12
Carbohidratos	11-15	10-17	10-15
Fibra cruda	7-13	3-10	5-12
Cenizas	6-18	6-10	6-12
Humedad	5-6	4-8	5-10

B. Resultados de análisis para ciertos compuestos	Cairo	Dortmund	Mysore
N total	8.3	8.5	8.3
N total no protéico	nd	nd	1.05
Lisina disponible	nd	nd	3.66
RNA	nd	2-4	4.40
DNA	nd	1-2	1.60
Calcio	nd	0.2	0.85
Fósforo	nd	1.9	1.00
Sodio	nd	0.03	0.04
Magnesio	nd	0.5	0.30
Hierro	nd	0.3	0.30
Potasio	nd	1.0	1.02

C. Vitaminas (mg/Kg biomasa seca)	Cairo	Dortmund	Mysore
Tiamina	nd	1.7	8.2
Riboflavina	nd	4.0	36.6
Clorhidrato de piridoxina	nd	nd	2.5
Cobalamina	nd	0.4	0.44
Biotina	nd	0.2	0.2
b-Caroteno	nd	1000	230
Ácido fólico	nd	nd	0.7
Ácido nicotínico	nd	120	120
d-Ca-pantotenato	nd	15	16.5
Ácido ascórbico	nd	nd	20
Tocoferol	nd	140	nd

3.8 LAS ALGAS Y LOS COSMETICOS.

En lo referente al uso de algas y microalgas en cosmetología se mencionan varios puntos, pues han sido propuestas para estos fines varias de las familias hasta hoy estudiadas (Nowak, 1985). En los reportes bibliográficos encontrados, se menciona que ambas se han planteado para la producción de químicos finos (colorantes (Payer, 1980), ácidos grasos (DeRoeck, 1993; Prato, 1985), glicerol, vitaminas liposolubles (A, D y E) (Yih, 1992; Servel, 1994)), así como para la producción

de excipientes (Markowitz, 1985, Parson, 1961) en la preparación de geles (Morck, 1991), lociones humectantes y shampoos (De Gouvea, 1980).

3.8.1 EL EFECTO COSMETICO DE LOS EXTRACTOS DE MICROALGAS:

El efecto cosmético que presentan los extractos de algunas algas se atribuye a la presencia de grandes cantidades de azúcares raros (manitol, arabinosa), aminoácidos, vitaminas, elementos traza, sales minerales, etc. Estos extractos, se utilizan en preparaciones cosméticas como agentes humectantes ya que contienen complejos de polisacáridos-aminoácidos, que actúan como esponjas biológicas. Las membranas mucilaginosas de ácido alginico, proveen un efecto protector. En preparaciones antiseborreicas y preparados contra el acné, se emplean extractos de algas por el efecto germicida y astringente que presentan algunas de ellas. Además, con las algas se pueden obtener efectos antiedad por la rehidratación, el efecto reafirmante y la tonificación que promueven sobre la piel. Por último, también se menciona que los extractos de algas ejercen buenos resultados contra la obesidad y la celulitis (Nowak, 1925).

3.9 COSMETICOS. UNA BREVE HISTORIA.

Los cosméticos, han sustentado su desarrollo en la necesidad de la población por tener un buen aspecto (Munyan, 1991). Durante los últimos años el mercado cosmético ha venido cambiando debido a las exigencias del consumidor que ha puesto su preferencia en los productos naturales (Chávez, 1995). De éstos, los extractos vegetales son los más codiciados por su seguridad, eficacia y rendimiento. Sin embargo, su utilización ha sido empírica y su uso se ha transmitido sólo de generación en generación. A pesar de que a últimas fechas el entusiasmo por ciertos productos se ha perdido, (e.g sábila, jojoba), el interés en nuevos productos naturales para la preparación de formulaciones con fines cosméticos se ha incrementado (Lueng, 1989).

Durante el renacimiento, Florencia, Milán y Roma se convirtieron en las capitales del arte y la moda e introdujeron los conceptos clásicos de los nuevos estándares de la perfumería y cosmética de la época. Lucrecia Borgia y Catalina de Medicis, impusieron como moda el uso de emplastes para combatir las arrugas, el uso del polveado para acentuar la palidez, y el uso de perfumes entre otras cosas. Así mismo la reina Ana de Austria usó cremas preparadas de aceites importados como vainilla, cacao y pasta de almendras, para aclarar la piel. En esta época, la cosmética se divorció de la farmacia para convertirse en un arte y algunas de las pocimas con fines cosméticos de este periodo fueron desarrolladas por alquimistas, como Guiseppe Balsamo y Saint Germain, que clamaban haber encontrado el secreto de la eterna juventud (Spellios, 1984).

La perfumería empezó a tener auge a principios del siglo XII gracias al rey Carlos V. En este periodo se cimentaron las bases de la perfumería, por primera vez en Europa se establecieron los grandes plantíos de rosas y flores para comercializarlos después como aceites esenciales y los aceites tropicales importados de Martinica, se empezaron a usar ampliamente como fragancias (Spellios, 1984).

En Francia los cosméticos para hombres y mujeres, encontraron terreno fértil durante el reinado de Enrique III y durante el reinado de Luis XIV, la moda francesa halló su punto máximo. París y la Corte de Versalles se convirtieron en el centro de la moda en cuanto a vestidos, cosméticos, perfumería, costumbres y moral se refiere. Su máxima aportación fue el uso de pelucas, tanto en hombres como en mujeres, lo que a su vez trajo consigo el desarrollo del polvo cosmético. Probablemente el primero y más utilizado fue el denominado "polvo violeta", preparado con flores de iris y polvo perfumado. Otro polvo creado durante el periodo barroco, fue el preparado con arroz, el cual se hervía en agua,

se secaba al sol y se molía hasta obtener una polvo muy fino que se coloreaba y se teñía de rosa (Spellios, 1984).

En el año de 1700 el uso de perfumes se acentuó para cubrir principalmente los malos olores de la gente que no se aseaba (Spellios, May 1984). De entre los aceites esenciales más utilizados para perfumarse, se encuentran el aceite de rosas, limón, violeta, jazmín, cítricos, bergamota, almizcle Costumbres que luego de la sucesión del rey no cambiaron (Spellios, Dec.1984)

Por su parte las naciones indias americanas desarrollaron una serie de elementos decorativos y agentes protectores de la piel. En la preparación de los elementos decorativos para la piel los indios se apoyaron principalmente en colorantes extraídos de frutas, ballas o productos de origen mineral. Estos, casi siempre se aplicaban con fines ceremoniales, lo que se llamó "la pintura guerrera"; combinada con penachos y otros aditamentos hoy denominados alhajas. Los indios Pwanis, Sioux, Comanche y Araphoe de la Gran Planicie americana, aplicaban grasas animales sobre su piel para protegerla de los fríos extremos, lo que fue aprovechado posteriormente para desarrollar lo que actualmente conocemos como base para maquillaje. Irónicamente, estos aditamentos eran aplicados más comúnmente en los hombres que en las mujeres. También se menciona que en las praderas y los puertos, las mujeres desarrollaron una preparación cosmética elaborada con carbón en polvo, raíz de betabel, y jugo de pétalos de rosa para colorear los labios u olores para proteger la piel del rostro contra la resequedad provocada por el viento(Spellios, Dic 1984).

En 1900 el óxido de zinc comenzó a utilizarse como base para polvos y ya se había adoptado para las formulaciones de talcos. En la década de los 50's en los Estados Unidos se inició el uso de aceite de macassar y grasa de oso como fijador para el cabello (Spellios, Dec. 1984).

El floreciente colonialismo británico, español, portugués, holandés, alemán, belga, francés, e incluso italiano sobre América y Asia durante el siglo XIX, propició la introducción de numerosas fragancias y otros materiales a la cultura occidental. Los perfumeros franceses comenzaron a utilizar aceites de mimosa, clavo, ylang-ylang, canela, sándalo, pachouli, canana, pimienta y almizcle. Estos últimos, fueron los primeros fijadores empleados en perfumería aún a pesar de su fuerte olor (Spellios, Dec. 1984)

Occidente ha demostrado un creciente interés por los cosméticos orientales, esto se debe probablemente al empleo de materias primas animales, vegetales y minerales para su preparación. En este aspecto, China es una de las pocas culturas que tiene mejor documentada esta parte de sus tradiciones, pues existen documentos en los que se describen preparados dermatológicos que datan del siglo XI a.C., algunas de las cuales siguen usándose. En general, se puede decir que la mayor parte de las formulaciones, que en occidente se conocen como cosméticas, en la tradición oriental tienen una connotación farmacéutica. La última encuesta realizada en China, permitió estimar que se encuentran en uso al menos 5000 hierbas simples y posiblemente 100 000 formulaciones en las que se utilizan al menos dos fármacos naturales para el tratamiento de enfermedades (Lueng, 1989)

En un periodo de aproximadamente 35 años, de 1945 a 1980, los cosméticos y sobre todo los enfocados al tratamiento de la piel exhibieron una marcada expansión íntimamente ligada al crecimiento de la población (Katz y Hotch, 1986). El reemplazo de los principios activos químicamente sintetizados, por los biológicos es una de las últimas tendencias de la industria cosmética (Munyan, Sept. 1991). Así mismo y a la par de esta tendencia, se encuentra aquélla en la que al consumidor se le ofrecen productos como derivados de la

tecnología actual, entre los que se encuentran los productos con microcápsulas, liposomas, parches transdérmicos etc.

3.10 LA LIBERACION DE PRINCIPIOS ACTIVOS

En la industria farmacéutica, se han aplicado un gran número de polímeros que se emplean como acarreadores de activos, y que a su vez han encontrado un sinnúmero de usos en la industria cosmética. Se pueden mencionar, entre otros polímeros sintéticos, liposomas microcápsulas o nanopartículas, y aunque en farmacia se emplean células, en la literatura no se han encontrado reportes de su uso como tales para fines cosméticos (Ríos, 1994).

Los efectos de un fármaco o de un cosmético en el organismo son el resultado de la acción de éste sobre la superficie o el seno de células u órganos blanco (Juliano, 1980). Por lo tanto, la liberación del cosmético y su subsecuente absorción está influenciada por las propiedades fisicoquímicas del activo y del sistema de liberación, así como de las características fisiológicas y fisicoquímicas del sistema biológico (Martín, 1983).

En los sistemas tradicionales de administración de principios activos, se observan fluctuaciones de concentración (Chien 1982), las cuales, inicialmente exceden los niveles terapéuticos recomendables y luego declinan gradualmente hasta niveles no terapéuticos (Juliano, 1980). La magnitud de estas fluctuaciones depende de los rangos de absorción, distribución, eliminación e intervalos de dosificación (Chien, 1982).

En un sistema de liberación prolongado, la liberación del activo se lleva a cabo durante un tiempo prolongado, mientras que un sistema de liberación sostenido involucra además de ello, reproducibilidad y predictibilidad en la cinética de liberación (Chien, 1982). Por ello no se observan fluctuaciones de

concentración del principio activo en el medio, como se muestra en la figura 8. Dentro de los factores fisicoquímicos que se deben de tomar en cuenta en un sistema de liberación de acción controlada o sostenida se encuentran la concentración del fármaco, la solubilidad, tamaño molecular, forma cristalina, unión a proteínas y pKa. Además, la liberación del principio activo a través de un sistema de liberación involucra factores como difusión y disolución (Martín, 1983).

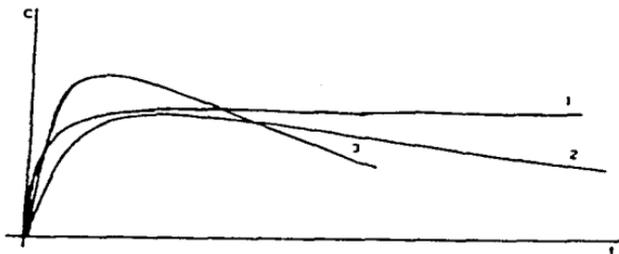


Figura 8 Perfiles de concentración de activo para sistemas convencionales de liberación. 1. sistema de liberación controlado de orden cero. 2. Sistema de liberación sostenida. 3 Sistema convencional (tableta o cápsula) (Chien, 1982).

3.11 DEFINICION DEL PROCESO DE DIFUSION:

La difusión se define como el proceso de transferencia de masa de moléculas individuales de una sustancia, donadas por un movimiento al azar y asociado a un gradiente de concentración.

3.11.1 PRIMERA LEY DE FICK SOBRE DIFUSION:

El flujo J , se define como la cantidad de materia M , que pasa a través de una unidad de área de barrera, S , en una unidad de tiempo:

$$J = \frac{dM}{S \cdot dt} \quad (1)$$

El cual, es proporcional al gradiente de concentración que se está llevando a cabo:

$$J = -D \frac{dc}{dx} \quad (2)$$

La constante de difusión, D, no se mantiene constante pues puede cambiar en concentraciones altas además, puede variar con la temperatura, presión, propiedades de los solventes y la naturaleza química del soluto difundido (Burnette, 1987).

3.11 2 SEGUNDA LEY DE FICK SOBRE DIFUSION

La ecuación de transporte de masa que define el cambio de concentración con respecto al tiempo en un lugar definido se conoce como la segunda ley de Fick. La concentración del soluto difusor en el solvente cambia con el tiempo $\Delta C/\Delta t$, como el flujo o la cantidad difundida cambia con respecto a la distancia $\Delta x/\Delta x$, en la dirección x o

$$\frac{\partial \cdot C}{\partial \cdot t} = \frac{\partial \cdot J}{\partial \cdot x} \quad (3)$$

Diferenciando la ecuación de la primera ley de Fick (2) con respecto a x se obtiene:

$$\frac{\partial \cdot J}{\partial \cdot t} = \frac{\partial^2 C}{\partial \cdot x^2} \quad (4)$$

Sustituyendo dC/dt de la ecuación (3) en (4), se obtiene la ecuación de la segunda ley de Fick:

$$\frac{\partial \cdot C}{\partial \cdot t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial \cdot x^2} \quad (5)$$

La segunda ley de Fick menciona que el cambio de concentración con respecto al tiempo en una región dada es proporcional al cambio en el gradiente de concentración en ese punto del sistema (Burnette, 1987).

Considerando un estado de equilibrio en la ecuación 5 y tomando en cuenta que un soluto difusor está disuelto en el solvente del lado izquierdo en la figura 9, y solvente puro en el lado derecho, dicho soluto comenzará a difundir hacia el lado derecho. En experimentos de difusión, la solución en el compartimiento receptor se remueve constantemente y se agrega solvente fresco para mantener la concentración al más bajo nivel. Estas condiciones son conocidas como condiciones "sink", en donde el compartimiento de la izquierda es la fuente que suministra el soluto y el de la derecha el lugar donde se lleva a cabo la difusión. Cuando el sistema se ha mantenido el tiempo suficiente, las concentraciones de soluto difusor se mantienen constantes en ambos lados del sistema respecto al tiempo (Burnette, 1987).

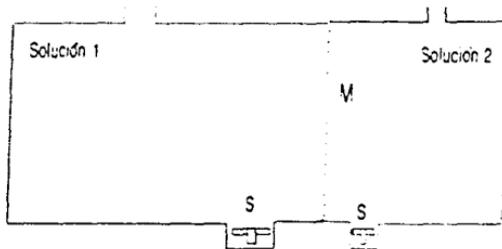


Figura 9. Figura descriptiva de una celda para experimentos de difusión. M membrana, S Agitadores (Burnette, 1987).

Continuando con la deducción, con cada corte difusional perpendicular a la dirección de flujo, el rango en el cambio de concentraciones, dC/dt , será cero, y por la segunda ley:

$$\frac{dK}{dt} = D \frac{d^2C}{dx^2} = 0 \quad (6)$$

en donde C es la concentración del permeante en la barrera expresado en masa/cm³. La ecuación 6 muestra que cuando D no es igual a cero, la segunda derivada de C respecto a x es igual a cero por lo tanto no hay cambio en dC/dx . Lo que quiere decir que el gradiente de concentración a través de la membrana (dC/dx) es constante, es decir, hay una relación lineal entre la concentración, C, y la distancia x (Burnette, 1987)

Ahora considerando que existe una area de contacto, S, y un grosor, h, y que las concentraciones en el lado izquierdo y el derecho son diferentes, C_1 y C_2 respectivamente, la ecuacion de la primera ley de Fick se escribe asi

$$J = \frac{dM}{Sdt} = D \frac{C_1 - C_2}{h} \quad (7)$$

en donde $(C_1 - C_2)/h$ aproxima dC/dx

Las concentraciones C_1 y C_2 se pueden reemplazar por el coeficiente de partici3n multiplicado por la concentraci3n C_d del lado del donador o C_r en el lado receptor como sigue. El coeficiente de partici3n, K esta dado por:

$$K = \frac{C_1}{C_d} = \frac{C_2}{C_r} \quad (8)$$

por lo tanto:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{DSK(C_d - C_r)}{h} \quad (9a)$$

y si las condiciones "sink" se mantienen en el compartimiento receptor, $C_r=0$,

$$\frac{dM}{dt} = \frac{DSK^2 C_d}{h} = PSC_d \quad (9b)$$

en donde:

$$P = \frac{DK}{h} \text{ (cm}^2 \text{/seg)} \quad (10)$$

Cuando no es posible determinar D, K o h independientemente pero si medir la permeaci3n de la barrera, el area de la superficie (S), la concentraci3n en la fase de donaci3n (C_d) y el monto de permeante (M) en el receptor "sink" se puede obtener P de la pendiente del gr3fico lineal M vs. t.

$$M = PSC_d t \quad (12a)$$

manteniendo C_d constante respecto al tiempo. Si C_d cambia apreciablemente con el tiempo, se obtiene que $C_d = M_d/V_d$, la concentraci3n del soluto en la fase donadora

dividido por el volumen de la fase donadora, y posteriormente obtener P desde la pendiente del gráfico de $\log C_d$ vs t, entonces:

$$\log C_d - \log C_d(0) = -\frac{PS}{2.303V_d}t \quad (12b)$$

el flujo J de la ecuación 7 es ahora proporcional al gradiente de actividad termodinámica más que al de concentración (Burnette, 1987)

3 11 3 MODELOS MATEMATICOS PROPUESTOS POR HIGUCHI Y PEPPAS PARA EL ESTUDIO DE LA LIBERACION DE ACTIVOS

Para poder explicar el proceso de liberación de los fármacos contenidos en matrices poliméricas, Peppas desarrolló una ecuación semiempírica, la cual tiene gran aplicación en el análisis de los sistemas de liberación controlada, siempre y cuando se conserven condiciones "sink" durante el proceso (Peppas, 1985). La ecuación de Peppas se define como

$$M_t = M_{\infty} k t^n$$

en donde:

M_t = Cantidad liberada a un tiempo t

M_{∞} = Cantidad liberada al tiempo final.

M/M_{∞} = Fracción de liberada activo.

k = Constante que involucra las características estructurales y geométricas de la matriz de liberación.

n = Indica el mecanismo de liberación del fármaco.

Así mismo, Higuchi (Higuchi, 1963) estudió la velocidad de liberación de activos dispersos en una matriz inerte. Este modelo supone que primero se disolverá la capa más superficial el activo al entrar en contacto con el medio de disolución y posteriormente empezará a agotarse la siguiente capa, que pasará al medio por disolución y difusión a través de la matriz; de esta manera, la interfase entre la región que contienen al activo disuelto y la que contiene al activo disperso, se desplazará hacia el interior como un frente. También supone que la hidratación relativa se verá disminuida.

cuando el grosor de la capa de penetración aumente, ahora bien, si la velocidad de hidratación de la matriz, es menor que la de disolución del activo contenido, la liberación obedecerá al modelo de la raíz cuadrada de Higuchi. Esta ecuación se puede emplear si

- El fármaco se encuentra distribuido homogéneamente en la base.
- Durante la liberación se mantiene un estado pseudoestable.
- El coeficiente de difusión permanece constante.
- Durante todo el tiempo se mantienen condiciones "sink".
- No ocurren interacciones entre el activo y la matriz.
- Las partículas del activo presenten un diámetro más pequeño que la distancia media de difusión.
- Solamente pueda difundir el activo por la matriz y no otros componentes del vehículo, y.
- Una vez que el fármaco alcance la parte más superficial de la matriz, sea removido fácilmente, es decir que la concentración de activo en la interfase sea igual a cero

Para poder determinar la cantidad de activo que se libera en una película Higuchi (Higuchi, 1962; Higuchi, 1963) dedujo una ecuación en la cual el activo al inicio debe encontrarse uniformemente disuelto, con ello se tiene que

$$Q = \frac{mt}{a}$$

en donde:

- Q = Cantidad de activo liberado por unidad de área expuesta.
- m = Cantidad de activo liberado.
- a = unidad de área expuesta.
- t = Raíz cuadrada del tiempo transcurrido después de la aplicación.

3.12 PLATAFORMAS DE LIBERACION DE PRINCIPIOS ACTIVOS EMPLEADOS EN FARMACIA Y QUIMICA COSMETICA

Son cientos los sistemas que hasta hoy han tenido auge dentro de la industria farmaceutica y cosmetica para la liberacion de activos de manera prolongada, por lo tanto, a manera de ejemplo, por ser los que mas nos interesan, aqui solo hablaremos de algunos de ellos, sobre como actúan, de que estan preparados y algunos de sus usos:

3.12.1 MICROCAPSULAS Y NANOPARTICULAS

Dada la necesidad de eliminar picos y valles de biodisponibilidad de principios activos como emolientes, humectantes, vitaminas y protectores solares, en productos cosmeticos se emplearon las nanoparticulas (Ábrutyn, 1992)

Las microcapsulas son solidos coloidales de un tamaño que va de 1 a 1000 nm (1µm). Estan hechas de materia macromolecular (polimeros) y pueden ser utilizadas terapéuticamente por si mismas como adyuvantes en vacunas o como acarreadores de principios activos donde este se disuelve, encapsula o absorbe (Lewis, 1992).

Entre sus características mas importantes podemos mencionar que:

Los sistemas polimericos de liberacion controlada estan diseñados seleccionando monómeros especificos lo que les da como característica principal el poder de absorber, y consecuentemente liberar activos de un modo controlado, aprovechando las características fisico-quimicas del lugar donde se depositan, asi como las características del activo en si (Katz y Hotch, 1986).

Todos los polimeros con los que están fabricadas las microesferas son inertes lo que les permite ser compatibles con la mayoría de los activos cosmeticos (Panson, 1993).

Estas esponjas microscopicas pueden contener una cantidad de ingrediente activo igual a su propio peso (Foss, 1986)

El sistema polimerico puede proteger activos sensibles a alguno de los componentes de la formulacion o agentes fisicos y aún asi liberario hacia la piel de un modo controlado (Abrutyn, 1992)

Es por ello que la industria cosmetica ha estado muy activa en su estudio pues las microesponjas o nanosferas, pueden convertir liquidos en solidos, facilitar la dispersión, incrementar las propiedades de flujo e incrementar la estabilidad quimica y fisica de los compuestos adsorbidos en ellas (Katz y Hotch, 1986)

3 12 2 LIPOSOMAS

Al principio de los años 60's Bangham y col observaron que los fosfolipidos se dispersaban en agua formando vesiculas de capa multiple Ellos mostraron que cada una de ellas era una membrana lipidica bimolecular y que cada capa encerraba compartimientos acuosos internos Estos modelos de membranas celulares se convirtieron en herramientas populares para bioquimicos, fisiologos, y más recientemente para científicos relacionados con la terapia farmaceutica o cosmetica (Juliano, 1987)

Los liposomas se preparan a partir de fosfolipidos con la posible adición de esteroleos, glicolipidos, acidos o bases organicas, macromoleculas semejantes a las de las membranas celulares y polimeros sinteticos. Las propiedades fisicas de los liposomas se pueden vanar en funcion de la carga superficial de la particula y en terminos de fluidez de la membrana del liposoma Por lo tanto la seleccion de los constituyentes quimicos puede influenciar la carga, estabilidad, reactividad quimica y propiedades biológicas de la preparacion liposomal (Juliano, 1987)

Los liposomas, asi como las membranas bicapa planas, se han utilizado ampliamente en el estudio del denominado "transporte" de antibioticos como valinomicina, gramacina y nistatina. Sin embargo, de entre los usos más importantes que se han dado hasta hoy a los liposomas está el de su uso potencial como sistemas terapéuticos de liberación en farmacia y cosmetica (Juliano, 1987).

3.12.3 CELULAS ACARREADORAS:

En la década pasada Ilier (1983) Zimmerman (1976) de manera independiente, sugirieron que células de eritrocitos podrían ser utilizadas como acarreadores de fármacos. Además, mencionaron varias ventajas al utilizar una de las células propias del organismo. Los eritrocitos cuidadosamente preparados, pueden tener tiempos prolongados de circulación en el organismo y por lo tanto servir como depósitos ambulantes de fármacos. El volumen interno relativamente grande de los eritrocitos, comparado con otros sistemas acarreadores microparticulados, podría albergar grandes cantidades de fármaco para ser transportado (Juliano, 1987; Lewis, 1992).

Ello derivó en el desarrollo de dos métodos básicos para llevar a cabo el cargado de los eritrocitos. Uno de ellos, desarrollado por Zimmerman (1976), involucra la lisis celular con la ayuda de un campo eléctrico, seguido por un proceso de "reseñado" por incubación a 37°C. Cuando este proceso se lleva a cabo en presencia del activo, una fracción de este queda atrapado en el interior de la célula. El otro proceso, desarrollado por Ilier (1983), involucra la interacción de las células con soluciones tampón cuando estas al estar en contacto con el tampón alcanzan un volumen de 1.6 veces el original, se forman canales o poros en la membrana de aproximadamente 2 a 500 Å de diámetro. Cuando, en presencia de un catión bivalente, se restaura la isotonicidad y además se incubó a 37°C, los poros se cierran permitiendo que una porción del soluto externo quede atrapada en la célula (Juliano, 1987).

IV. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 MATERIALES Y EQUIPO

Cámara de Newbauer.
Microscopio óptico.
Garrafrones Pyrex 10L.
Liofilizador Bendix Westinghouse
Centrifuga continua Delaval Gyrotester.
Centrifuga Beckman J2-21
Equipo de destilación Soxhlet
Microscopio electrónico Jeol JSM 24-II.
Fine Ion Coat Sputter JFC 110
Incubadora New Brunswick Scientific Mod. G-76.
Balanza analítica Ohaus
Balanza Ohaus-Micro
Equipo de filtración Millipore a presión reducida.
Autoclave.
Equipo de ultrasonido Astrason
Cámara para deshidratación a punto crítico Sandri 780 A.

Cromatógrafo de líquidos.

Bomba de líquidos *Thermo Separation Products Constametric 3500*.
Detector de UV de longitud variable *Thermo Separation Products*.
Detector de índice de refracción *Vanar RI-4*.
Integrador *Chrom Jet 4400*
Válvula de inyección *Rheodyne*
Columna Sphensorb C8 5 μ m 250 x 4.6 mm.
Columna Phenomenex Rhexex Organic Acids 300 x 7.8 mm.

Cromatógrafo de Gases:

Cromatógrafo de gases Tracor 570.
Detector de ionización de flama.
Integrador Perkin Elmer Nelson 1020.

4 2 REACTIVOS:

Nitrato de potasio (GR).
Sulfato de magnesio (GR)
Fosfato monobásico de potasio (GR)
Fosfato dibásico de potasio (GR)
Cloruro de sodio (GR)
Cloruro de calcio (GR)
Sulfato férrico (GR)
Acido sulfúrico (GR)
Agar bacteriológico
Cloroformo (GR)
Metanol (GR).
Eter (GR).
Hidroxido de potasio (GR).
Acetato de vitamina A (SR).
Ergotocofeol (SR)
Vitamina E (SR)
 β -caroteno (SR)
Fosfatidil colina (SR).
Cianohidroxicobalamina (SR)
Acido nicotínico (SR).
Niacinamida (SR).
Acido pantoténico (SR).
Piridoxina (SR).
Riboflavina (SR).
Tiamina (SR).
Acido ascórbico (SR).
Glicerol (SR).

GR Grado reactivo.

SR Estándar de referencia.

4.3 MATERIAL BIOLÓGICO:

Microalga *Scenedesmus obliquus* cepa CDBB-A-15.

6 conejos machos raza Nueva Zelanda de 2.5-3.5 Kg

4.4 METODOS

4.4.1 DIAGRAMA DE FLUJO DE LA PARTE EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos planteados en este trabajo se propuso el esquema de trabajo que se muestra en la figura 10

4.5 MEDIOS DE CULTIVO

4.5.1 MEDIO DE CONSERVACION DE LA CEPA

En la tabla VI se encuentra la formulación del medio de cultivo Bristol modificado empleado para el cultivo de *S. obliquus*. Los componentes de la formulación se agregaron en el orden mencionado y posteriormente se esterilizó en autoclave a 15 lb. por 15 min y 121 °C

4.5.2 MEDIO DE CRECIMIENTO

El medio de cultivo empleado para llevar a cabo la producción de la biomasa fue el mismo medio líquido que el empleado para el mantenimiento de la cepa.

4.6 EXPERIMENTOS A NIVEL DE MATRAZ FERNBACH.

4.6.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *S. obliquus*.

A partir de cultivos mantenidos en medio sólido durante 7 días, se inocularon matraces Fernbach de 2.8 L de capacidad total con 1L de medio líquido. Los matraces fueron incubados a 28 ± 2 °C y 2800 luxes, con agitación promovida por burbujeo de aire, por 6 días. Se tomó 1 mL de medio a intervalos de 24 h y se realizó conteo celular en cámara de Neubauer. La experiencia se llevó a cabo por triplicado.

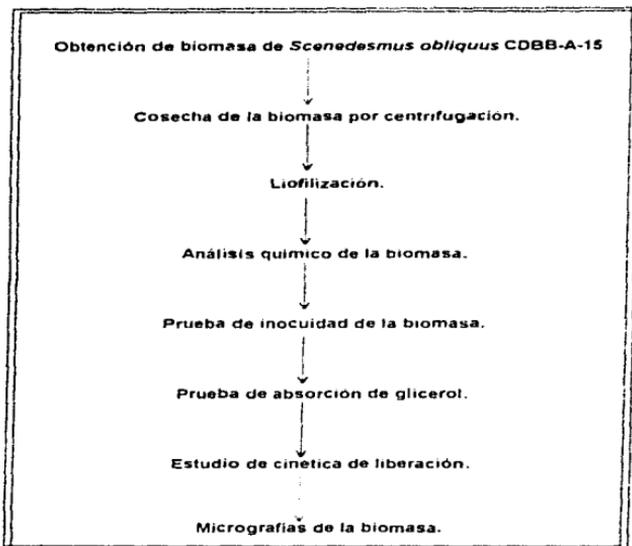


Figura 10 Diagrama de flujo de la parte experimental.

4.7 OBTENCIÓN DE LA BIOMASA DE *S. obliquus*.

4.7.1 PREPARACIÓN DEL INOCULO

La cepa mantenida en medio sólido se transfirió a matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio de cultivo Bristol modificado líquido. Los inóculos se incubaron a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, con lámparas de luz fría a 2800 luxes, con agitación rotatoria, por 6

días. Luego de ello se transfirieron a matraces Fernbach de 2.8 L de capacidad con 1 L de medio líquido fresco.

4.7.2 PRODUCCION DE LA BIOMASA

Se inocularon garrafones Pyrex de 25 L de capacidad con 10 L de medio Bristol modificado y se incubaron por 6 días a 28 ± 2°C, con lámparas de luz fría a 2800 luxes, con agitación promovida por burbujeo de aire

Tabla VI Formulación del medio de cultivo Bristol modificado

Compuesto	Concentración (g/l)
Nitrato de potasio	0.25
Sulfato de magnesio	0.075
Fosfato monobásico de potasio	0.075
Fosfato dibásico de potasio	0.175
Cloruro de sodio	0.525
Cloruro de calcio	0.01
Solución férrica*	1 ml

*Solución férrica: 1 gramo de sulfato férrico se disuelve en la mínima cantidad de agua y se agrega 1 ml de ácido sulfúrico concentrado la solución se afora a 500 mL.

El medio sólido se preparó agregando 2% (p/v) de agar bacteriológico al medio líquido.

4.7.3 COSECHA DE LA BIOMASA

La separación de la biomasa se llevó a cabo por centrifugación continua a 3000 r.p.m. Posteriormente, el paquete celular se lavó con agua destilada y se centrifugó a 3000 r.p.m. por 15 min. La torta celular se resuspendió en la mínima cantidad de agua destilada y se preparó para liofilización

4.7.4 LIOFILIZACION DE LA BIOMASA.

La suspensión de células se agregaron a un matraz Erlenmeyer de 250 mL, y se congelaron, se colocó en el liofilizador a -40°C y 24 plg Hg, por 8 h. Posteriormente se selló el matraz y se mantuvo en refrigeración a 4°C hasta su posterior utilización.

En la figura 11 se muestra un diagrama descriptivo del punto 4.5 al 4.7.4 para la obtención de biomasa de *S. obliquus*.

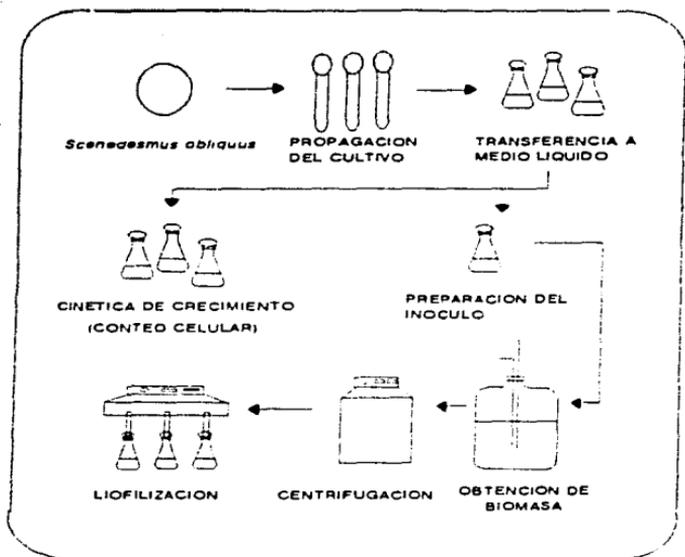


Figura 11. Diagrama de obtención de biomasa liofilizada de *S. obliquus* CDBB A 15 en medio líquido Bristol modificado con lámparas de luz fluorescente a 2800 luxes, a $27^{\circ}\text{C} \pm 2$ y agitación por burbujeo de aire.

4.8 DETERMINACIONES ANALITICAS.

4.8.1 EXTRACTO ETereo DE LA BIOMASA DE *S. obliquus*.

La extracción de grasa de la biomasa liofilizada se llevo a cabo mediante el metodo modificado de Rázanka (1983) como a continuación se describe 1 g de muestra de microalgas liofilizadas se colocaron en el interior de un equipo de extracción Soxhlet con 300 mL de una mezcla de cloroformo/metanol (2:1) y se refluxó por un lapso de 8 horas luego de las cuales el extracto se deseco y se peso

A la muestra seca se le agregaron 20 mL de cloroformo/metanol (2:1) y se filtró. Se lavo con 10 mL de la misma mezcla. Posteriormente se deseco y se agregaron 50 mL de una mezcla de metanol/eter (3:1) mas 0.5 mL de solución de hidroxido de potasio 10 N. Esta mezcla se llevo a ebullición en baño María durante dos horas manteniendo volumen constante. Posteriormente se adiciono agua en igual volumen al contenido en el matraz y se adicionaron 50 mL de mezcla etanol/agua (95:5). Se adicionaron 75 mL de eter y se extrajo tres veces. En el extracto etereo se separaron los esteroides (fracción insaponificable) y en la fase acuosa se aislaron los acidos grasos saponificados. Los cuales fueron aprovechados para llevar a cabo la determinación de vitaminas liposolubles (A, D3 y E) por CLAR y acidos grasos por CG-DIF.

4.8.2 DETERMINACION DE ACIDOS GRASOS

La muestra se analizó por CG-DIF mediante la técnica modificada de Rázanka (1983) como a continuación se describe. Se disolvió en 1 mL de hexano y se inyectaron 2 µl de ésta en el cromatografo bajo las condiciones enlistadas en la tabla VII.

4.8.3 DETERMINACION DE VITAMINAS LIPOSOLUBLES

La muestra se analizó por CLAR-UV para la determinación de vitamina A, D3 y E mediante la técnica modificada de Vanhaalen-Fastre como a continuación se describe. Se disolvió en 5 ml de fase móvil y se inyectó en el equipo de CLAR-UV. Dada la naturaleza química de las vitaminas determinadas, se utilizaron dos fases móviles diferentes, cuya composición se enlista en la tabla VIII, así como la longitud de onda de máxima absorción de cada uno de los compuestos a la que fue ajustado el detector.

Tabla VII Condiciones de operacion del cromatógrafo de gases para la determinacion de la composición de acidos grasos en *S. obliquus*

Flujo	10 ml/min de Nitrogeno
Temperatura de inyector	200 °C
Temperatura de detector	250 °C
Temperatura del Horno	140°C 4 min. 6°C/min hasta 210°C

Tabla VIII Longitud de onda de maxima absorción y composición de las fases utilizadas para la determinacion de vitaminas liposolubles en *S. obliquus*

Compuesto	UV _{max} (nm)	Fase Móvil
Vitamina A	328	MeOH/H ₂ O (93/7)
Vitaminas D3	265	MeOH/ACN*(93/7)
Vitamina E	280	MeOH/ACN*(93/7)

*Acetonitrilo

4.8.4 DETERMINACION DE FOSFOLIPIDOS

La determinacion de fosfolipidos se llevo a cabo por CLAR-UV por la tecnica de Rázanka (1983) modificada. La muestra se trato como se describe en el apartado 4.8.1. Una vez obtenido el extracto, se disolvio en 1mL de fase movil y se inyectó en el cromatógrafo bajo las condiciones enlistadas en la tabla Tabla IX.

Tabla IX Condiciones de inyeccion de la muestra de la fraccion insaponificable para la determinación de fosfolipidos en *S. obliquus*

Columna	Sphensorb C8 5µm, 250 x 4.6 mm
Fase Movil	MeOH/ACN (80/20)
Flujo	0.8 mL/min
Presion	100psi

4.8.5 DETERMINACION DE β-CAROTENO

La extraccion y determinacion de β-caroteno se llevo a cabo por la tecnica modificada de Craft como a continuacion se describe. 100 mg de muestra de microalgas liofilizadas se colocaron en un matraz erlenmeyer de 125 mL y se agregaron 10 mL de metanol frio, repitiendolo tres veces. Posteriormente la muestra se centrifugo a 2000 r.p.m. por 10 min, al sobrenadante se le agregaron 30 mL de solución de cloruro de sodio al 10 % y 30 mL de eter en 3 fracciones de 10 mL cada una. El extracto etereo se desecó en atmosfera de Nitrogeno y el residuo se refrigero durante 24 h a 4°C hasta su

posterior inyección. La muestra se disolvió en 1 mL de fase móvil y se inyectó en el cromatógrafo de líquidos bajo las condiciones enlistadas la tabla X

Tabla X Condiciones de operación del cromatógrafo de líquidos empleadas para la determinación de β -caroteno en *S. obliquus*

Fase móvil	MeOH/H ₂ O/Hex (94:5:1)
Flujo	0.7 ml/min
Presión	3000 psi
Longitud de onda	445 nm

4.8.6 DETERMINACION DE VITAMINAS HIDROSOLUBLES

La extracción y determinación de las vitaminas hidrosolubles se llevó a cabo mediante la técnica modificada de Fellman (1982) como a continuación se describe. Se pesaron 100 mg biomasa liofilizada desengrasada y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL se agregaron 10 mL de solución de ácido clorhídrico 0.1 N y una gota de solución de ácido clorhídrico 12 N, se esterilizó a 121°C, 15 b 15 min en calor húmedo. Posteriormente se agregó solución de acetato de sodio hasta alcanzar un pH de 4 a 4.5 para luego agregar 10 mL de solución de takadiastasa a 3%. La muestra se incubó a 35 °C por 3 h, pasado este tiempo se agregó solución de acetato de sodio 2 N hasta alcanzar un pH de 3 a 3.5. Finalmente la muestra hidrolizada se liofilizó. Para llevar a cabo el análisis por CLAR se pasaron 200 mg del polvo y se disolvieron en 1 mL de fase móvil para inyectarla en el equipo bajo las condiciones que se enlistan en la tabla XI. La determinación de ácido ascórbico se llevó a cabo de este mismo extracto por la técnica de Kim modificada.

Tabla XI Condiciones de operación del cromatógrafo de líquidos para la determinación de vitaminas hidrosolubles en *S. obliquus*

Columna	Spherisorb C ₈ 5 μ 250 x 4.6 mm
Fase Móvil	FA*/MeOH (85:15)
Flujo	0.7 mL/min
Presión	2000 psi

* FA= Fase ácida. Compuesta por 0.941 mg Heptansulfonato de sodio, 1 mL de Trietilamina, 10 mL de ácido acético aforados en 1L de agua desionizada.

La detección se llevó a cabo en el máximo de absorción de luz UV para cada uno de los compuestos, que se enlistan en la tabla XII.

Tabla XII Longitud de onda de máxima absorción a la que se ajustó el detector de UV para la determinación de las vitaminas hidrosolubles en el extracto de *S. obliquus*

Compuesto	UV _{max} (nm)
Cianohidroxicobalamina	230
Acido Nicotínico	225
Niacinamida	262
Acido pantoténico	275
Piridoxina	290
Riboflavina	270
Tiamina	245
Acido ascorbico	245

4.9 DETERMINACION DE LA INOCUIDAD DE LA BIOMASA DE *S. obliquus*

La prueba consistió en aplicar las células liofilizadas, suspendidas en etanol, en forma aleatoria sobre el lomo previamente rasurado del conejo, dividido en 6 zonas de aplicación, considerando una intacta (I) y una exconada (E) en cada animal. Como se muestra en la figura 12.

Se rasuro el lomo del conejo, un promedio de 25 cm de longitud por 15 cm de ancho. Se marcaron 6 zonas de aplicación (3 intactas y 3 exconadas) dejando sin usar 4 cm de longitud en los extremos cercanos a la cola y a la cabeza y 3 cm entre una y otra zona de aplicación. La exconación se llevo a cabo con la ayuda de una hoja de rasurar de acero inoxidable, erosionando solamente el estrato córneo de la piel del animal sin causar lesiones de mayor profundidad.

La muestra se aplico en dosis de 0.5 mL de la suspensión celular a una concentración de 5 mg/mL, directamente sobre la piel en cuadros de 2.5 cm por lado. La aplicación de la muestra se realizo cada 24 h durante tres días consecutivos.

Las observaciones de las zonas tratadas, intactas y abrasionadas, se realizaron a 1, 24, 48, 72 y 96 horas después de la primera aplicación, evaluando entema o edema según la escala arbitraria del método de Draize modificado (Yélamo, 1984).

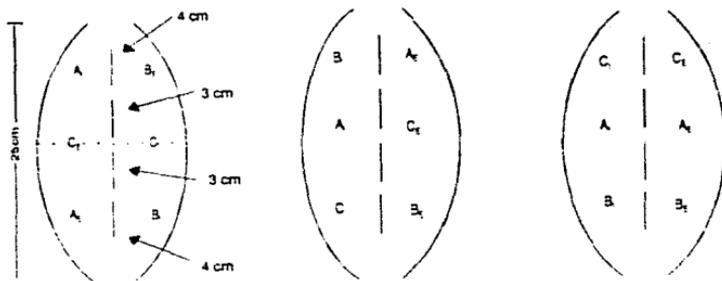


Figura 12 Superficie corporal dorsal del lomo de conejo empleado para la aplicación de la muestra de microalgas liofilizadas suspendidas en metanol para la determinación de su toxicidad (A, B, C zonas de aplicación de la muestra E Zona exconada, I zona intacta) (Yelamo, 1984)

4.10 CARGADO DE LAS CELULAS DE *S. obliquus*.

4.10.1 DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE GLICEROL ABSORBIBLE POR LAS CELULAS DE *S. obliquus* EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CLORURO DE SODIO.

Por triplicado, se pesaron 10 mg de células liofilizadas numerando viales 1, 2 y 3. Al vial 1 se le agregó 1 mL de agua destilada, al vial 2, 1 mL de solución de cloruro de sodio al 1.1% y al vial 3, 1 mL de solución de cloruro de sodio 2%. Se agitaron por 1 min y se agregó 1 mL de solución de glicerol al 70 % en agua y en soluciones de cloruro de sodio según fuera el caso (1.1 % y 2 % de cloruro de sodio) para mantener las condiciones de tonicidad que se fijaron al llevar a cabo la humectación. Luego, se colocaron los viales en la incubadora a 35°C y 100 r.p.m. por 20 min. Pasado este tiempo se filtraron las muestras en membrana Millipore de 40 µm a presión reducida, se colocaron en el medio de liberación observando las mismas condiciones de tonicidad que al principio y se colocaron nuevamente en la incubadora.

Luego de este tiempo los viales con las células se sometieron a ultrasonido por 15 min para promover la ruptura celular para posteriormente centrifugar a 2000 r p m durante 10 min. El sobrenadante se analizó por CLAR-IR. Este experimento se llevó a cabo por triplicado en dos días diferentes.

4.10.2 CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE GLICEROL ABSORBIDO POR *S. obliquus*

100 mg de células liofilizadas se pesaron y se colocaron en un vial con capacidad de 25 mL, se agregó 1 mL de agua destilada y se agitó durante 1 min. Posteriormente se agregó 1 mL de solución de glicerol al 70%, y el vial se colocó en la incubadora a 100 r p m y 35 °C. Posteriormente, las células se filtraron en membrana Millipore de 40 µm a presión reducida para colocarlas en un sobre de papel filtro Whatman No. 40 de 15 x 20 mm. Este sobre se colocó en un vial de 20 mL de capacidad con 10 mL de agua destilada. El cual se mantuvo agitación durante 360 min en la incubadora a las mismas condiciones. Se tomó 1 mL de muestra con recuperación de volumen. La muestra se tomó cada 5 min durante los primeros 30 y luego de estos cada 30 min durante 360. Las muestras se analizaron en el mismo equipo que se mencionó en el apartado IV.10.1. Este experimento se llevó a cabo por triplicado en días diferentes. En la figura 13 se esquematiza el dispositivo empleado para llevar a cabo las cinéticas de liberación por las células de *S. obliquus* cargadas con glicerol.

4.11 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

4.11.1 PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS LIOFILIZADAS DE *S. obliquus*.

Se pesaron 10 mg de biomasa liofilizada y se dispersaron en una caja de Petri estéril para impregnar el portamuestras. El equipo ajustó a 1500V y 10 mA, para mantener allí la muestra por 5 min. Pasado este tiempo se extrajo la muestra de la cámara y se procedió a observarla al microscopio electrónico.

4.11.2 PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS CARGADAS CON GLICEROL.

El cargado de la biomasa con glicerol en condiciones hipotónicas, se llevó a cabo como se describe en el apartado IV.10.2, para posteriormente deshidratar a punto crítico a 1500 psi y 70°C por 5 minutos. Pasado este tiempo el sobre se rompió

para extraer el paquete celular deshidratado y colocarlo en la cámara del microscopio electrónico para observar la muestra.

4.11.3 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE LAS CELULAS DE *S. obliquus*.

La determinación del tamaño de las células de *S. obliquus* se llevó a cabo por comparación con la medida que aparece al pre de la fotografía de la muestra tomada del microscopio de bamdo electrónico

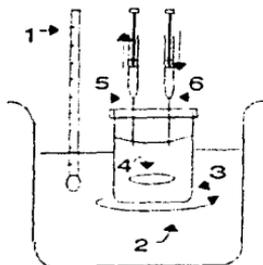


Figura 13. Dispositivo empleado para llevar a cabo la cinética de liberación del glicerol absorbido en *S. obliquus* 1 termómetro, 2. Agitador, 3. vial, 4. sobre de papel Whatman 40 con las células cargadas, 5. jeringa para toma de muestra, 6. jeringa para compensación de volumen removido.

V. RESULTADOS Y DISCUSION.

5.1 CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO DEL CULTIVO DE *S. obliquus* EN MATRAZ

Las células de *S. obliquus* CDBB-A-15 en medio de cultivo Bristol modificado bajo el microscopio son de forma oval, con puntas redondeadas, de color verde, características que coinciden con las reportadas por Soeder (1988)

5.1.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *S. obliquus* EN SUSPENSIÓN

En la figura 14 se muestra la cinética de crecimiento de *S. obliquus*. Es una curva de crecimiento característica, en ella se puede apreciar que la fase de inducción dura aproximadamente 3 días, la fase exponencial aproximadamente 3 días y la fase estacionaria dura dos días. Por el tiempo de muestreo que se realizó no se pudo observar la fase de declinamiento del cultivo. De esta gráfica se obtuvo el tiempo de duplicación de la biomasa que fue de 1.9468 d lo que significa que aproximadamente cada dos días se duplica la población. Así mismo por esta gráfica se decidió que el tiempo de incubación sería de siete días pues fue después de este tiempo, al principio de la fase estacionaria, cuando se encontró la mayor cantidad de células en el medio, que fue lo que nos interesa.

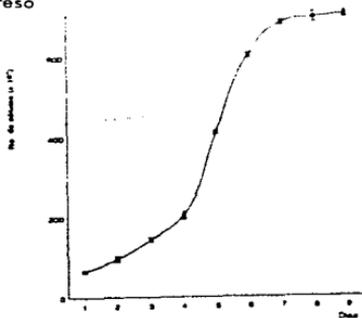


Figura 14. Curva de crecimiento de *Scenedesmus obliquus* CDBBA 15, tiempo de duplicación 1.9184 d en medio de cultivo líquido Bristol modificado, incubado con luz fluorescente a 1800 luxes, a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ y agitación por burbujeo de aire.

5.2 RENDIMIENTO CELULAR DEL CULTIVO

El rendimiento del cultivo luego de haber cosechado y liofilizado la biomasa de *S. obliquus* fue de 1.6 g/m³/día, que es una cantidad pobre pues Richmond (1986) reporta una producción de hasta 25 g/m³/día en una planta de producción de biomasa.

5.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE *S. obliquus*

En la tabla XIII se enlista la composición química de *Scenedesmus obliquus* CDBB A 15. De estos datos se pueden mencionar varias cosas haciendo comparaciones con lo reportado en bibliografía. Se llevo a cabo el análisis de estos metabolitos pues pueden impartir a la piel los factores de nutrición y protección que necesita, además de ser compuestos codiciados en las industrias química, cosmética y farmacéutica.

Por el estudio del análisis proximal efectuado, se observa la producción de una cantidad mayor de lípidos totales (14-16% base seca) respecto al reportado por Mysore (Soeder, 1988) quien menciona una producción de lípidos del 8-12% base seca. Por otro lado, por la composición relativa de ácidos grasos se detectó la presencia de los principales componentes de la llamada vitamina F (ácido linoleico y linolénico) (O'leary, 1993). Es de particular importancia, tanto la composición como la cantidad de ácidos grasos saturados e insaturados presentes en la muestra, pues proporcionan una barrera protectora sobre la piel contra la pérdida transdérmica de agua cuando se utilizan para estos fines (Ako, 1993).

De gran importancia es la presencia de la vitamina C (ácido ascórbico) pues es un receptor de radicales libres. Este tipo de antioxidantes se encuentran dentro de los mecanismos naturales de defensa contra los daños promovidos por la luz y presumiblemente contra el envejecimiento prematuro de la piel (Kislalioglu, 1994). Así pues por los resultados obtenidos en este estudio y comparándolos con los reportados por Mysore (Soeder, 1988) se puede mencionar que bajo estas condiciones de cultivo la cepa puede producir hasta cuatro veces más de vitamina C que lo reportado.

Tabla XIII. Composición química de *Scenedesmus obliquus* CDBB A 15.

1. Análisis Proximal		% masa seca
Lípidos		16
Proteína total		40
2. Composición relativa de ácidos grasos		% base seca
Ac. laurico		tr
Ac. mirístico		0.6872
Ac. palmítico		16.4150
Ac. palmítico		8.2502
Ac. esteárico		7.9957
Ac. oleico		7.4573
Ac. linoleico		25.4819
Ac. linoleico		4.3360
3. Vitaminas (mg/Kg base seca)		
Acetato de vitamina A		102.58
Vitamina D3		25.639
Vitamina E		131.301
Niacina		26.4334
Ac. nicotínico		49.709
Ac. fólico		Nd
Piridoxina		Nd
Tiamina		Nd
Riboflavina		Nd
Ac. pantoténico		21.262
Ac. Ascórbico		88.6391
4. Otros compuestos (mg/Kg base seca)		
Fosfatidil colina		65.6532
β -Caroteno		1747.35
tr trazas, Nd no detectado.		

En cuanto a la presencia de vitaminas del complejo B, solo se detectó la presencia de niacina y ácido nicotínico además de ácido pantoténico. Los demás compuestos, ácido fólico, piridoxina, tiamina y riboflavina se encontraron en cantidades traza. Sin embargo, los datos de los compuestos mencionados inicialmente se encuentran dentro de los reportados por Cairo, Dortmund y Mysore (Soeder, 1988).

Respecto a la producción de β -caroteno por la cepa se puede mencionar que está por arriba de lo reportado por Dortmund (Soeder, 1988).

En general, las diferencias de estos datos respecto a los reportados en bibliografía pueden atribuirse a varias cosas. En primer lugar cabe mencionar que uno de los factores que influye en mayor medida sobre la producción de metabolitos por la cepa es la composición química del medio de cultivo. En este aspecto la deficiencia en la cantidad de Nitrógeno promueve la producción de lípidos y con ello la producción de vitaminas liposolubles (Borowitzka-Borowitzka, 1988). La incidencia de luz y la calidad del espectro luminoso es otro de los factores que pueden influenciar positivamente la producción los colorantes (β -caroteno, xantinas etc.) (Borowitzka-Borowitzka, 1990). Asimismo la temperatura a la que se incuba el cultivo, la cantidad y la calidad de luz incidente, y los componentes del medio de cultivo juegan un papel importante en el desarrollo favorable y la cantidad de la biomasa producida (Burlew, 1976).

5.4 PRUEBA DE LA INOCUIDAD DE LAS CELULAS DE *S. obliquus* SOBRE PIEL RASURADA DE CONEJO

La aplicación tópica de células liofilizadas de *S. obliquus* sobre piel sana y escoriada no produjo edema ni entema durante o al término de la prueba. Por lo que se puede decir que estas células pueden utilizarse en formulaciones cosméticas destinadas a tratar la piel pues son inocuas.

5.5 PRUEBAS DE LIBERACION DE GLICEROL A PARTIR DE CELULAS DE *S. obliquus*

5.5.1 DETERMINACION DE CANTIDAD DE GLICEROL ABSORBIBLE EN LAS CELULAS DE *S. obliquus* EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CLORURO DE SODIO

En la figura 15 se aprecia la gráfica de absorción de glicerol por células liofilizadas de *S. obliquus* en presencia de diferentes concentraciones de cloruro de sodio. En esta, se aprecia claramente que la tonicidad del sistema resultó inversamente proporcional a la cantidad de glicerol absorbido por las células. En la tabla XIV se enlistan los datos obtenidos de estas determinaciones. Este fenómeno se explica por la presencia de una membrana porosa de naturaleza permeable alrededor de la célula que puede distenderse o contraerse por la diferencia de la concentración de solutos en el sistema en que se encuentre, pues tiene la capacidad de balancear la presión osmótica; cuando la célula se encuentra en una solución más concentrada que la que existe en el

interior de la célula, se contrae, por la pérdida de agua, dificultando la entrada y salida de solutos, y cuando la solución del medio es menos concentrada que en el interior de la célula, se hincha por la entrada de agua, abriendo los poros. (Saez y De Robertis, 1975). Este fenómeno se aprovecha para cargar las células con un activo que sea capaz de atravesar por los poros abiertos de la membrana (Ihier, 1983, Lewis, 1992)

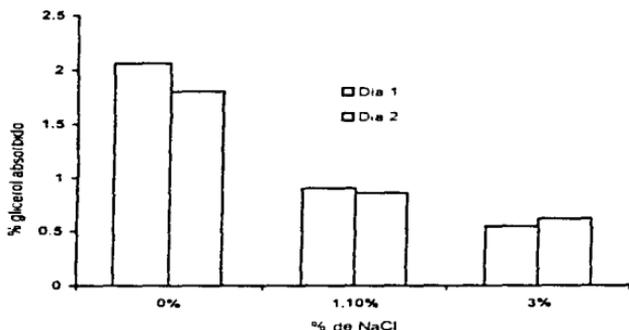


Figura 15. Absorción de glicerol por las células liofilizadas de *S. obliquus* en presencia de diferentes fuerzas iónicas de Cloruro de sodio

Así pues, por estos resultados se decidió llevar a cabo el cargado de las células y las cinéticas de liberación en agua bidestilada, deionizada con lo que se impone un sistema hipotónico, la temperatura de trabajo fué de $35 \pm 2^\circ\text{C}$, con agitación rotatoria a 100 r.p.m. (Ver apéndice I).

Tabla XIV Promedio del porcentaje de glicerol absorbido en células de *S. obliquus* liofilizadas.

Agua (NaCl 0%)	NaCl 1.1 %	NaCl 3%
2.0585	0.9016	0.5421
1.8050	0.8532	0.6157

Ensayo por triplicado con réplica en días diferentes.

Se estima, pues no hay reportes al respecto en este tipo de células, que la cantidad de glicerol con que se cargaron las células es bajo. Dado que el objetivo de este trabajo es el de demostrar la utilidad de las células de *S. obliquus* como acarreadores de cosméticos, es necesario llevar a cabo una optimización del método de cargado pues Lewis (1983), incrementó en 150-170% el volumen de los eritrocitos modificando ligeramente el método reportado por Ihler (1973).

5.5.2 CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE GLICEROL ABSORBIDO EN *S. obliquus*

En la figura 16 se observa el gráfico de porcentaje de glicerol liberado respecto al tiempo. Aquí se aprecia que la máxima cantidad de glicerol liberado después de 2 horas es de alrededor del 80% y se mantiene así por un lapso de aproximadamente 6 horas, es decir alcanza un estado estacionario después de dos horas. Este dato fue utilizado para determinar las fracciones liberadas en los lapsos de tiempo para utilizar el modelo propuesto por Peppas (1985). La liberación rápida del activo por las células de *S. obliquus*, nos sugiere que la membrana no está interactuando con el activo, por lo que hay una hidratación rápida de las capas más superficiales de este en la célula favoreciendo su donación al medio de liberación.

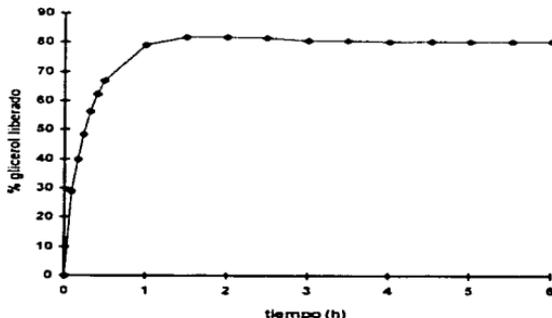


Figura 16. Porcentaje de glicerol liberado respecto al tiempo (h) por células liofilizadas de *S. obliquus* en medio hipotónico a $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

Para determinar el mecanismo de difusión del glicerol desde la célula, se utilizó la ecuación propuesta por Peppas (1985) en donde se graficó el logaritmo de la fracción liberada contra el logaritmo del tiempo, figura 17. Este modelo semiempírico es una relación matemática desarrollada a partir de la ecuación de difusión de Fick y nos indica que la fracción liberada del fármaco está relacionada exponencialmente con el tiempo; en donde "n", la pendiente de la gráfica, se relaciona con el tipo de mecanismo de liberación (Peppas, 1985). De esta gráfica se encontró un valor de "n" de 0.5518, indicativo de un mecanismo de transporte no fickiano dependiente del tiempo avalado por un coeficiente de regresión de 0.9951.

Aun cuando el sistema (las células) no cumple con una condición importante, es decir, que esta ecuación fue diseñada para un sistema polimérico, los datos de "n" y coeficiente de regresión explican el mecanismo de liberación. Esto puede explicarse pues la célula al utilizarse completa y tener organelos, como la pared y membrana celular, limitan la liberación del activo actuando pues como una red polimérica. Sin embargo está cumpliendo con las demás características que aplican al modelo, es decir, se empleó la porción inicial de la curva de liberación ($M_t/M_i < 0.6$), el principio activo es muy soluble en agua y las condiciones "sink" imperaron durante todo el estudio.

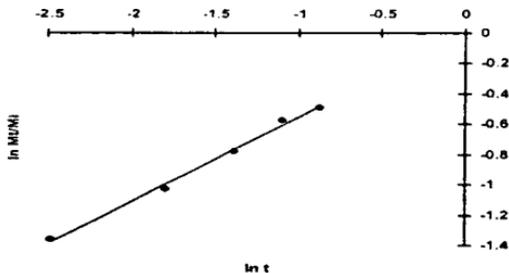


Figura 17. Aplicación de la ecuación del modelo de Peppas (logaritmo de la fracción remanente de glicerol ($\ln M_t/M_i$) vs logaritmo del tiempo) a los datos de liberación del glicerol, por células biofilmizadas de *S. obliquus* en medio hipotónico.

Para deducir la cinética de liberación del glicerol por la células de *S. obliquus* en medio hipotónico, se aplico la ecuación de primer orden en donde se graficó $\ln(1-r)$ contra el tiempo, figura 18, de donde se encontró un coeficiente de regresión de 0.9855, lo que indica que el sistema tiene una cinética de primer orden.

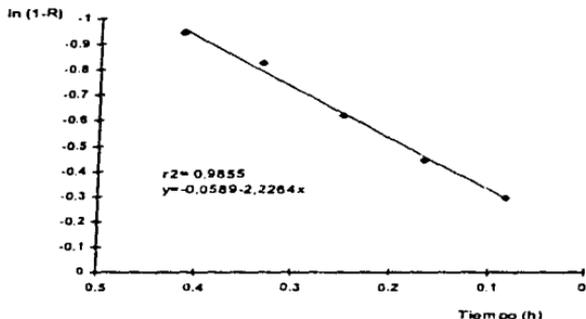


Figura 18. Aplicación de la ecuación de primer orden ($1-r$) respecto al tiempo (h) para los datos de liberación de glicerol por células liofilizadas de *S. obliquus* en medio hipotónico

Así mismo se llevó a cabo la evaluación de los resultados obtenidos con el modelo propuesto por Higuchi (1962) para estudiar la velocidad de liberación del activo por lo que se graficó Q contra $t^{1/2}$, figura 19, en donde Q representa la cantidad de principio activo liberada por unidad de área expuesta. De ello se obtuvo un coeficiente de regresión de 0.9957, lo que indica que la cantidad de activo liberada por unidad de área es dependiente de la raíz cuadrada del tiempo. A este respecto, cabe aclarar que se está asumiendo que el activo se encuentra homogéneamente disperso (disuelto) en la base (la célula) y que ello provoca que la liberación del activo se lleve a cabo de un modo unidireccional y en capas. Por lo tanto, la velocidad de liberación está controlada por la velocidad de penetración del solvente a la membrana y por la velocidad de

difusión del glicerol al medio de liberación, lo que es explicado por el modelo propuesto por Higuchi.

Cabe mencionar que los modelos utilizados para llevar a cabo el estudio del mecanismo y tipo de liberación que las células de *S. obliquus* pueden proporcionar, fueron desarrollados para sistemas poliméricos de liberación. Sin embargo este estudio puede orientar en el desarrollo de un modelo para explicar el comportamiento de este tipo de agentes de liberación, pues hay varios aspectos, aun por considerar, entre ellos el estudio mediante el cual se demuestre que solo el activo es el que sale de la célula y no otros metabolitos que se encuentran en el interior de ella, que los organelos de la célula no interfieren en el proceso de difusión del activo, el paso del activo a través de una membrana y las características que esta presenta (porosidad, grosor, etc)

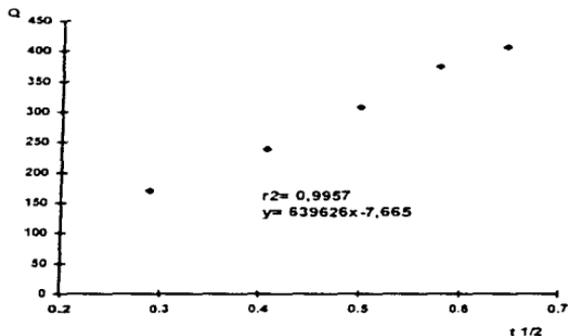


Figura 19. Aplicación de la ecuación del modelo de Higuchi a los datos de liberación de glicerol por células liofilizadas de *S. obliquus* en medio hipotónico.

En el apéndice II se enlistan los datos de los gráficos antecedentes.

5.6 MICROSCOPIA ELECTRONICA

5.6.1 COMPARACION DE LAS MICROGRAFIAS DE LAS CELULAS DE *S. obliquus* LIOFILIZADAS vs CARGADAS CON GLICEROL

El metodo de preparacion de las muestras para microscopia electronica impidio obtener una imagen real de las microalgas frescas, pues el proceso implicaba una deshidratacion a punto critico; lo que no permitio realizar una comparacion entre las micrografias de la microalga liofilizada y la microalga fresca. Es por ello que se tomaron fotografias de las microalgas frescas en microscopio optico a 100x en inmersion (fig 20). Esto se llevo a cabo para tener una idea de las diferencias que puedan existir entre ambas muestras. Para cuando se efectuó el ensayo de microscopia electronica, la microalga liofilizada sufrio un proceso de hidratacion, lo que impidio hacer lo mismo con la muestra fresca.

En la figura 21 se observa la micrografia de barrido electronico de las celulas de *S. obliquus* liofilizadas. En esta se pueden observar celulas completas, ovoidales, deshidratadas, al parecer sin rupturas en la membrana celular, lo que las hace propicias para ser utilizadas como microvesiculas. En la figura 22 se observa un gran campo de celulas de *S. obliquus* despues del proceso de encapsulacion de glicerol. La mayor parte de las celulas se observan completas, sin rupturas de la pared celular, mas redondeadas que las que se observan en la figura 21 y semejantes a las que se observan en la figura 20. Este aspecto se atribuye a la presencia del glicerol en el interior de las celulas, pues la tecnica para preparar la muestra para microscopia electronica, permite la salida del agua mas no la salida del glicerol que en este caso esta atrapado en ellas.

5.6.2 DETERMINACION DEL TAMAÑO DE LAS CÉLULAS DE *S. obliquus*.

En la figura 23 se observa la micrografia de barrido electronico de celulas de *S. obliquus* liofilizada; al centro se aprecia una celula completa de forma ovoidal, con puntas redondeadas, aparentemente sin rupturas de la pared celular. Por comparacion con la barra inferior que mide 10 μm las celulas liofilizadas miden alrededor de 7 μm .



Figura 20 Fotografía de microscopio óptico de las células de *Scenedesmus obliquus* en medio bristol modificado



Figura 21. Micrografía de barrido electrónico de las células de *Scenedesmus obliquus* aisladas (3000x).

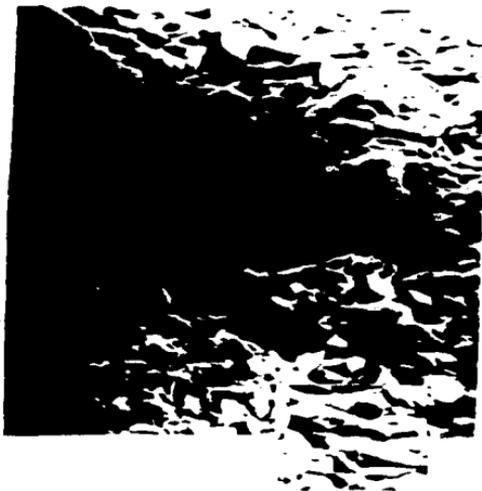


Figura 23 Micrografía de barrido electrónico de las células de *Scenedesmus obliquus* inmediatamente después del proceso de encapsulación de glicerol (3000x)



Figura 23 Micrografía de barrido electrónico de las células de *Scenedesmus obliquus* liofilizadas. Al centro se aprecia una célula completa. La barra mide 10 μ m (15000x).

VI. CONCLUSIONES.

Las microalgas propuestas pueden funcionar como acarreadores naturales inocuos cuyos metabolitos tienen importante valor cosmético y farmacéutico

Se obtuvo un rendimiento de 0.1 g de biomasa seca por litro de medio de cultivo C64 con la cepa de *Scenedesmus obliquus* CDBB-A-15

Las células de *S. obliquus* al ser aplicadas sobre piel sana y esconada no tienen efecto tóxico por lo que pueden considerarse un material inocuo.

Se puede promover la encapsulación de glicerol en células liofilizadas de *S. obliquus* aprovechando el fenómeno de distensión de la membrana celular en ausencia de la fuerza iónica de cloruro de sodio en agua, a una temperatura de 35°C y en agitación a 100 r p m

Una vez cargadas con glicerol, las células liofilizadas de *S. obliquus* mostraron un perfil de liberación prolongado y su mecanismo puede ser explicado como una liberación no fickiana dependiente del tiempo según el modelo propuesto por Peppas.

La velocidad de liberación está controlada por la velocidad de penetración del solvente a la membrana y por la velocidad de difusión del glicerol al medio de liberación lo que es explicado por el modelo propuesto por Higuchi.

La cinética de liberación del glicerol cargado en células de *S. obliquus* liofilizadas obedece a un modelo de primer orden.

La técnica de encapsulación de glicerol en células de *S. obliquus* no es exclusiva para glicerol y podría aplicarse a la liberación prolongada de otros agentes cosméticos, empleando este mismo principio.

VII. LITERATURA CITADA:

- Abrutyn, E S (1992). Polymeric controled release topical cosmetic applications. *Cosmetic & Toiletnes*, 107: 65-71.
- Ako, H. Fujikawa, L., Gray, D (1993). Emollient action of kukui nut oil. *J Soc Cosmet. Chem.* (44), 239-247
- Arredondo B O y R Vázquez (1991) Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas; *Ciencia y Desarrollo CONACYT*, XVII 98 99-111
- Barclay W R., (1993), Heterotrophic production of long chain polyunsaturated fatty acids using algae and algae-like microorganisms. *J Appl Phycol suppl* 29 6
- Behrens, P W (1993). Microalgae as a source of stable isotopically labeled compounds *J Appl Phycol suppl* 29 5
- Ben-Amotz, A Avron, M (1990). The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella*. *Trends Biotech* (8), 5 121-126
- Ben-Amotz, A Avron, M (1980) Glicerol, β -Carotene and dry algal meal production by commercial cultivation of *Dunaliella* Shelef and Soeder (Eds). en *Algae Biomass*. Elsevier, Amsterdam 603-610
- Benemann, J R (1992). An overview of Microalgae Industrial Phycology. en *Abstract de J App Phycol suppl* 28 11
- Borowitzka M A., L J Borowitzka (1988) Microalgal biotechnology Cambridge University Press, Cambridge, 59-84
- Borowitzka, M. (1988) Vitamins and fine chemicals from microalgae. Borowitzka, M A y L J (Eds), en *Microalgal Biotechnology*, Cambridge Univ Press, 153-196
- Borowitzka, L J., Borowitzka, M A. (1990) Commercial production of β -carotene by *Dunaliella salina* in open ponds. *Bull. Mar. Sci.* 47 244-252
- Burlew, J (1976). en *Algal culture, from laboratory to pilot plant*, Carnegie Institution of Washington Publication, 5th Edition, Washington, 329
- Burnette, R R (1987). Theory of mas transfer in *Controlled drug delivery*; Robinson, J R., Lee, V.H. Ed., Marcel Dekker Inc., New York.
- Chávez, M A., Castro, R., Avila, A., Ríos, E. (1995) Extracción y evaluación cosmética del aceite de la semilla de *Calocarpum mammosum* (mamey); *CienciaCosmética*, (1)4, 54-56.
- Chien, Y.W (1982); en *Novel Drug Delivery Systems*; Marcel Dekker; New York; 18-22.

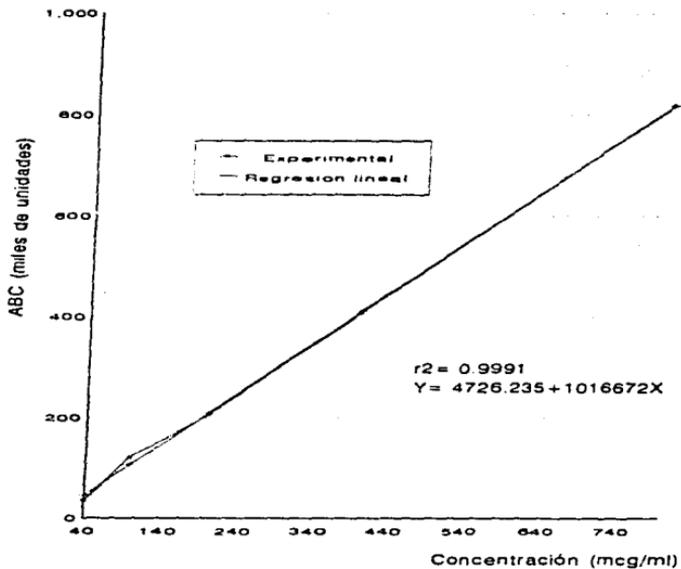
- Cysewski G R. (1992). Feeds, foods and pigments from *Spirulina*. *J Appl Phycol suppl* 28 12
- De Gouvea, M C (Dec. 1980) Seaweeds in cosmetics. *Cosmet-Toilet* 95 47-50
- De Roeck, H. C. Calire, F. Bressin, L. Amicel, A. Dernen (1993) Vitamine, free aminoacid and fatty acid composition of some marine planktonic microalgae used in aquaculture; *Bot. Mar.* 34. 4. 321-325
- De Roberts, E D P., Saez, F A (1975) Cel permeability, endocytosis, lysosomes and peroxisomes en *Cell Biology*, W B Saunders Comp. Philadelphia, 471473
- Dubinsky, Z. T. Berner, S. Aronson (1978) Potential of large scale algal culture for biomass and lipid production in and lands. *Biotech Bioeng Symp.* 8 51-68
- Fellman, (1982) Simultaneous determination of thiamine and riboflavine in selected foods by HPLC. *J Food Sci* 47 2048-2050
- Fried A., A. Tietz, A. Ben Amotz, W. Eichenberger (1981) Lipid composition of the alga *Dunaliella bardawii*. *Biochem Biophys Acta* 713 419-426
- Foss, B. (1986) Programmable polymers- A new technology. *Cosmet & Toilet* 101 99
- Herslöf, B (1979) HPLC of Triglicides *J Am Chem Oil Soc* 56 864-866
- Higuchi, W. (1962) Analysis of data on the medical release from ointments. *J Pharm. Sci.* 51(8) 802-804
- Higuchi, T (1963) Mechanism of sustained-action medication. *J Pharm Sci.* 52(12): 1145-1149
- Hudson, Thomas. Subramaman, Snyamn Allen, Rebeca *JAOAC* 67 (5) 994-998.
- Ihler, G M. (1983). Erythrocyte carriers. *Pharmac. Ther.* (20) 151
- Jayasree, V., Solimabi, N., Kamat, S. (1985). Distribution of tocopherol (vitamin E) in marine algae from Coa, West coast of India. *Ind J Mar Sci.* 14 228-229
- Jellinek, J S (Sept, 1987): Prospects for Cosmetics, toiletries and skin care products; *Cosm & toilet* 9(102) 69-76
- Julliano, R L. (1987). Microparticulate drug carriers. en *Controlled Drug Delivery*, J.R. Robinson, V H. Lee, Marcel Dekker Inc., New York
- Katz, J., Hotch, H., (1986). Polymer entrapment: Advanced Polymers Sets Strong Pace. *Drug & Cosmetic Industries*; (12) 55-58.
- Kislalioglu, S. (May, 1994). Causes, clinical features and mangement of skin aging; *HAPPI*, 61-82.

- Kubo, I (1990). Effect of algal constituents on growth of lettuce and rice seedlings. *J.Nat. Prod.* 53: 50-56
- Lachman, Lieberman (1986) The theory and practice of Industrial Pharmacy, Lea & Febiger Editions, USA 526-540
- Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J D., Alberts, B., Bray, D (1990) La membrana plasmática en *Biología molecular de la célula*. Ediciones Omega, Barcelona, 269-270. 303
- Lewis, D A., Alpar, O H (1992) Erythrocytes as microvesicles en *Microcapsules and nanoparticles in medicine and pharmacy* M. Donbrow Ed Boca Raton
- Lueng, A B (April, 1989) Cosmetic made from Chinese herb extracts. *Drug and Cosmetic Industres.* 4 (144) 35-40
- Martin A (1983) Delivery systems en *Physical Pharmacy*; Lea & Fabiger; 3rd Edition; Philadelphia
- Markovitz, A (1985); Fotosíntesis aplicada en *Apuntes. I curso Latinoamericano de Biotecnología*, Valparaíso Chile 11-13
- Morck H. (Sept., 1991) Algae source of excipients in the food industry and pharmacy. *Pharm Ztg*; 136 9-12
- Munyan, G. (Sept., 1991) A major chinese cosmetic manufacturer recent grow and development. *Cosm & Toiletries*. 106 9
- Nagle, N., Lemke, P. (1990) Production of methyl ester fuel from microalgae; *Appl Biochem Biotech* 24. 355-361
- Newton, R P., Walton, T J., Moyse, C D. (1977) Non-tocopherols in the unicellular blue green algae *Gleocapsa*. *Biochem Soc Trans.* 5, 1486-1489
- Nowak, G A. (1985). En *Cosmetic Preparations*. Ernst Kieser GmbH, 3rd Edition; Augsburg. 320
- O'leary, M.J. (1993). Industrial production en *The technology of vitamins in food*. P. Berry Ottaway, Blackie Academic & Prof Glasgow, 85
- Paniagua, M J, Bückle L.F., Granados C., Loya D.H. (1989). *Manual de metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas*; Publicaciones del C I C E S E. 2ª Edición; Universidad Autónoma de Baja California Sur; 2:109-119.
- Paniagua, J. (1994) ; Biotecnología de microalgas y obtención de productos químicos y alimenticios; *Sene Científica*; Universidad Autónoma de Baja California Sur, 2:109-119. 70
- Parson V. (1993) Active delivery from Nylon Particules; *Cosmetics & Toiletries*; 108: 97-100.

- Parson, T.R. (1981). On pigment composition of eleven species marine phytoplankton. *J Fish. Res. B.* 18, 1017-1025.
- Payer, H D., Pabst, W., Renkel K.H., (1988). Review of the nutritional and toxicological properties of the green algae *S. obliquus* as a single cell protein; en *Algae Biomass production and use*; Shelef & Soeder Editors; North Holland, 198, 787-789
- Peppas, N.A. (1985); Analysis of Fickian and Non-Fickian drug release from polymers. *Pharm. Acta Helv.*, 60(4) 110-111.
- Prato, L., Rovesti P. (1985). Liposoluble extracts of marine algae for cosmetic use. *Riv Ital. Essenze Profumi Piante Off. Aromi. Saponi Cosmet. Aerosol.* Nov-Dec 82 392-395.
- Quiroga, I.M., Guillot, C.F. (1986) Fisiología de la piel en *Cosmética Dermatológica Práctica*. El ateneo, 5ª edición, Buenos Aires, 256
- Raymond E.K. (1961); *Enciclopedia de tecnología química*. Tomo 1. Union Tipografica Editorial Hispanoamericana. Mexico
- Rezanka, T., Slavicek, J., Podojil, M. (1983) Determination of fatty acids in algae by capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J Chrom.* 268, 71-78
- Richmond, A. (1986) Fine Chemicals from microalgae en *Handbook of microalgal mass culture*; CRC Press, Florida, 529
- Rios, E., R.O. Cañizares (1994) Analisis de microalgas y sus productos mediante cromatografía de líquidos y gases. *Serie Científica*, Universidad Autónoma de Baja California Sur, 2 (1) 121-148
- Round F.E. (1981). Phytoplankton en *The ecology of algae*. Cambridge University Press, Great Britain, 291-293, 552
- Servel, M.O., C. Claire, A. Dermen, L. Coiffard, Y.H. De Roeck (1994) Fatty acid composition of some marine microalgae; *Phytochemistry*, 36 (3) 691-693
- Schmitt, W.H. (1992) The skin. en *Skin care products in cosmetic and toiletries industry* (Williams D.F., Schmitt, W.H.) Blackie academic and professional, Glasgow, 99-103.
- Soeder C.J., Hegewald E. (1988) *Scenedemus en Microalgal Biotechnology*, Borowitzka-Borowitzka, Cambridge University Press, Great Britain, 40-53
- Spellios, T. (May, 1984). A history of Cosmetics; *Drug and Cosmetic Industries*, (134) 5:126-128.
- Spellios, T. (Dec. 1984). A History of cosmetics; part V; *Drug and Cosmetic Industries*; (135), 6:250-256.

- Travieso, L., F. Benítez, P. Weiland, E. Sánchez, R. Dupeyrón, A.R. Domínguez. (1996) Experiments on immobilization of microalgae for nutrient removal in wastewater treatments; *Bioresource Tech.* (55) 181-186.
- Yélamo C., M. Velásquez, A. Bolaños, E. Bnceño, V. Pérez, M. Amado. Prueba discriminatória en piel de conejos su importancia en el análisis toxicológico de cosméticos;
- Yih, W.H., (1992). Applied researches on microalgae; *Bull Korean Fisch Soc.* 25(3) 205-218
- Zimmerman, V., Riemann, F., Pilvat, G., (1976) Enzyme loading of electically homogeneous human red blood cell ghosts prepared by dielectric breakdown. *Biochem. biophys. acta.* (430) 460
- Zuelli, F. (1994) En 1st European Simposium on Controlled Delive; *Cosmet & toilet.* (109) 41-43.

Apéndice I



Curva de calibración de glicerol por HPLC. Detector Índice de refracción, columna Rezex Organic Acids 8 μ m, 300x 7.8mm; Fase móvil H₂SO₄ 0.005 mM; Flujo 0.7ml/min, presión 1300psi.

Apéndice II.

t (h)	ln t	t ^{1/2}	% liberado	SD	Q	ln M/Mi	ln (1-R)
0		0	0				
0.0833	-2.4849	0.2886	28.9391	4.4215	171.1943	-1.3559	-0.2967
0.166	-1.7917	0.4074	39.8738	5.3343	239.9588	-1.0219	-0.4482
0.25	-1.3862	0.5	48.4247	6.5447	307.6985	-0.7732	-0.6191
0.333	-1.0986	0.5770	56.2304	7.0451	374.8693	-0.5757	-0.8262
0.416	-0.8754	0.6449	62.2904	7.8891	407.4698	-0.4923	-0.9449
0.5	-0.6931	0.7071	67.9151	8.1931	424.5677	-0.4512	-1.013
1	0	1	79.2737	8.7725	484.0913	-0.32	-1.2953
1.5	0.4054	1.2247	81.7219	8.754	493.7462	-0.3002	-1.3497
2	0.6931		81.7814	7.0451	494.6097	-0.2985	-1.3547
2.5			81.0438	7.9582			
3			80.5403	6.2782			
3.5			80.6715	5.6081			
4			80.2602	6.3341			
4.5			78.5715	6.8903			
5			78.4602	8.9906			
5.5			74.8331	7.4253			
6			73.5841	7.6711			

*Promedio de tres determinaciones

Datos de tiempo (t) en horas aplicación del logaritmo natural al tiempo (ln t) raíz cuadrada del tiempo (t^{1/2}); porcentaje de glicerol liberado (% liberado) y su desviación estandar (SD), aplicación de los modelos de la ecuación de primer orden (ln 1-r), Modelo de Higuchi (Q) y Longor-Peppas (ln M/Mi), a los datos de liberación de glicerol por células de *S. obliquus* en medio hipotónico.