

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**EVALUACIÓN IN VITRO E IN VIVO DEL EFECTO DE
DIFERENTES ADITIVOS SOBRE LA FUNCIÓN DE
BARRERA DE PELÍCULAS DE QUITOSÁN DESTINADAS
A SER APLICADAS EN PIEL**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
ERIKA MAGALY TORRES BAÑOS

**ASESORES: DRA. ADRIANA GANEM RONDERO
DRA. SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO**

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO DE MÉX.

2009



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.

DEDICATORIAS

A mi querido y maravilloso hijo **ERIK** que es el motor de mi vida. Sus abrazos y besos son la base para querer superarme cada día, para no derrumbarme ante cualquier obstáculo. Mi amiguito hermoso y travieso, gracias por llenar mi vida de felicidad infinita.

A mi esposo, amigo y compañero Marco que me ha dado todo a cambio de nada, mi negrito te dedico este trabajo por creer en mí y por tantos sacrificios que haz hecho para que yo concluya esta etapa. Gracias Amor por tu ternura y comprensión en todo momento y sobre todo **GRACIAS** por regalarme una familia chiquita y feliz, tú sabes que esté trabajo lo hemos hecho juntos.

A mi Mamá que ha sembrado en mí la semilla de la superación y perseverancia, gracias a tus consejos y ejemplos sé que nada es imposible siempre hay alternativas para cumplir nuestros objetivos. Gracias Mamá por sacrificarte tanto por nosotros, por forjar hijos de bien, no encuentro forma de agradecerte tanto.

A mi Padre que nos ha enseñado a mis hermanos y a mí que todo se gana a base de trabajo, que aunque hemos pasado momentos difíciles, siempre ha estado ahí para unirnos cada vez más como familia. Gracias por creer en mí y por apoyarme en todo momento.

A mis hermanos Héctor (mi hermano del alma), Jorge (JJ, Chuchito) y Alán (Mi corazón) por su cariño y ayuda, y por uno que otro enojo. Mis compañeros de travesuras, que sería sin ustedes, sin esas anécdotas chistosas. Gracias por regalarme una infancia alegre y plena.

A mis cuñadas Gaby y Jessy por estar ahí en los momentos importantes de la familia y por cuidar de ellos.

A mi segunda familia, mis suegros Lupe y Manuel, y mis cuñadas Pao y Kary, por su apoyo invaluable antes, durante y después de la realización de este trabajo.

A mi gran amigo Alfonso que me ha brindado una amistad maravillosa y totalmente incondicional, A. Quinto gracias por ayudarme tanto en estos momentos, tu sabes que tu apoyo es y será irremplazable.

A Verito por su amistad tan leal, apoyo incondicional y consejos oportunos.

A mi hermanita mayor Nayeli que desde la niñez me ha demostrado junto a su maravillosa familia una gran amistad y respeto, a pesar de la distancia y el poco tiempo siempre cultivaremos la hermandad.

A Marisol que al parecer el inicio de nuestros proyectos de tesis, fue el inicio de una sólida amistad, donde sabemos que una siempre cuenta con la otra, eres una gran compañera y amiga de generación, compañera y voluntaria del proyecto de tesis y actualmente amiga de trabajo.

A Fabián por su gran apoyo y compañía principalmente en los últimos semestres.

A mis amigos y compañeros de Generación QFB 29: Rodrigo, Viviana, Sheyna, Lizeth, Angélica, Araceli, Alma, Oscar, Evelyn y Fernando, con quienes compartí grandes momentos inolvidables.

A los profesores de la FESC que al compartir sus conocimientos, experiencias de vida y profesión, despertaron en mí el deseo del conocimiento y la actualización.

A la Dra. Adriana Ganem quien no solamente fue una excelente asesora de tesis, si no también fue una amiga al escucharme y aconsejarme. Le doy miles de gracias doctora por su gran paciencia y comprensión y por ser una pieza fundamental para el término de este trabajo. Una de las mejores cosas que puede hacer en la FESC fue ser su tesista.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO que es la máxima casa de estudios, por su apoyo decidido, generoso y desinteresado.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a mis asesoras Dra. Susana Patricia Miranda Castro y Dra. Adriana Ganem Rondero que me brindaron asesoría y apoyo en todo momento.

Gracias a mis sinodales que conformaron mi Jurado: Dr. David Quintanar, Dra. Adriana Ganem, Dra. Elizabeth Piñon, Dr. José J. Escobar, MC. Guadalupe Nava, por su dedicación en la revisión y sus comentarios para mejorar el presente trabajo.

A la sección de Microscopía Electrónica de Barrido de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y al técnico Rodolfo Robles, por su asistencia en las pruebas de microscopía electrónica de barrido.

Al Ing. Draucin Jiménez por su ayuda en la fabricación de las celdas de permeación tipo Franz.

Al Dr. José Luis Arjona por su ayuda en la realización de los termogramas de Calorimetría Diferencial de Barrido.

INDICE

| | Pág. |
|---|-------------|
| Índice General | V |
| Índice de Figuras y Tablas | VIII |
| Lista de abreviaturas | X |
| Resumen | XI |
| | |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 5 |
| 2.1. Quitosán y Quitina | 6 |
| 2.1.1. Quitina | 7 |
| 2.1.2. Propiedades Fisicoquímicas de la Quitina | 9 |
| 2.1.3. Propiedades Fisicoquímicas del Quitosán | 10 |
| 2.1.4. Propiedades Estructurales del Quitosán y de la Quitina | 11 |
| 2.1.5. Métodos de obtención de Quitina y Quitosán | 12 |
| 2.1.6. Áreas de aplicación del Quitosán | 13 |
| 2.1.7. Propiedades de los materiales formadores de películas | 19 |
| 2.1.8. Películas con lípidos | 20 |
| 2.1.9. Películas con plastificante | 21 |
| 2.1.10. Películas de Quitosán como protección de piel dañada | 22 |
| | |
| 2.2. Piel | 23 |
| 2.2.1. Generalidades | 23 |
| 2.2.2. Capas de la piel | 24 |
| 2.2.2.1. Epidermis | 24 |
| 2.2.2.1.1. Estrato córneo (EC) | 25 |
| 2.2.2.1.2. Lípidos de la epidermis | 28 |
| 2.2.2.1.3. Unión dermoepidérmica | 29 |
| 2.2.2.2. Dermis | 29 |
| | |
| 2.3. Promotores de Absorción | 32 |
| 2.3.1. Generalidades. | 32 |
| 2.3.2. Mecanismos de acción | 33 |
| 2.3.2.1. Surfactantes (Tween® 80) | 34 |
| 2.3.2.2. Ácidos grasos (ácido oléico) | 35 |

| | |
|--|-----------|
| 2.4. Técnicas aplicadas para evaluar el estado de la barrera | 36 |
| 2.4.1. Pérdida de Agua Transepidermal (TEWL) | 36 |
| 2.4.2. Espectroscopia de Infrarrojo por Transformadas de Fourier/Reflectancia Total Atenuada. (FTIR/ATR) | 38 |
| 2.4.3. Calorimetría Diferencial de Barrido | 40 |
| | |
| 3. OBJETIVOS | 42 |
| 3.1. General | 43 |
| 3.2. Específicos | 44 |
| | |
| 4. METODOLOGÍA | 45 |
| 4.1. Materiales | 46 |
| 4.1.1. Reactivos | 46 |
| 4.1.2. Aparatos y Equipos | 46 |
| 4.1.3. Material biológico | 47 |
| 4.2. Métodos | 48 |
| 4.2.1. Preparación de películas de Quitosán | 48 |
| 4.2.2. Caracterización de las películas de Quitosán | 49 |
| 4.2.2.1. Grososres | 49 |
| 4.2.2.2. Microscopía Electrónica de Barrido | 49 |
| 4.2.3. Estudio <i>In Vitro</i> | 52 |
| 4.2.3.1. Intercambio gaseoso de películas de Quitosán. | 52 |
| 4.2.3.2. Calorimetría Diferencial de Barrido de soluciones de Quitosán. | 52 |
| 4.2.4. Estudio <i>In Vivo</i> | 53 |
| 4.2.4.1. Selección de voluntarios | 53 |
| 4.2.4.2. Pérdida de agua Transepidermal (TEWL <i>in vivo</i>) | 53 |
| 4.2.4.3. Espectroscopía de Infrarrojo por Transformadas de Fourier/Reflectancia Total Atenuada | 54 |
| | |
| 4.3 Diagrama de Flujo | 56 |

| | |
|---|-----------|
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 57 |
| 5.1. Caracterización de películas | 58 |
| 5.1.1. Grosos | 58 |
| 5.1.2. Microscopía Electrónica de Barrido | 60 |
| 5.2. Estudios <i>In Vitro</i> | 65 |
| 5.2.1. Intercambio gaseoso de películas de Qitosán. | 65 |
| 5.2.2. Calorimetría Diferencial de Barrido de soluciones de Qitosán | 68 |
| 5.3. Estudios <i>In Vivo</i> | 71 |
| 5.3.1. Pérdida de agua Transepidermal | 71 |
| 5.3.2. Espectroscopia de Infrarrojo por Transformadas de Fourier / Reflectancia Total Atenuada. | 75 |
| 6. CONCLUSIONES | 80 |
| 7. SUGERENCIAS Y RECOMENDACIONES | 84 |
| 8. REFERENCIAS | 86 |
| 9. ANEXO | 94 |

INDICE DE FIGURAS

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 1 | Estructura del Quitosán. | 6 |
| Figura 2 | Estructura de la Quitina. | 8 |
| Figura 3 | Esquema general de producción de Quitina y Quitosán. | 14 |
| Figura 4 | Capas de la piel. | 24 |
| Figura 5 | Estructura del Tween® 80. | 34 |
| Figura 6 | Estructura del Ácido oléico. | 35 |
| Figura 7 | Esquema de la cabeza cilíndrica de la sonda del Tewameter Courage-Khazaka TM 210®. | 37 |
| Figura 8 | Principio de Calorimetría Diferencial de Barrido. | 40 |
| Figura 9 | Ejemplo de termograma Calorimetría Diferencial de Barrido. | 41 |
| Figura 10 | Calorímetro Diferencial de Barrido Q 10, TA Instruments. | 51 |
| Figura 11 | Tewameter Courage-Khazaka TM 210®. | 52 |
| Figura 12 | Fijación del sensor del Tewameter sobre el antebrazo. | 53 |
| Figura 13 | Espectro de Infrarrojo característico del estrato córneo. | 54 |
| Figura 14 | Infrarrojo por Transformadas de Fourier, FTIR/ATR-8300. | 55 |
| Figura 15 | Grosos de películas de Qn de 10 ml. | 59 |
| Figura 16 | Grosos de películas de Qn de 20 ml. | 59 |
| Figura 17 | Película de Qn superficie. | 61 |
| Figura 18 | Película de Qn canto. | 61 |
| Figura 19 | Película de QnGli Superficie. | 61 |
| Figura 20 | Película de QnGli Canto. | 61 |
| Figura 21 | Película de QnTw Superficie. | 62 |
| Figura 22 | Película de QnTw Canto. | 62 |
| Figura 23 | Película de QnAO Superficie. | 62 |
| Figura 24 | Película de QnAO Canto. | 62 |
| Figura 25 | Película de QnGliTw Superficie. | 63 |
| Figura 26 | Película de QnGliTw Canto. | 63 |
| Figura 27 | Película de QnTwAO Superficie. | 63 |
| Figura 28 | Película de QnTwAO Canto. | 63 |
| Figura 29 | Película de QnGliAO Superficie. | 64 |
| Figura 30 | Película de QnGliAO Canto. | 64 |
| Figura 31 | Película de QnGliTwAO Superficie. | 64 |
| Figura 32 | Película de QnGliTwAO Canto. | 64 |
| Figura 33 | Valores de Intercambio Gaseoso para las diferentes películas preparadas (n=3). | 65 |
| Figura 34 | Termograma de EC no tratado (control). | 69 |
| Figura 35 | Temperaturas a la que se observó la transición térmica relacionada con la desnaturalización de proteínas. | 70 |
| Figura 36 | Cambios absolutos (cada valor de la formulación menos el control) obtenidos al medir el TEWL sobre las películas adheridas a la piel (n=6). | 73 |

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 37 | Cambios absolutos (cada valor de la formulación menos el control) obtenidos al medir el TEWL una vez retirada la película de la piel (n=6). | 73 |
| Figura 38 | Cambios absolutos de los números de onda para la banda de estrechamiento asimétrico de las cadenas alquílicas de los lípidos del EC. | 77 |
| Figura 39 | Cambios absolutos de los números de onda para la banda de estrechamiento simétrico de las cadenas alquílicas de los lípidos del EC. | 77 |
| Figura 40 | Cociente de áreas bajo la curva para bandas de estrechamiento asimétricas para las diferentes formulaciones en relación al control. | 79 |
| Figura 41 | Cociente de áreas bajo la curva para bandas de estrechamiento simétricas para las diferentes formulaciones en relación al control. | 79 |

INDICE DE TABLAS

| | | |
|----------------|--|----|
| Tabla 1 | Aplicación de Quitina y Quitosán | 17 |
| Tabla 2 | Películas de Quitosán preparadas en el estudio | 48 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| ABREVIATURA | SIGNIFICADO |
|--------------------|---|
| ANOVA | Análisis de Varianza |
| ABC | Área Bajo la Curva |
| DSC | Calorimetría Diferencial de Barrido |
| Desp. | Desprendida |
| FTIR / ATR | Espectrofotometría de Infrarrojo con Transformadas de Fourier y Reflectancia Total Atenuada |
| EC | Estrato córneo |
| HR | Humedad Relativa |
| IR | Infrarrojo |
| P adhe | Película adherida |
| P desp | Película desprendida |
| Qn | Qitosán |
| QnGli | Qitosán + Glicerol |
| QnAo | Qitosán + Ácido oléico |
| QnGliTw | Qitosán + Glicerol + Tween [®] 80 |
| QnGliTwAO | Qitosán + Glicerol + Tween [®] 80 + Ácido oléico |
| QnTw | Qitosán + Tween [®] 80 |
| QnTwAO | Qitosán + Tween [®] 80 + Ácido oléico |
| TEWL | Perdida de Agua Transepidermal |

RESUMEN

Los lípidos intercelulares del Estrato Córneo (EC) de la piel constituyen la principal barrera de permeación, por lo que el uso de promotores de absorción que actúen a ese nivel, favorece la penetración de los activos. El término de promotores de absorción se aplica a aquellas sustancias químicas que aumentan la partición y difusión de agentes activos hacia y a través de la barrera de permeabilidad. En las formulaciones tópicas y transdérmicas es necesario el uso de promotores de absorción puesto que sin ellos sería casi imposible la penetración de los fármacos a través de la piel.

El Quitosán, derivado de la Quitina, es un polímero con propiedades tales como biocompatibilidad, biodegradabilidad y atóxico, además de poseer propiedades antibacteriales. Todo esto, lo convierte en un material útil para el tratamiento de reconstrucción de la piel dañada por efecto de quemaduras graves o heridas crónicas. La producción industrial de Quitina y Quitosán se realiza, por lo general, a partir de exoesqueletos de cangrejo y camarón, desechados de las industrias pesqueras.

El objetivo de este trabajo fue preparar y caracterizar películas de Quitosán, adicionadas con Glicerol, Tween[®] 80 y Ácido Oléico (todos ellos conocidos por su eficaz acción promotora sobre piel), evaluando su efecto sobre la capacidad de barrera de las películas de Quitosán al ser aplicadas en piel dañada. Para ello, se realizaron por un lado, estudios *in vivo* mediante técnicas como el infrarrojo por Transformadas de Fourier/Reflectancia Total Atenuada (FTIR/ATR) y determinaciones de pérdida de agua transepidermal (TEWL); y por otro lado, pruebas *In Vitro* como Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) (empleando EC de paladar porcino) e intercambio gaseoso.

Se encontró que las películas con Quitosán y Quitosán+Glicerol incrementan las propiedades de barrera de permeabilidad cutánea. Con respecto

a los estudios *in vitro*, mostraron que la película Quitosán+Glicerol es un efectivo promotor a diferencia de las demás aditivos (Ácido oléico, Tween[®]80), por lo que se puede concluir que el Quitosán+Glicerol presenta un efecto sobre la barrera de permeabilidad de la piel.

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

El Quitosán es un polisacárido de cadena lineal poco frecuente en la naturaleza, que se obtiene mediante la desacetilación extensiva de la Quitina. Es un producto natural no tóxico y biodegradable de interés potencial en las áreas alimentarias y biomédicas debido a que tiene excelentes propiedades de barrera al oxígeno. En soluciones ácidas puede formar capas o películas semipermeables que pueden modificar la atmósfera interna y por consiguiente, disminuir las velocidades de transpiración. Desafortunadamente, los puentes de hidrógeno presentes en el Quitosán lo hacen sensible al agua por lo que es necesario adicionar ácidos grasos, tensoactivos y humectantes para mejorar sus propiedades de barrera sin perder su biodegradabilidad. Por otro lado, es bien sabido que estos compuestos pueden actuar como promotores de absorción en la piel, por lo que películas de Quitosán conteniendo estos aditivos, pueden ser empleadas como sistemas de liberación transdérmica. Por otro lado, la obtención de derivados solubles en agua o de alta absorción, ha permitido un mejor manejo a nivel de producción y desarrollo de nuevas formas farmacéuticas.

Entre las principales aplicaciones del Quitosán se pueden citar las siguientes: (i) promueve la pérdida de peso (absorbe y compacta las grasas); (ii) controla el nivel de colesterol; (iii) promueve la recuperación de úlceras y lesiones; (iv) tiene acción antibacterial; (v) actúa como antiácido; (vi) inhibe la formación de placa en los dientes; (vii) ayuda al control de la presión sanguínea; (viii) previene la constipación; (ix) endurece los huesos (aumenta el contenido de calcio); (x) reduce los niveles sanguíneos de ácido úrico; (xi) acción antitumoral. En los últimos años la mayoría de las investigaciones en el campo de las aplicaciones del Quitosán se han enfocado en el estudio de sus propiedades para la liberación de principios activos en el campo de la agricultura, veterinaria y medicina en general.

Es precisamente en este último campo, en el que se concentra la mayoría de los esfuerzos científicos a nivel mundial, ya que tanto el Qitosán como sus derivados han presentado excelentes propiedades físicas y químicas para desarrollar un amplio número de productos con características sumamente interesantes para el sector de la salud. Diversos estudios, han mostrado resultados muy prometedores en cuanto a la utilización del Qitosán en la liberación controlada de diferentes principios activos, como es el caso de la liberación nasal de vacunas y más recientemente se ha estudiado su aplicación en la liberación nasal de insulina (Yong *et al*, 1994, Muzzarelli *et al*, 1999)

Una de las características fundamentales del Qitosán para ser utilizado en este tipo de aplicaciones son sus propiedades mucoadhesivas, que facilitan la liberación de los principios activos directamente al tracto nasal o perioral, contribuyendo a que la asimilación del principio activo sea más rápida y efectiva. De la misma manera, sus propiedades biológicas permiten que el Qitosán sea útil para el tratamiento de reconstrucción de la piel, convirtiéndolo en una película súper delgada que sirve como soporte para las células epiteliales y, que por medio de sus características humectantes y bactericidas, es útil para personas con quemaduras graves o con problemas de la piel. (Muzzarelli *et al*, 1999)

Para el tratamiento de heridas de difícil cicatrización (quemaduras graves, úlceras) se han desarrollado diferentes materiales, en forma de esponjas o películas, que contienen medicamentos, nutrientes y biomoléculas con diferentes grados de éxito. Estos materiales deben poseer propiedades similares a la piel normal no poseer toxinas, proporcionar un ambiente que prevenga la resequeidad de la herida, reducir la penetración de bacterias, evitar pérdida de calor, agua, proteínas y glóbulos rojos, además de promover una rápida cicatrización. Con este fin se han empleado piel de cadáver (homoinjertos), piel porcina (xenoinjerto) y membrana amniótica humana, desarrollados específicamente para uso en heridas de quemaduras (Bangyekan, *et al*, 2006)

En este sentido, el Qitosán ha demostrado tener gran éxito. Es por todo lo anterior, que en el presente trabajo se prepararon y caracterizaron películas de Qitosán conteniendo diferentes aditivos (Glicerol, Tween® 80, Ácido oléico) así como las soluciones precursoras de las películas con el fin de evaluar su capacidad oclusiva sobre la piel. Esto con dos objetivos en mente, por un lado, el proponer películas capaces de formar una barrera protectora en piel dañada, fungiendo como promotor de la cicatrización; y por otro lado, el contar con sistemas que pudieran ser empleados como matrices para la liberación de principios activos en piel, considerando que los aditivos que contienen fungen como promotores de absorción transdérmica bien conocidos.

Antecedentes

2. ANTECEDENTES

2.1 QUITOSÁN/QUITINA

El Quitosán fue descubierto en 1859 por Rouget, pero no fue sino hasta 1950 que fue claramente identificado como un polímero constituido por glucosamina.

El polímero Quitosán es de interés potencial como base de películas biodegradables porque tiene excelentes propiedades de barrera al oxígeno. Puede formar capas semipermeables que pueden modificar la atmósfera interna, y por consiguiente, disminuir las velocidades de transpiración de los productos alimenticios.

El Quitosán es un producto natural no tóxico y biodegradable derivado de la Quitina, polisacárido parecido a la celulosa en el que ciertos grupos han sido sustituidos (Figura 1)

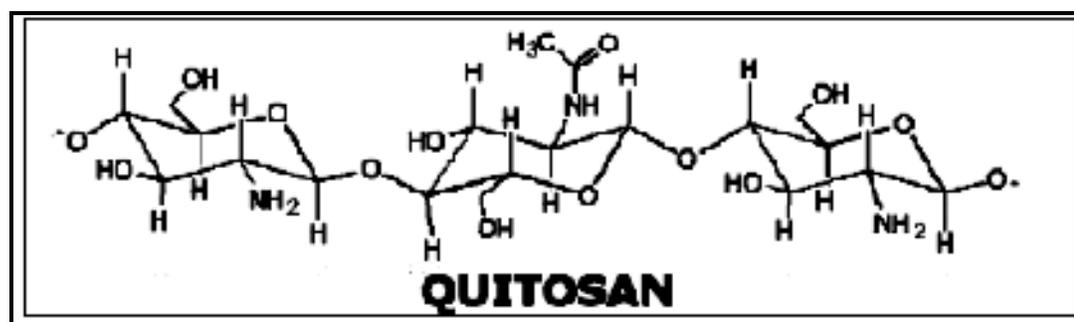


Figura 1. Estructura del Quitosán

El Quitosán se obtiene por desacetilación de la Quitina. Se considera Quitosán una vez que la Quitina es desacetilada por encima del 65%. Los dos términos, Quitina y Quitosán se confunden a menudo, aunque la Quitina es totalmente insoluble y no puede ser utilizada como tal en una formulación (García, 1998).

2.1.1 Quitina

El término *Quitina* deriva de la palabra griega *χτῶν*, que significa *túnica*, haciendo referencia a su dureza. Es el segundo polímero natural más abundante después de la celulosa.

La Quitina es un biopolímero y polisacárido proteínico (mucopolisacárido), resistente e insoluble, es el principal constituyente de los exoesqueletos, tendones, y recubrimiento de los sistemas digestivo y respiratorio de los artrópodos (moluscos, crustáceos e insectos), así como también de las paredes de las células de muchos hongos y algas.

La Quitina es una molécula fibrosa de gran tamaño constituida básicamente por azúcares N-acetilglucosamina (polisacárido parecido a la celulosa) y oxígeno, que al ser química y mecánicamente muy resistente, no puede degradarse en agua, por lo que es necesario cambiar su estructura y peso molecular para obtener un derivado soluble sin color, olor ni sabor, conocido como Quitosán. Este compuesto se consigue a través de un proceso denominado desacetilación, mediante el cual se retiran de la Quitina parte del grupo acetamido (Shimahara, 1998).

La Quitina junto con las proteínas y sales minerales aparece como constituyente estructural y de protección de los artrópodos, algas unicelulares y hongos. Químicamente se describe como β -(1-4)-2-acetoamido-2-deoxi-D-glucosa ó β -1-4-N-acetil-D-glucosamina. En la naturaleza se encuentra en distintas configuraciones (α, β, γ -Quitina) siendo la más abundante la α -Quitina (Figura 2). En este polímero los grupos amino se encuentran acetilados, correspondiendo así, a una amida de ácido acético.

Este aminopolisacárido es lineal, llega a formar miles de cadenas de N-acetilglucosamina, sin embargo puede variar el peso molecular dependiendo del método de obtención (Shimahara et al., 1998).

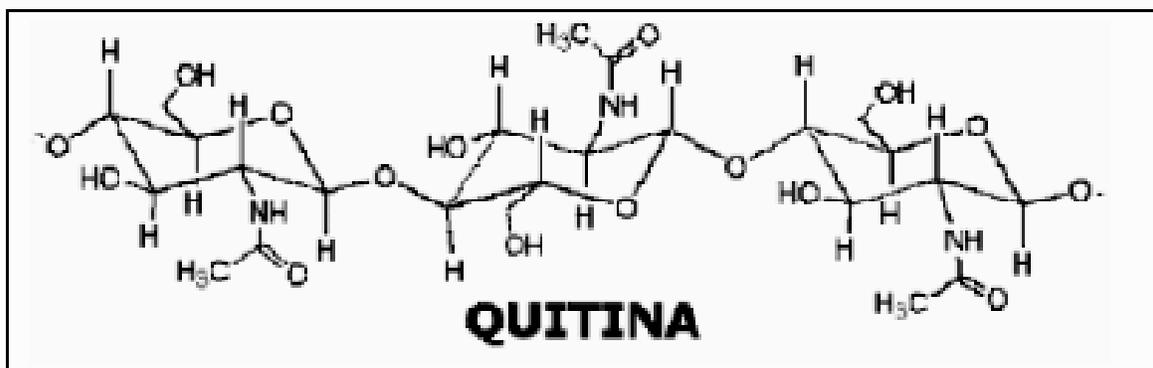


Figura 2. Estructura de la Quitina

Aunque la Quitina y la celulosa tienen una similitud estructural (el tipo de enlace intermonómero es del tipo 1,4) la diferencia entre los dos polímeros es que el grupo hidroxilo en la posición C-2 de la celulosa es reemplazado en la Quitina por un grupo acetamida (-NHCOCH₃).

La Quitina se considera como un mucopolisacárido, está conjugado con proteínas, por lo que no es únicamente una entidad polimérica, sino que es una familia de productos que derivan de los complejos de Quitina-proteína naturales (Austin et al., 1981; Knorr, 1984).

2.1.2 Propiedades Fisicoquímicas de la Quitina

La Quitina es un sólido blanco, que generalmente posee algunos grados de cristalinidad. Dependiendo de la especie de la cual provenga tiene una extraordinaria combinación de propiedades: dureza, bioactividad y biodegradabilidad. Es insoluble en agua y en solventes ordinarios como ácidos diluidos, álcalis calientes y solventes orgánicos. Solo es soluble en ácidos fuertes, en algunos fluoroalcoholes y ciertas soluciones de sales hidrotópicas, pero estos presentan el inconveniente de alterar la estructura química de la Quitina, por lo que es inconveniente su uso. Otros sistemas de disolventes más complejos tales como ácidos carboxílicos, ácido cloroacético y ácido fórmico, han sido reportados.

Una solución de LiCl/N-metil pirrolidona es atractiva para solubilizar a la β -Quitina en una mezcla de ácido fórmico clorohidrocarbano, formando películas transparentes con una simple evaporación de solvente (García, 1998).

Con una congelación y descongelación repetida de la Quitina en solución alcalina ésta puede ser totalmente disuelta y se asume que este proceso ocurre ya que la estructura de la Quitina se hace muy quebradiza (Knorr *et al.*, 1984).

La higroscopicidad de la Quitina es casi igual a la de las fibras de celulosa y considerablemente mayor que aquellas de fibras ramificadas, solo que la Quitina es menos activa y permeable en su superficie al agua que las fibras de celulosa. El poder higroscópico de la Quitina es mayor cuando es cristalina (Knorr *et al.*, 1984).

2.1.3 Propiedades Fisicoquímicas del Quitosán

El Quitosán se comporta como un poli electrólito en medio acuoso a pH's ácidos, ya que presenta una alta densidad de carga positiva atribuida a las unidades de glucosamina, por lo que interactúa fuertemente con estructuras aniónicas como proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos y otras moléculas con carga negativa, generando neutralidad eléctrica (Knorr *et al.*, 1984; Draget *et al.*, 1991). Se adhiere fácilmente a polímeros naturales semejantes al pelo y la piel, los cuales están compuestos de mucopolisacáridos y proteínas cargados negativamente.

El Quitosán también tiene una alta concentración de grupos amino primarios, confiriéndole un carácter nucleofílico básico. Bajo calentamiento, ambos compuestos se descomponen antes de fundirse (Miranda, 2000).

El polímero Quitosán es soluble en medio ácido, confiere a las soluciones cierta viscosidad, se asemeja estructuralmente al ácido hialurónico. La viscosidad de la solución depende de la concentración, pH, temperatura y presencia de ciertas sales. El polímero tiene la propiedad de formar soluciones viscosas en ácido acético o solventes miscibles en agua acidificados con ácido acético (García, 1998).

Presenta propiedades de inocuidad y de biodegradabilidad. Se utiliza como gelificante, como filmógeno hidratante. Después de la evaporación se obtiene una película. Se utiliza solo o asociado a otras moléculas biológicas de las que puede modificar sus propiedades mecánicas.

La propiedad que tiene el Quitosán para formar soluciones viscosas en ácido acético o solventes miscibles en agua acidificada con acético, lo hacen atractivo como agente espesante. La viscosidad de las soluciones de Quitosán depende en gran medida del solvente que se está utilizando, de la temperatura, pH de la solución, el grado de desacetilación, peso molecular, la presencia de sales, etc. (García, 1998).

En general, las propiedades fisicoquímicas de la solución de Quitosán teóricamente se rigen por factores tales como la temperatura, pH, fuerza iónica, grado de desacetilación y peso molecular.

2.1.4 Propiedades Estructurales del Quitosán y de la Quitina

Un análisis de la estructura de la Quitina muestra que ésta puede formar cuatro tipos diferentes de puentes hidrógeno, éstos son:

- a) Entre dos grupos hidroxilo (**HO—HO**).
- b) Entre el hidrógeno del grupo amida y los oxígenos de los grupos hidroxilo (**HO—HN**).
- c) Entre los hidrógenos de los hidroxilo y el grupo carbonilo (**C=O—HO**).
- d) Entre el hidrógeno sobre el nitrógeno de la amida y el grupo carbonilo (**C=O—HN**).

Ya que la desacetilación de la Quitina para obtener Quitosán implica la desaparición de grupos carbonilo, en el Quitosán hay un número menor de puentes de hidrógeno posibles en los que intervienen los grupos carbonilo ($\text{C}=\text{O}-\text{HO}$ y $\text{C}=\text{O}-\text{HN}$), los cuales son más fuertes que cualquiera de los otros enlaces hidrógeno, por lo que en mezclas con otro polímero, esperaríamos que el Quitosán sea más efectivo en la formación de puentes de hidrógeno que contribuyan a la ΔH_m .

Por otra parte, el grupo acetilo de la Quitina puede presentar un impedimento estérico para la formación de puentes de hidrógeno en los que intervenga el grupo hidroxilo vecino o el hidrógeno amínico, lo que resulta también en una desventaja relacionada a la compatibilidad y miscibilidad con otros polímeros (González, 2002).

2.1.5 Métodos de obtención de Quitina y Quitosán

El proceso general a nivel laboratorio para la obtención de Quitina y Quitosán a partir del caparazón de los crustáceos (Figura 3) consiste fundamentalmente en:

1. Desproteización: Remoción del material proteico.
2. Desmineralización: Eliminación de las sales minerales.
3. Desacetilación de Quitina (para obtener Quitosán).

Sin embargo hoy en día hay una gran variedad de métodos de extracción de la Quitina que consisten básicamente en emplear ácidos diluidos para la desmineralización y un tratamiento con álcali diluido a altas temperaturas para que las proteínas asociadas se solubilicen (García, 1998).

2.1.6 Áreas de aplicación del Quitosán

Ya que el Quitosán es un aminopolisácarido capaz de sufrir muchas modificaciones químicas mediante diversas reacciones adicionales, obteniéndose un gran número de derivados que presentan diferentes propiedades físicas y químicas, con diversas aplicaciones, la Quitina es considerada como un nuevo material polimérico con grandes posibilidades de aplicación con respecto a la celulosa. La hidrólisis enzimática o química de la Quitina da como resultado oligómeros de aminoazúcares (N-acetilglucosamina, quitobiosa y quitotriosa), los cuales tienen importantes usos en medicina. Cuando la hidrólisis es en medio ácido, la Quitina es transformada en quitobiosa, este es un aminoazúcar formado por dos unidades de N-acetilglucosamina (Muzzarelli *et al.*, 1986).

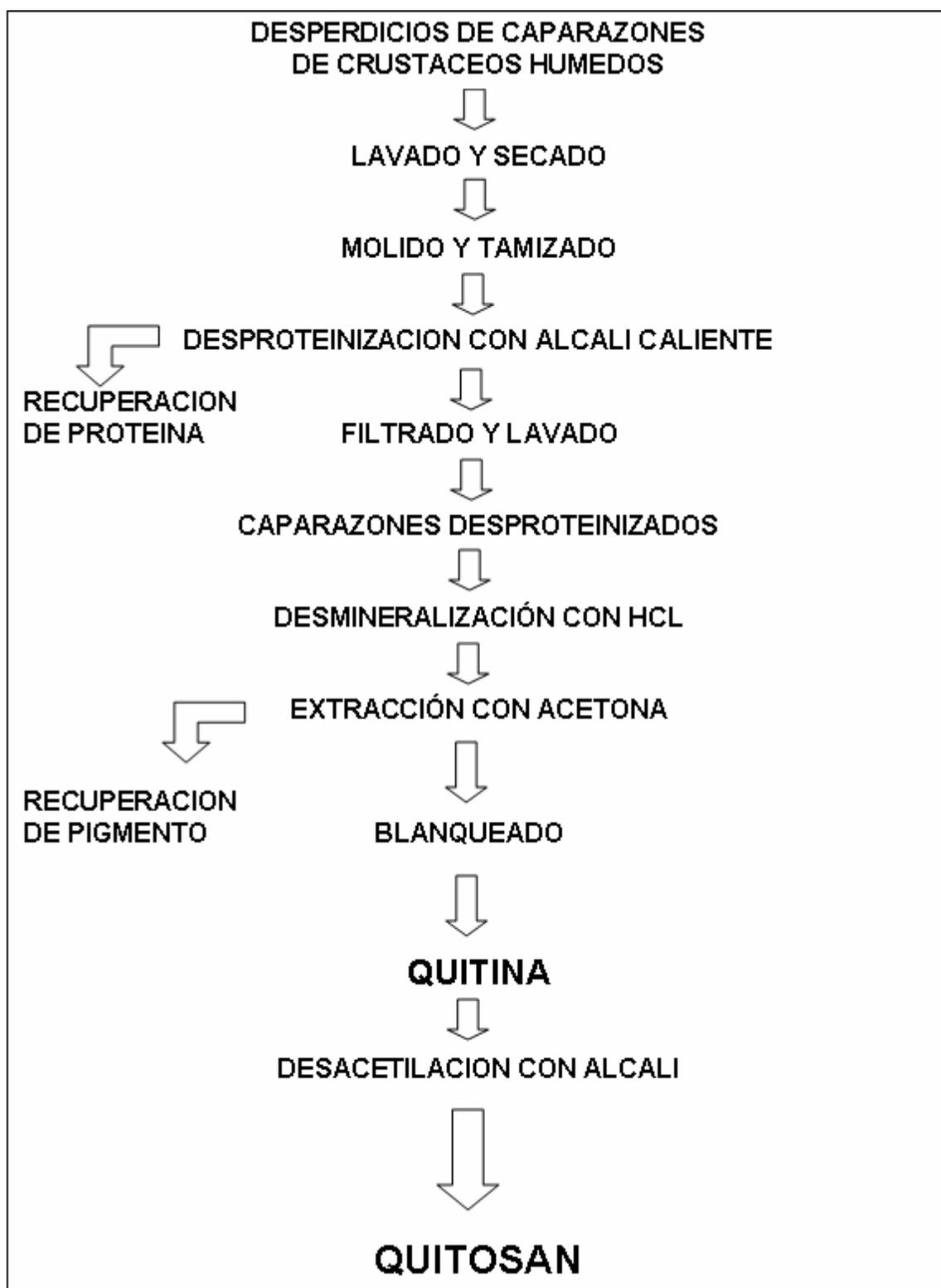


Figura 3. Esquema general de producción de Quitina y Quitosán
Fuente: No Hong K. and Meyers Samuel P. (1995).

La preparación de la Quitina coloidal consiste en la disolución y la precipitación de la Quitina en ácido clorhídrico concentrado (37% de pureza) y la dispersión del precipitado de Quitina en agua. La Quitina coloidal sirve como sustrato de Quitinasas y como fuente de carbono y nitrógeno para microorganismos quitinilíficos (Shimahara *et al.*, 1988).

Mediante una hidrólisis con ácido fosfórico en 2-propanol se obtiene la Quitina microcristalina, ésta es de más fácil dispersión, bajo peso molecular en comparación con el de la Quitina nativa, tiene poder para captar el agua y muestra buenas propiedades emulsificantes (Hackman, 1987).

El Quitosán se emplea como protector y secante, tiene actividad bioestimulante en procesos reparativos y es capaz de reconstruir tejidos. Es un cicatrizante por su acción en la superficie y sustituto de la queratina por su carácter catiónico (Martini, 2005).

Debido a sus propiedades terapéuticas altamente efectivas, ya ha sido probado con éxito en el tratamiento de úlceras varicosas y pie diabético. En biomedicina, el Quitosán ya se utiliza en la fabricación de lentes de contacto, prótesis y componente de tabletas de acción prolongada para bajar de peso o controlar el colesterol, pues atrapa las grasas, contribuye al crecimiento de bifidobacterias intestinales benéficas y es un excelente cardioprotector cuando se consume en pequeñas dosis diarias.

En dos modelos de experimentación: rata y conejo, el Quitosán en forma de esponjas y geles también demostró promover la regeneración de nervios y huesos, respectivamente, lo que a futuro podría coadyuvar en la terapia de padecimientos relacionados con los sistemas nervioso y óseo (Comunicación personal Dra. Patricia Miranda).

La importancia fisiológica de la glucosamina ha sido tratada por diversos autores. Participa en la función de la desintoxicación del hígado y de los riñones y posee actividades anti-inflamatorias, hepatoprotectoras, anti-reactivas, anti-hipóxicas (Zupanets *et al.*, 1990; Setnikar *et al.*, 1991).

Cuando se agrega al Quitosán un compuesto elemento polimérico diferente, éste adquiere propiedades mecánicas y físicas parecidas al celofán (derivado del petróleo) que se utiliza en la cocina para envolver frutas y vegetales. No obstante, a diferencia de éste, las películas de Quitosán son comestibles, se degradan rápidamente y pueden emplearse como envase de alimentos perecederos, ya que prolongan su vida útil al inhibir o controlar el crecimiento de hongos, bacterias y virus adquiridos durante la cosecha, limpieza, secado, selección, transporte y acopio.

La bibliografía reporta el uso de Quitosán para remoción de metales pesados, porque éste contiene un alto número de grupos amino libres, los cuales presentan preferencia por:

- § Aniones metálicos (en medio ácido).
- § Cationes metálicos (en pH cercano al neutro) (www.tecsup.edu.pe).

Aplicación farmacéutica del Quitosán

En los últimos años la industria farmacéutica ha puesto un gran interés en las posibles aplicaciones biomédicas del polímero Quitosán, principalmente como acarreador de fármaco. Debido a que el Quitosán puede mezclarse fácilmente con algún otro material o solvente, puede propiciar la formación de diversas estructuras como geles, tubos, polvos, películas u otras. Generalmente la liberación del fármaco es a partir de la matriz del Quitosán al estar en contacto con los fluidos corporales. El Quitosán ha mostrado ser biodegradable cuando ha sido implantado en animales de laboratorio. La degradación se debe a la enzima lisozima presente en todas las heridas.

El Quitosán, los alginatos y los glucanos $\beta(1-3)$ tienen actividad inmunoestimulante, debido parcialmente a la estimulación de TNF- α , Interleucina-1, Interleucina-6 y producción de monocitos, los cuales podrían ser muy útiles en el tratamiento de las infecciones y enfermedades virales. En algunos casos, sin embargo, la actividad inmunoadyuvante del Quitosán ha impedido el proceso de cicatrización (Miranda, 2000).

El Quitosán tiene propiedades humectantes y la capacidad de formar películas, por esta razón en los últimos años en Estados Unidos y Alemania se ha introducido como ingrediente activo y en Japón se ha estado utilizando Quitosán de bajo peso molecular en shampoo (Miranda, 2000).

La Quitina y el Quitosán tienen múltiples aplicaciones como se muestra en la Tabla 1.

| APLICACIÓN | POLIMERO |
|--|-----------------------------------|
| Agente quelante | Quitosán, Quitina |
| Aditivo en la industria papelera y textil | Quitosán, Quitina |
| Adhesivo | Quitosán, Quitina |
| Coagulante | Quitosán, Quitina microcristalina |
| En productos fotográficos | Quitosán |
| Portador de medicamentos | Quitosán, Quitina |
| Acelerador de cicatrización | Quitosán, Quitina |
| Material para suturas quirúrgicas | Quitina |
| Aditivo en la industria de los alimentos | Quitosán, Quitina microcristalina |
| Aditivo en la preparación de productos farmacéuticos | Quitosán, Quitina |
| Aditivo en la industria cosmética | Quitosán |

Tabla 1. Aplicación de Quitina y Quitosán
Fuente: Berkeley *et al*, 1977; Setnikar *et al*, 1991

Tratamiento alternativo de lesiones cutáneas

La curación de heridas es un proceso complejo. En casos de la alteración severa de la arquitectura del tejido, el proceso curativo puede conducir a la no normalidad de la morfofuncionalidad, resultado de la formación del tejido conectivo desorientado con un aspecto fibroso. Esta arquitectura anormal del tejido reduce la fuerza mecánica y conduce a la formación de una cicatriz. Los biomateriales pueden asistir a la reconstrucción fisiológica apropiada de la piel y reducir o prevenir la formación del tejido anormal de la cicatriz.

La Quitina y Quitosán, y sus oligómeros han encontrado aplicación en la promoción de la curación de la herida, especialmente en las fases de la formación y la proliferación de la matriz (Giardiono *et al.*, 1992).

La lisozima hidroliza lentamente la película de Quitosán y produce los quito-oligómeros, estos oligómeros estimulan la degradación, el montaje y la orientación correcta de las fibrillas de colágeno en componentes extracelulares de la matriz (Muzzarelli *et al.*, 1999).

El Quitosán inerte es un biopolímero ideal, no tóxico, y su actividad hemostática tópica es independiente del sistema clásico de la cascada de coagulación (Rao *et al.*, 1996).

Además promueve la fuerza extensible del tejido acelerando la formación de fibroblastos y la síntesis del colágeno en los primeros días de la curación de la herida. Esta producción de fibroblastos induce la formación de angiogénesis (Tanveer Ahmad Khan *et al.*, 2000).

Por otra parte, las películas deben ser rápida y uniformemente adherente; moldearse con la topografía y el contorno de la herida para prevenir la formación de ámpulas. La buena adherencia reduce el dolor, facilita la descontaminación, previene la canalización periférica en la herida por las bacterias, y promueve la unión a los tejidos. El vendaje con la película debe ser una barrera absoluta al ingreso bacteriano (Tanveer Ahmad Khan *et al.*, 2000). También el vendaje con la película debe ser preferiblemente permeable al vapor de agua hasta el punto que haya humedad bajo este vendaje, con el fin de que la película esté adherida a la piel. Además, la preparación debe ser compatible con los tejidos finos del cuerpo, no tóxica, no antigénica e hipoalergénica (Windra, *et al.*, 1989).

2.1.7 Propiedades de los materiales formadores de película

Los polisacáridos también pueden formar películas. Esta clase de películas incluyen las que son a base de celulosa y sus derivados, Quitosán, almidones entre otros (Butler *et al.*, 1996; Krochta 1997; Vojdani, 1990).

Debido a su relativa insolubilidad en estado natural, la Quitina es químicamente tratada para incrementar su solubilidad en agua (Butler *et al.*, 1996).

El origen de la Quitina, grado de pureza y peso molecular, determinan las diferentes propiedades y aplicaciones del Quitosán, lo que significa que mientras más desacetilado se encuentre más fácil resulta manipularlo (Shimahara *et al.*, 1998). De este modo, para la formación de las películas se debe garantizar la total solubilidad del Quitosán en agua acidificada (Austin, 1975), preferentemente con ácido acético (Butler, *et al.*, 1996; Hosokawa *et al.*, 1990; Knorr, 1984).

Las cualidades del Quitosán para formar películas dependen de la uniformidad del volumen del material y la degradación ácida durante la disolución. Una vez colocado en una solución, el biomaterial se proyecta sobre una superficie y cuando se seca es posible obtener una película (Butler *et al.*, 1996).

El mecanismo de formación de películas de polisacáridos es el rompimiento del polímero en segmentos y la formación de la cadena del polímero al interior de la matriz de la película o gel. Esto se logra mediante la evaporación de un solvente, creando enlaces hidrofílicos con hidrógeno y/o electrolíticos y enlaces iónicos (Butler *et al.*, 1996).

Las películas de Quitosán ofrecen baja resistencia al transporte de agua debido a su alta hidrofilia. La adición de ácidos grasos tiene el fin de proveer hidrofobia para aumentar la resistencia a la transmisión de agua (Garnica, 2001).

2.1.8 Películas con lípidos

Los lípidos son los más eficientes como barreras a la humedad debido a su carácter hidrofóbico. Algunos estudios han mostrado que la eficiencia de barrera es principalmente debido a la fase lipídica, pero puede ser afectado por otros compuestos (Garnica, 2001).

Lípidos con bajos puntos de ebullición, tales como los aceites vegetales, ácido oléico y alcohol mirístico, exhiben propiedades superiores de barrera presumiblemente debido a su estructura uniforme y menos canales entre las placas cristalinas a través de las cuales el agua puede migrar fácilmente

La eficiencia de la permeabilidad al vapor de agua depende de la naturaleza de los lípidos, el largo de la cadena de los ácidos grasos y la estructura de la emulsión que constituye la película. Las propiedades funcionales de las películas a base de lípidos son parcialmente explicadas por la naturaleza del lípido (polaridad) y su estructura (contenido de sólido graso o grasa sólida), así como por el tipo de cristal, sin embargo estos parámetros siempre han sido estudiados independientemente. Los lípidos más hidrofóbicos producen las mejores barreras a la humedad (Garnica, 2001).

2.1.9 Películas con plastificante

El plastificante reduce las fuerzas intermoleculares a lo largo de la cadena polimérica. Los grupos polares (-OH) del plastificante desarrollan puentes de hidrógeno a lo largo de la cadena polimérica reemplazando las interacciones polímero-polímero (Garnica, 2001, Gontard, 1993). Así como también ablandan la rigidez de la estructura de la película y aumentan la movilidad de las cadenas biopoliméricas, mejorando así las características mecánicas. Uno de estos plastificantes es el glicerol el cual mejora la flexibilidad de la película, reduce la fuerza de ruptura de la película, brinda elasticidad y modifica las características de la barrera al vapor de agua de las películas del gluten del trigo (Gontard, 1993).

El peso molecular, configuración y número total de grupos funcionales hidroxilos del plastificante así como también su compatibilidad con el polímero, pueden afectar las interacciones entre el plastificante y el polímero dando como resultado un incremento en la movilidad de las cadenas poliméricas y por consiguiente películas más flexibles.

El glicerol es el más reportado en la literatura como el mejor plastificante. Este es un humectante, su acción de plastificación se debe a su habilidad para retener agua, estas moléculas de agua actúan como plastificante, que es el más común y muy difícil de regular en películas hidrofílicas (Garnica, 2001). Sin embargo, la adición excesiva de glicerol causa un aumento substancial en la absorción de la humedad (Bangyekan *et al.*, 2006).

2.1.10 Películas de Quitosán como protección de piel dañada

Las películas de Quitosán son un sistema de regeneración dérmica y epidérmica, una especie de piel artificial que, colocada sobre quemaduras graves, no sólo facilita la respiración de las células vivas de la herida; es decir, el intercambio de gases (bióxido de carbono por oxígeno y agua) para producir en el paciente un efecto analgésico y anti-inflamatorio, sino que además promueve el crecimiento de tejido sano y evita el ingreso de microbios infecciosos.

Esto es muy importante, debido a que el mayor número de muertes registradas por quemaduras se debe a la pérdida de humedad (deshidratación) de la piel, mientras que la presencia de poblaciones bacterianas dificulta su rehabilitación. Su desarrollo se basa en una membrana o película biológica elaborada a partir del Quitosán. Además, sirve de soporte para que las células de la piel quemada se regeneren. La membrana de Quitosán ofrece la ventaja de ser biocompatible y puede degradarse en forma natural dentro de los siguientes días a su aplicación, gracias a la labor de una enzima (lisozima) localizada en fluidos corporales como las lágrimas y el sudor.

2.2 LA PIEL

2.2.1. Generalidades

La piel es una de las partes más extensas y accesibles del cuerpo humano con una extensión de 1936 cm² y un grosor de una fracción de milímetros, es un órgano dinámico y complejo que cuenta con múltiples funciones como: regular la pérdida de calor, transmitir los estímulos que le llegan, reflejar problemas sistémicos, brindar protección entre el medio exterior e interior; evitar la pérdida de agua y la entrada de sustancias extrañas, debido a que cuenta con una barrera de permeabilidad altamente eficiente previniendo el transporte molecular (Chien, 1982). La piel está formada por tres capas. De la más externa a la más interna se denominan: epidermis, dermis e hipodermis (Figura 4).

La piel es una membrana muy heterogénea que contiene una gran variedad de tipos de células; no obstante la capa que controla la absorción es el EC (Stanley, 1982). El epitelio es predominantemente de naturaleza lipofílica, siendo por tanto particularmente impermeable al transporte pasivo de sustancias hidrofílicas, incluyendo especies con carga (Ganem, 1998).

La barrera de permeabilidad se sitúa en varias capas de células firmemente empaquetadas formando la superficie de la epidermis. La protección mecánica la proporciona la dermis subyacente más gruesa que se compone primordialmente de tejido conjuntivo, formado por sustancias secretadas por las células. La epidermis aislada es tan impermeable como la piel completa. Al eliminarse la epidermis, la dermis es totalmente permeable, si es removida la epidermis como por tape stripping, la permeabilidad de la piel es aumentada, no existiendo duda que el EC constituye la barrera de permeabilidad (Cazares, 2003).

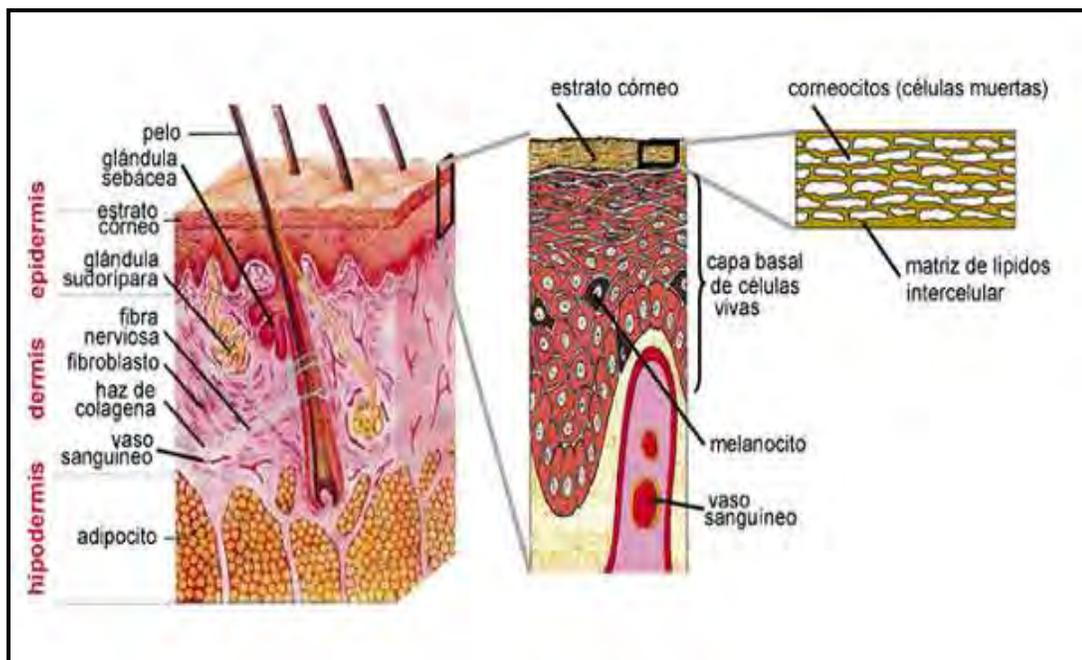


Figura 4. Capas de la piel

www.hipernatural.com/images/skin.jpg

2.2.2 Capas de la Piel

2.2.2.1 Epidermis

La epidermis como epitelio de superficie, es un epitelio plano poliestratificado queratinizado conformado por cinco capas:

- § Estrato basal. Produce y prolifera nuevas células.
- § Estrato espinoso: Confiere cierta resistencia contra la fricción.
- § Estrato granuloso: Conforman una sustancia aceitosa que determinan que las capas subyacentes se nutran y sirvan como barrera de los fluidos corporales.
- § Estrato lúcido: Aporta elasticidad en los puntos de estrés mecánico particularmente intensos.
- § Estrato córneo (capa córnea): Actúa como una barrera que provee protección mecánica y química.

El espesor de la epidermis (incluida la capa córnea) varía según la región cutánea entre 0,04 y 0,4 mm.

La epidermis está constituida por aproximadamente un 90% de las células epidérmicas (queratinocitos), pero además contiene células de Langerhans (sistema inmune), melanocitos (sistema pigmentario) y células de Merkel (sistema nervioso).

A nivel funcional se pueden distinguir tres regiones en la epidermis que se renuevan desde la base de modo permanente:

1. Zona proliferativa (estrato basal): Renovación celular, denominada epidermopoyesis.
2. Zona de diferenciación (estrato espinoso y granuloso): Diferenciación y maduración celular.
3. Zona funcional (capa córnea): Formación de una capa córnea protectora, eliminación celular.

2.2.2.1.1 Estrato córneo (EC)

Está formado por células muertas, queratinizadas y lípidos que están estructurados en una bicapa lamelar, proporcionando así una barrera hidrofóbica, que constituye la principal barrera de permeabilidad, participa de manera muy activa en el fenómeno de hidratación de la piel, y por lo tanto, tiene un papel estético preponderante (Allan *et al.*, 1995; Martini, 2005).

En la capa cornea existen dos capas invisibles llamadas manto gaseoso y manto ácido, que rodean a la piel del individuo y lo ponen en contacto con el medio exterior.

El *manto gaseoso* está formado por una capa de aire más caliente, con más contenido de CO₂ y vapor de agua resultante de la evaporación del sudor.

Marchionini en 1928 describió el *manto ácido*, como una emulsión formada por la secreción sudoral y sebácea, dando origen a dos fases: Agua en aceite cuando es más abundante la grasa y aceite en agua cuando es lo contrario. El pH de la piel debido a este manto ácido es de 5.5, mientras que la dermis es alcalina con un pH de 7.0 a 7.2. En la acidez de la epidermis influye el CO₂ y los aminoácidos (Saúl, 1979).

El EC está formado por tres capas:

- § Estrato lúcido (presente solamente en las palmas de las manos y en las plantas de los pies).
- § Estrato compacto, que constituye la capa córnea propiamente dicha.
- § Estrato disjonctum (capa más externa, descamante).

El conjunto de estas tres capas tiene un espesor entre 10 µm y 20µm.

La capa córnea tiene una propiedad y una composición bioquímica totalmente diferente a las de las capas subyacentes de la epidermis.

Las células que la componen (córneocitos) representan la última fase de la queratinización. Estas células, en ocasiones consideradas células muertas, están desprovistas de núcleo y están formadas casi exclusivamente por queratina.

La piel posee capacidad amortiguadora en la película superficial cutánea y es una barrera a la penetración. Contiene, sin embargo, un cierto número de enzimas que participan en los fenómenos de metabolismo. Además, son ricas en una mezcla de sustancias higroscópicas que aseguran la fijación del agua.

El conjunto de queratina más lípidos es responsable del efecto barrera. Este efecto se pone de manifiesto al impedir la penetración a través de la piel de sustancias exógenas, pero igualmente al disminuir la difusión del agua procedente de las capas más profundas de la dermis. Participa por tanto de manera activa en la hidratación cutánea.

Este efecto barrera puede testimoniarse con diferentes ejemplos:

- § Si con un adhesivo arrancamos sucesivamente las capas del EC (stripping), la permeabilidad de la piel aumenta. Con escaras, quemaduras, enrojecimientos, conseguimos el mismo resultado. Para que el efecto barrera se manifieste se requiere la integridad del EC.
- § Si hidratamos la piel de manera excesiva (parche oclusivo), las células córneas hiperhidratadas pierden su capacidad de barrera y se vuelven permeables en los dos sentidos. El efecto barrera se ve así considerablemente afectado por el grado de hidratación cutánea.
- § Si la piel es deshidratada, pierde su flexibilidad y se cuartea, ya que el agua actúa como un plastificante de la queratina (Martini, 2005).

2.2.2.1.2 Lípidos de la epidermis

La capa lipídica es el elemento fundamental de la impermeabilidad de la piel en conjunto con el EC. Su formación se lleva a cabo durante la diferenciación celular en la cual cambia la composición de los lípidos de polares a lípidos neutros. Durante la diferenciación celular, los lípidos se sintetizan en la epidermis a partir de acetato, por vía de glicólisis anaerobia. Los lípidos se encuentran contenidos en los gránulos lamelares y son depositados en la superficie cutánea intercelular, donde se lleva a cabo la formación de hojas multilaminares de lípidos no polares, que determinan una zona de muy alta hidrofobia. También se depositan enzimas ácido hidrolasas, encargadas de la degradación de los glicolípidos a ceramidas (Lampe *et al.*, 1983)

Los principales lípidos de la superficie cutánea son los lípidos neutros, esfingolípidos o ceramidas y el colesterol; los lípidos neutros y las ceramidas se encuentran presentes en un 60% en la capa espinosa y granular, y en un 95% en el EC; el colesterol se encuentra en bajas concentraciones en la capa basal (donde predominan la esfingomielina, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina) y va aumentando durante la diferenciación celular. (Fitzpatrick *et al.*, 1999)

Ya en la capa lipídica superficial del EC se encuentran lípidos neutros en un 60-70%, esfingolípidos de 18-35% y colesterol de 10- 25%. Se ha encontrado que existe una relación inversa entre el total de lípidos neutros presentes y la permeabilidad de la piel, mientras que los esfingolípidos se han relacionado con una mayor permeabilidad acuosa, teniendo una distribución inversa con los lípidos neutros de la superficie corporal. Los lípidos neutros se encuentran en mayor concentración en abdomen donde la permeabilidad es baja, y en baja concentración en las plantas donde la permeabilidad acuosa es alta a pesar del grosor de la capa córnea. (Fitzpatrick, *et al.*, 1999)

Las mucosas poseen un 15% menos de lípidos en su superficie, con un bajo porcentaje de ceramidas, y particularmente de ácido linoléico (21%), contienen 1/10 de hidroxiceramidas y retienen aún niveles significativos de fosfolípidos (13%), lo que les confiere mayor permeabilidad que la de la piel, ya que la concentración de ceramidas, colesterol y ácidos grasos libres en los espacios intercelulares determinan de manera importante la función de barrera de la piel (Madison *et al.*,1987; Wertz *et al.*, 1988).

2.2.2.1.3 Unión dermoepidérmica

La dermis y la epidermis están adheridas por la “unión dermoepidérmica”. Esta es una capa fina que se localiza debajo de la capa basal, está formada por la membrana basal y varias sustancias que se encuentran en capas, tales como glicoproteínas, colágeno de tipo IV, fibronectina. El conjunto capa basal-unión dermoepidérmica tiene una estructura ondulada característica de las pieles jóvenes. Con el envejecimiento esta estructura se aplanan y la piel se distiende (Martini, 2005; Barry *et al.*, 1995).

2.2.2.2 Dermis

La dermis tiene un espesor que varía de 500 μm a 1mm. La dermis conjuntiva está conformada por la dermis papilar y la dermis reticular.

Dermis papilar. Tejido conjuntivo superficial, delgado y rico en células y vasos sanguíneos. Su superficie forma papilas y contiene numerosos capilares. Este solapamiento e incremento de la superficie de contacto explica la unión mecánica entre la epidermis y la dermis, así como también la nutrición de la epidermis carente de vasos y la cooperación en las reacciones defensivas.

Dermis reticular. La capa más profunda y gruesa es rica en fibras, aporta firmeza al tejido conjuntivo cutáneo y se confunde en profundidad con el tejido subcutáneo. Contiene los anexos cutáneos, los vasos sanguíneos y linfáticos y los nervios. La dermis contiene (como todos los tejidos conjuntivos) células fundamentales, fibras y sustancia fundamental (matriz-extracelular).

Ambas están formadas por:

§ Proteínas

- *Colágeno*. Macromolécula ensamblada en fibras que le confiere resistencia a la piel.
- *Elastina*. Macromolécula que se organiza en haces y le da elasticidad a la piel.
- *Fibras oxitalánicas*.

§ *Un gel de proteoglicanos* (o mucopolisacáridos). Los proteoglicanos están formados por una proteína portadora asociada a glucosaminoglicanos (entre ellos ácido hialurónico, posiócido aminado, capaz de fijar el agua) pero también moléculas sulfatadas. Captan las moléculas de agua y constituyen un gel, reserva de agua para la piel.

§ *Células*, principalmente fibroblastos, fibrocitos y fusiformes que sintetizan proteínas y proteoglicanos (Martini, 2005).

Función de la dermis

La dermis tiene dos funciones muy importantes, servir de reservorio de agua gracias al gel de proteoglicanos y asegurar el mantenimiento de las propiedades mecánicas de la piel.

pH cutáneo

El pH de la dermis, cercano a 7, se transforma en un pH ácido, cercano a 5 en la superficie de la piel. Este aumento considerable de la actividad de los iones H^+ se debe a las hidrolasas de la epidermis que generan varios ácidos hidrosolubles, en particular, el ácido urocánico, el ácido pirrolidon carboxílico y el ácido láctico. Estos ácidos proceden en su mayor parte de la desintegración de la filagrina y se considera que los ácidos grasos no intervienen de manera sensible en el establecimiento del pH de la piel. El descenso del pH a lo largo del proceso de queratinización se manifiesta muy rápidamente y se puede poner de manifiesto con la técnica del stripping o arranque de capas sucesivas de células del EC.

La acidez cutánea es una característica importante de la piel, y se observa que prácticamente todas las dermatosis se acompañan de una alcalinización.

El pH cutáneo es variable según los individuos y las zonas corporales. Se sitúa generalmente entre 4 y 7, la media es de 5.5 (Martini, 2005).

El pH está influenciado por diversos factores: Aumenta con la edad, es más alcalina en las mujeres, aumenta con diversos factores externos como el lavado con detergentes (Martini, 2005).

El pH cutáneo está regulado por la excreción del sudor. La secreción de la glándulas ecrinas se compone, entre otras cosas, de ácido láctico, ácido undecilénico y de ácido urocánico.

Esta secreción ácida representa un medio de defensa de la piel frente a los microorganismos. En consecuencia, las preparaciones alcalinas no son recomendables aunque la piel posea una capacidad amortiguadora eficaz. Este poder tampón restablece rápidamente el pH inicial, unas dos horas después de la limpieza.

Las agresiones sucesivas por sustancias alcalinas pueden alterar la eficacia del poder tampón. Además, este poder tampón es menos eficaz en las personas mayores y en los niños (Martini, 2005).

2.3 PROMOTORES DE ABSORCIÓN QUÍMICOS

2.3.1 Generalidades

Los promotores de absorción son sustancias químicas que incrementan la partición y difusión de agentes activos hacia y a través de la barrera de permeabilidad.

Walters (1989), clasifica de forma general a los Promotores de Absorción Químicos como:

1. *Solventes* (agua, alcoholes, pirrolidonas, Azona y derivados).
2. *Surfactantes* (Catiónico, Aniónico, No iónico, Ácidos grasos y alcoholes grasos).
3. *Otros* (Urea, Terpenos, Tioglicolatos de calcio, Ciclodextrinas).

La mayoría de estas sustancias son absorbidas en diferentes grados a través de la piel. La irritación (ardor, urticaria, comezón) y la dermatitis de contacto pueden contribuir en la absorción de éstos.

Las características ideales que deben de tener los promotores de absorción son las siguientes (Ganem *et al.*, 1998; Langer *et al* 2005, Villarino *et al*, 2006):

- § Inertes química y farmacológicamente.
- § Absorción sistémica mínima ó nula.
- § Inicio del efecto rápido y reversible.
- § Tipo y duración de actividad predecible y reproducible.

- § Químicamente estable.
- § Compatible con excipientes y fármacos de la formulación.
- § Atóxico, no irritante e hipoalergénico.
- § Inodoro, incoloro.

2.3.2 Mecanismo de acción

El mecanismo exacto por el cual las sustancias promotoras aumentan la penetración de fármacos a través de la piel no ha sido dilucidado en forma completa y, es probable que tengan múltiples efectos una vez que acceden al EC. Se han propuesto un gran número de acciones para estos compuestos que explican el incremento en la permeabilidad observada *in vivo*. En general se pueden mencionar las siguientes:

Acciones que incrementan la permeabilidad de la piel:

- § *Desnaturalización, modificación o extracción de la queratina intracelular*, causando un aumento de la hidratación (incremento del coeficiente de difusión del fármaco en el EC) (Ganem *et al.*, 1998; Villarino *et al.*, 2006).
- § *Alteración de los desmosomas*, que mantienen la cohesión entre los córneocitos (desordenamiento de la estructura del EC con un incremento de la difusividad (Villarino *et al.*, 2006).
- § *Modificación de la barrera lipofílica de la membrana*, volviéndola más permeable a las especies polares.
- § *Incremento de la fluidez de las bicapas lipídicas de la membrana*. La disrupción del paquete lipídico intercelular ya sea por interacción del promotor con los lípidos o con los componentes protéicos, puede incrementar la permeabilidad cutánea.

Se ha llegado a demostrar por métodos biofísicos (Espectroscopía Infrarroja y Calorimetría Diferencial de Barrido) existe una relación entre la fluidez lipídica y la permeabilidad; el incremento de la fluidez se atribuye a que los lípidos sufren una transición de una fase gel (rígida) a una fase líquido cristalina, con una reducción de la temperatura de transición vítrea. Un incremento reversible de la fluidez de los lípidos intercelulares puede ser considerado como un efecto no tóxico (Ganem *et al.*, 1998; Villarino *et al.*, 2006).

§ *Incremento de la hidratación del EC.* Aunque no existen teorías firmes sobre cómo el agua afecta el transporte de una sustancia parece ser que actúa por solvatación de las cabezas polares de los lípidos principalmente glicosfingolípidos y ceramidas (Ganem *et al.*, 1998).

2.3.2.1 Mecanismo de acción de los surfactantes

Comúnmente su efecto promotor se atribuye a una interacción con los lípidos intercelulares, lo que aumenta la fluidez de la membrana y por tanto su permeabilidad, sin embargo también son capaces de interactuar con las proteínas, desnaturalizándolas o incluso extrayéndolas.

El modo de acción de los surfactantes no iónicos (Tween[®], éteres de alquilo, éteres de arilo, poloxámeros) se liga a un aumento en la fluidez de la membrana y a su capacidad para solubilizar y extraer componentes. En la Figura 5 se muestra la estructura química del Tween[®] 80.

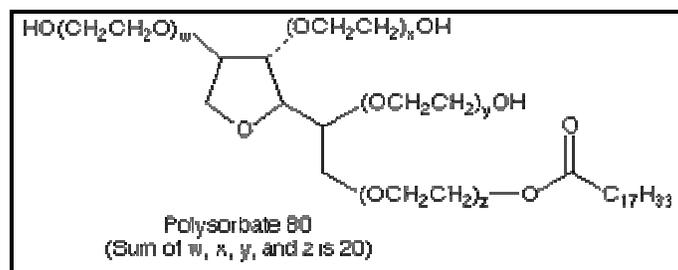


Fig. 5. Estructura del Tween[®] 80

2.3.2.2 Mecanismos de acción de ácidos grasos (Ácido oléico).

El efecto de los ácidos grasos sobre la membrana depende de varios factores como son: El número de dobles enlaces, la longitud de la cadena, la posición, tipo (cis /trans).

Han resultado altamente eficientes los compuestos que tienen una cadena alquílica larga comúnmente entre 12 y 18 carbonos y una cabeza polar. La Figura 6 muestra la estructura del ácido oléico. Aparentemente la cabeza polar interactúa con los grupos polares de los lípidos de la piel mientras que la cadena alquílica se inserta entre las cadenas de la bicapa, rompiendo su orden, lo que provoca mayor fluidez entre ellos, y un aumento en la difusión del activo a través de la membrana. Se ha visto un mayor efecto entre los grupos metilenos inmediatamente adyacentes a las cabezas polares de los lípidos de la piel, pues se empaquetan entre ellos herméticamente, dejando cierto espacio al otro lado (López, 2003).

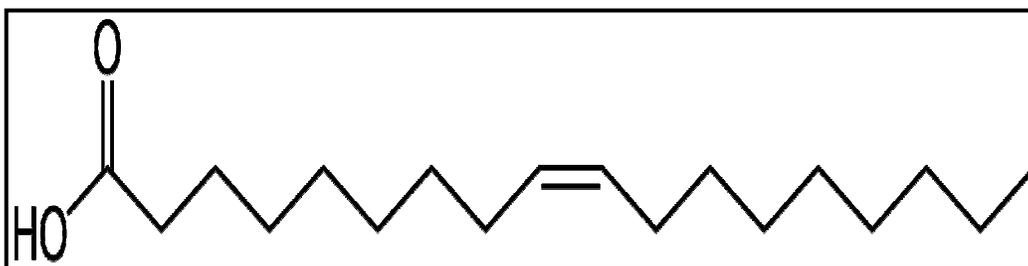


Fig. 6. Estructura del ácido oléico

La combinación de sustancias promotoras de absorción puede considerarse como una alternativa en el desarrollo de las formulaciones. Se ha reportado que la combinación de dos o más promotores de absorción conduce a un sinergismo. Inclusive un grado mayor de mejoramiento en la penetración de fármacos tras la aplicación epicutánea podría lograrse combinando métodos físicos y químicos (Villarino *et al*, 2006).

2.4 TÉCNICAS APLICADAS PARA EVALUAR EL ESTADO DE LA BARRERA

2.4.1 Pérdida de agua transepidermal (TEWL)

El principio de medición del Tewameter

La base física para la medición de la pérdida de agua transepidermal es la **ley de difusión** descubierta por Adölpf Fick en 1855.

$$\frac{dm}{dt} = D * A * \frac{dp}{dx}$$

donde:

A = superficie en m²

m = agua transportada (en g)

t = tiempo (h)

D = constante de difusión (0,0877 g/m*h*mm Hg)

p = presión de vapor de la atmósfera (mm Hg)

x = distancia de la superficie de la piel al punto de medición.

El flujo de difusión dm/dt indica la masa por cm^2 que se transporta en un periodo de tiempo. Es proporcional al área A y al cambio de concentración por la distancia dc/dx . D es el coeficiente de difusión del vapor de agua en el aire. Esta ley es válida solamente dentro de una zona de difusión homogénea, que es aproximadamente la que forma un cilindro hueco. El gradiente de la densidad resultante se mide de manera indirecta con dos pares de sensores (temperatura y humedad relativa (Figura 7) y se analiza en un microprocesador. Los sensores de temperatura y humedad, así como los datos electrónicos de la medición y los datos de calibración se encuentran dentro de la sonda. La cabeza de medición es un cilindro hueco angosto (10 mm de diámetro y 20 mm de altura), para minimizar las influencias de cualquier turbulencia dentro de ésta.

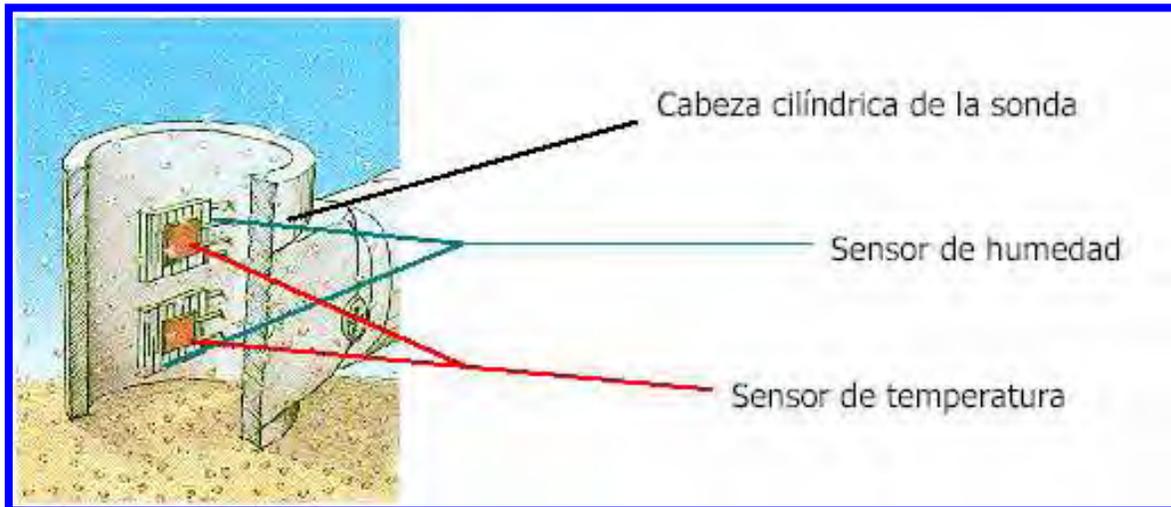


Fig. 7 Esquema de la cabeza cilíndrica de la sonda del Tewameter Courage-Khazaka TM 210[®]

Usando un microprocesador y dos pares de sensores en la sonda es posible recibir la información de la temperatura y humedad correspondientes a cada valor de TEWL durante la medición completa.

La Pérdida de Agua Transepidermal (TEWL, por sus siglas en inglés) mide el proceso de difusión de agua a través de la piel, el cual como ya se mencionó anteriormente obedece a la primera Ley de Fick. El TEWL se obtiene midiendo de forma cuantitativa el gradiente de presión de vapor entre la superficie de la piel y el aire ambiental (por la evaporación de agua de la superficie de la piel). Todo esto es detectado por medio de un sensor. El TEWL se expresa generalmente en unidades de g/h m^2 .

El TEWL se emplea para determinar el efecto de ciertas sustancias o vehículos sobre la piel, considerando que el EC tiene un efecto barrera que evita la pérdida de agua y que los valores normales de TEWL sean de 8 a 12 g/hm^2 , un incremento en el TEWL implicaría una disminución en la función de barrera.

2.4.2 Espectroscopía de Infrarrojo por Transformadas de Fourier/Reflectancia Total Atenuada (FTIR/ATR)

Una sustancia puede absorber o transmitir radiación cuando se hace pasar por ella un haz de luz electromagnética, esto depende de la estructura molecular y de la frecuencia. Una molécula gana energía una vez que esta absorbe radiación. La cantidad de energía ganada depende de la frecuencia de la radiación; por ejemplo cuanto menor es la frecuencia (o más larga la longitud de onda), menor es la cantidad de energía ganada. La propiedad que da más información de la estructura de un compuesto orgánico es su espectro de infrarrojo. La región de infrarrojo (IR) dentro del espectro electromagnético cubre el intervalo que queda justo por debajo del visible. Dado que una molécula gana energía cuando absorbe radiación, esta energía debe distribuirse en la molécula de algún modo, la molécula vibra constantemente, sus enlaces se alargan y se contraen (García, 1998).

En consecuencia, cuando una molécula absorbe radiación infrarroja, la vibración molecular aumenta en intensidad, por lo que cada frecuencia de luz absorbida por una molécula corresponde a la vibración de un enlace específico (grupo funcional). Puede verse qué tipo de vibraciones moleculares presenta una muestra determinando la absorción cuantificada mediante un espectro de IR. Este en bandas, debido a que los cambios de energía vibracional simple van acompañados de varios cambios de energía rotacional. Las bandas de interés son de $4000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ (Stanley, 1982).

La radiación infrarroja hace que los grupos de compuestos y los átomos vibren alrededor de los enlaces covalentes que los unen a pesar de que tiene suficiente energía para provocar la excitación, no todas las vibraciones moleculares producen absorción de energía. Para que se produzca una vibración de energía infrarroja el momento bipolar de la molecular debe cambiar al mismo tiempo que se verifica la vibración.

El espectro de IR es una gráfica de radiación transmitida contra longitud de onda. La frecuencia o la longitud de onda de absorción dependen de las masas relativas de los átomos, las constantes de fuerza de los enlaces y la geometría de los átomos.

La radiación transmitida se expresa mediante la transmitancia (T) o la absorbancia (A). La mayoría de los grupos funcionales provocan absorciones características en el IR; es decir, un grupo específico absorbe luz de frecuencias determinadas, que son prácticamente las mismas de un compuesto a otro (García, 1998).

FTIR/ATR se basa en que las moléculas absorben energía infrarroja a ciertas frecuencias específicas para cada grupo funcional lo que en el EC corresponde a los componentes de la membrana, observando un espectro de absorción característico (López., 2003).

Todas las moléculas absorben radiación infrarroja (a excepción de las moléculas homonucleares). La espectroscopía de infrarrojo (FTIR/ATR) estudia las vibraciones moleculares de las especies absorbentes. Aunque el número de vibraciones del EC es grande, las vibraciones de estiramiento que originan las cadenas alquílicas carbono-hidrógeno (CH_2) de los lípidos intercelulares del EC han sido estudiadas ampliamente, especialmente los dos picos cercanos a 2850 cm^{-1} y 2920 cm^{-1} que representan la vibración de estiramiento simétrico y asimétrico respectivamente. Estas dos bandas indican la naturaleza conformacional de las cadenas alquílicas. Generalmente, desplazamientos de estas vibraciones de estiramiento a números de onda mayores son indicativos de un incremento en isómeros rotacionales del tipo “gauche” a lo largo de la cadena alquílica, lo que genera una mayor libertad de movimiento de los lípidos de la barrera de permeabilidad del EC llamada comúnmente *fluidización* (Naik, *et al*, 1997).

2.4.3 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido (DSC por sus siglas en inglés) consiste en calentar una muestra (S, como se presenta en la Figura 8) así como una celda de referencia (R) de tal manera que la temperatura es en todo momento igual en R y en S. Esto se consigue midiendo las temperaturas con sensores y ajustando las potencias de calentamiento. Se aplican velocidades de calentamiento (en grados/s) uniformes a la muestra y a la referencia para realizar el barrido de temperaturas.

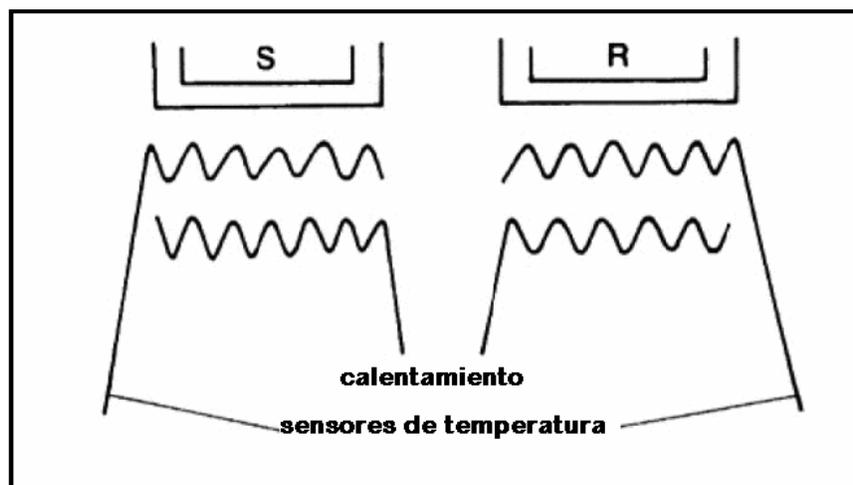


Fig. 8 Principio del DSC.

Una muestra (S) y una referencia (R) se calientan de manera controlada por los sensores de temperatura.

La representación de la potencia de calentamiento frente a la temperatura es lo que se denomina diagrama DSC o, dado que se realiza frente a la temperatura, termograma.

Un ejemplo de termograma se encuentra en la Figura 9. La DSC detecta transiciones que implican intercambio de energía, sea almacenamiento de calor (procesos endotérmicos) o liberación de calor (procesos exotérmicos).

Ejemplos de estos procesos son las transiciones de fase (sólido-sólido o sólido-líquido por ejemplo), procesos de cristalización, oxidaciones irreversibles, deshidrataciones, etc. Esta técnica también resulta muy adecuada para comprobar la pureza de un material, examinando la forma y el ancho del pico obtenido (Michael, 2001; Babur, 1997).

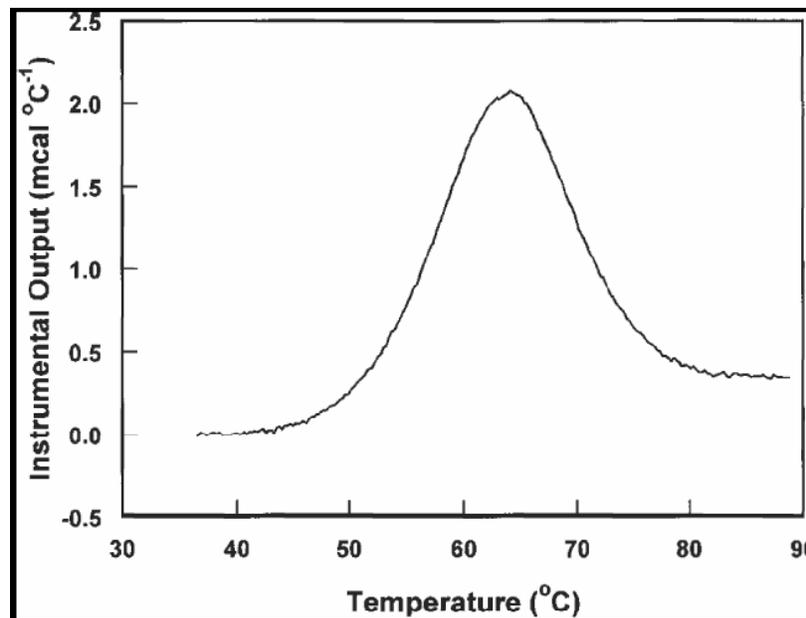


Figura 9. Ejemplo de termograma DSC

Para muestras biológicas, esta técnica está considerada hoy en día como la más adecuada para estudiar la energía de las transiciones plegamiento-desplegamiento de las proteínas. Permite la caracterización termodinámica de los cambios conformacionales inducidos por cambios de temperatura en proteínas, ácidos nucleicos y biomembranas (Michael, 2001; Babur, 1997).

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- § Preparar, caracterizar y evaluar películas de Quitosán conteniendo diferentes aditivos, para ser empleadas como recubrimiento protector para piel dañada.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- § Preparar películas de Quitosán conteniendo diferentes aditivos (Glicerol, Tween[®] 80 y Ac. Oléico) por la técnica de bastidor.
- § Caracterizar las películas preparadas por su uniformidad de grosor y morfología (esta última mediante microscopía electrónica de barrido).
- § Evaluar las propiedades de barrera de las películas de Quitosán conteniendo diferentes aditivos, midiendo el intercambio gaseoso *in vitro* empleando un Tewameter.
- § Determinar las propiedades de barrera de las películas y su interacción con los componentes cutáneos, mediante FTIR/ATR y pérdida de agua transepidermal (TEWL) en piel sana *in vivo* y por DSC en EC aislado del cerdo.

Metodología

4. METODOLOGÍA

4.1. MATERIALES

4.1.1. Reactivos

- § Quitosán grado de desacetilación mayor de 90% (P.M 151,000 Da).
- § Ácido acético (Fermont, México).
- § Agua destilada de calidad Mili-Q (Millipore Inc., Bedford, USA).
- § Glicerol (JT Baker, Alemania).
- § Tween[®] 80 (Sigma, USA).
- § Ácido oléico (JT Baker, Alemania).
- § Biftalato de potasio (JT Baker, Alemania).

4.1.2. Aparatos y Equipos

1. Balanza analítica (BBC 32 Boeco, Alemania).
2. pH metro (Corning 430, UK).
3. Vernier Digimatic con una resolución de 0.001mm (Mitutoyo, USA).
4. Tewameter TM 210 (Courage+Khazaka, Alemania).
5. Espectrofotómetro de Infrarrojo por Transformadas de Fourier, con celdas de ATR, FTIR-8300. Contiene un cristal ATR de forma trapezoidal de 80 x 10 x 4 mm, con ángulo de corte de 45°, una resolución de 4 y la sensibilidad del aparato de 0.1 unidades (Shimadzu, Japón).
6. Calorímetro Diferencial de Barrido (Q 10, TA Instruments, Canada).
7. DSC Refrigerante Cooling System (Canada).
8. DSC TA Instruments MDSC (Mod. 2920, USA).
9. Sistema de enfriamiento RCS (USA).
10. Microscopio Electrónico de Barrido (JEOL JMS-25sII, Japon).
11. Celdas de difusión vertical tipo Franz.

4.1.3. Material Biológico

Los estudios de DSC se realizaron con EC de paladar porcino obtenido de animales recién sacrificados en el rastro, evitando el paso por vapor ó agua caliente para mantener íntegra la membrana biológica. El EC se separó de manera mecánica, con pinzas, y se guardó en un desecador donde se mantuvo a una humedad relativa de 6-7 % y temperatura ambiente, por no más de 15 días.

En lo que se refiere a los voluntarios, para los estudios *In Vivo*, se eligieron 2 hombres y 4 mujeres entre 20 y 40 años de edad, sin enfermedad alguna y sin antecedentes de alergias o patologías en piel, que no se hayan aplicado en la parte interna del antebrazo izquierdo y derecho algún medicamento o cosmético 24 horas antes del estudio.

Los estudios se realizaron con previo consentimiento escrito de los voluntarios, a los que se les dio a conocer de antemano el protocolo.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Preparación de películas de Quitosán

Las películas se formaron a partir de las soluciones de Quitosán al 1% (p/v). Para obtener una solución de Quitosán al 1%, éste se disolvió en Agua-ácido acético al 1% (v/v) con ayuda de un agitador magnético, posteriormente se ajustó el pH a 5.0. A esta solución se agregó 10% (con respecto al Quitosán) del aditivo (glicerol, Tween[®] 80 o ácido oléico y sus respectivas combinaciones). Ver Tabla 2.

| PELÍCULA | ADITIVO(S) ADICIONADO(S) | IDENTIFICACIÓN |
|----------|---|----------------|
| 1 | ----- | Qn |
| 2 | Glicerol | QnGli |
| 3 | Tween [®] 80 | QnTw |
| 4 | Ácido oléico | QnAO |
| 5 | Glicerol + Tween [®] 80 | QnGliTw |
| 6 | Tween [®] 80 + Ácido oléico | QnTwAO |
| 7 | Glicerol + Ácido oléico | QnGliAO |
| 8 | Glicerol + Tween [®] 80 + Ácido oléico | QnGliTwAO |

Tabla 2. Películas de Quitosán preparadas en el estudio

Se vertió 20 ml de cada una de las soluciones sobre placas de acrílico de 11 X 10 cm previamente lavadas y limpiadas con alcohol etílico para eliminar la grasa (Butler, 1996), también fueron niveladas con el objeto de obtener un grosor homogéneo.

Por medio de la técnica del bastidor y evaporación de solvente (30°C con humedad relativa de 50 % ± 5), se formaron las películas después de 18 horas.

4.2.2 Caracterización de las películas de Quitosán

4.2.1 Grososres

El grosor de las películas se midió con un Vernier Digimatic con una resolución de 0.001mm (Mitutoyo, USA) dividiendo las películas de 8.5 X 8.5 cm en 9 secciones, tomando 5 medidas por sección y calculando el promedio y la desviación estándar.

4.2.2.2 Microscopia Electrónica de Barrido

Las películas se colocaron en el porta muestras y se tiñeron con tetróxido de osmio, posteriormente se cubrieron con una fina película de oro de aproximadamente 20 nm y se examinaron por microscopía electrónica de barrido a 12.5 KV, con un Microscopio Electrónico de Barrido (JEOL JMS-25sII, Japón).

4.2.3. Estudios *In Vitro*

4.2.3.1. Intercambio gaseoso de películas de Quitosán

Para esta prueba se emplearon celdas de difusión verticales tipo Franz.

El compartimiento receptor de las celdas se llenó con una solución amortiguadora de biftalato de potasio pH 5.0 (aproximadamente 10 mL), cuidando que la solución no entrara en contacto con la película de Quitosán, la cual se encontraba separando el compartimiento donador y el receptor de la celda (cerrando herméticamente).

El sensor del Tewameter (TM 210, Courage+Khazaka, Alemania), se fijó en la parte superior del donador y se tomaron lecturas de transporte de agua a través de la película durante 10 minutos.

4.2.3.2. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) de piel de cerdo con diferentes tratamientos.

Debido a la dificultad para obtener EC humano, se recurrió al uso de EC procedente de paladar de cerdo. Esto debido a su similitud en cuanto a características de permeabilidad y composición, con respecto a la piel humana, además de que es más sencillo de separar de manera mecánica que el EC de la piel, sin tenerlo que someter a condiciones de temperatura o tratamientos químicos o enzimáticos que pudieran alterar los resultados. Así pues, se cortaron secciones de EC de paladar de cerdo recuperado del rastro evitando su paso por agua caliente y vapor. Este EC se mantuvo en contacto con las soluciones de Quitosán conteniendo los diferentes aditivos (ver Tabla 1) durante 30 minutos.

Transcurrido ese tiempo se sumergió el EC en agua destilada por 30 minutos, con agitación constante, para retirar el exceso de la solución de Quitosán y colocándolo posteriormente en un desecador conteniendo sulfato de calcio anhidro, para tener una humedad relativa de 6.5 a 7.5 %.

Cuando el EC estuvo seco, se pesaron muestras de 2-4 mg y se colocaron en charolas de aluminio recubiertas no herméticas, las cuales se sellaron y se colocaron en el Calorímetro Diferencial de Barrido (Q 10, TA Instruments, Canada) que se muestra en la Figura 14. Las condiciones de las corridas fueron: Rampa de calentamiento de 3 °C/min, flujo de nitrógeno de 50 mL/min, y un rango de calentamiento de 1-120°C. El equipo se calibró con indio.



Figura 10. Calorímetro Diferencial de Barrido Q 10, TA Instruments

4.2.4. Estudios *In Vivo*

4.2.4.1. Selección de voluntarios

Se seleccionaron seis voluntarios de ambos sexos (4 mujeres y 2 hombres), entre 20 y 40 años de edad, sanos, sin haberse aplicado algún medicamento, cosmético o jabón 24 horas antes del estudio, a los que se les dio a conocer previamente el protocolo y quienes otorgaron su consentimiento de participación por escrito. Los voluntarios tienen el tipo de piel IV (Piel mate, sin pecas, de escasa sensibilidad, propia de cabello castaño y ojos oscuros).

4.2.4.2. Pérdida de agua Transepidermal (TEWL *In Vivo*)

Para evaluar el efecto de las formulaciones de Qn sobre la barrera de permeabilidad de la piel, se hicieron mediciones de la pérdida de agua transepidermal (TEWL); las medidas de TEWL se realizaron empleando un Tewameter Courage-Khazaka TM 210[®] (Alemania) como el que se muestra en la Figura 10.



Figura 11. Tewameter Courage-Khazaka TM 210[®]

El día de la prueba, los voluntarios se presentaron con el área a tratar (parte interna de ambos antebrazos) libre de cualquier producto de limpieza o cosmético (jabón, crema, talco, perfume, etc.) o medicamento.

Durante 20 minutos antes de la prueba el voluntario permaneció sentado, en completo reposo, debido a que el movimiento incrementa la transpiración natural y podría causar alteraciones en los resultados.

Las medidas de TEWL se realizaron dentro de una caja de acrílico, en donde el voluntario colocaba el brazo fijando el sensor del Tewameter sobre la piel (Figura 11) y registrando las lecturas en g/h m^2 , de manera continua durante 10 minutos.

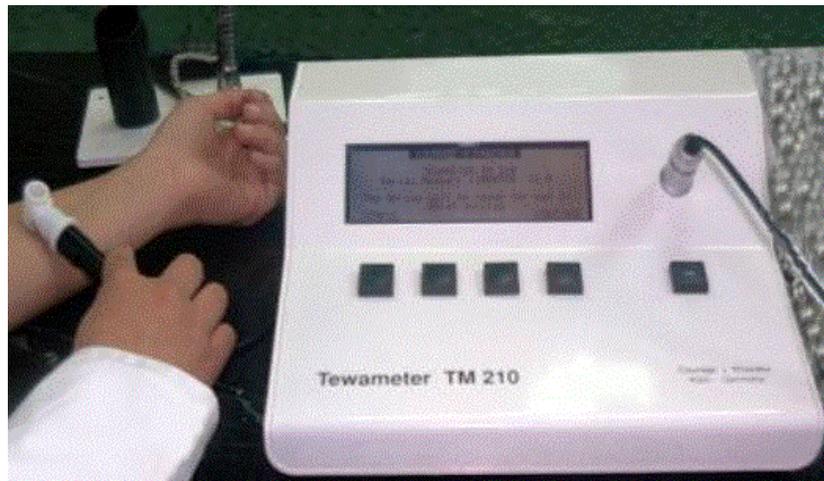


Figura 12. Fijación del sensor del Tewameter sobre el antebrazo

Las medidas de TEWL se realizaron sobre:

- 1) Piel no tratada (Control).
- 2) Piel con película de Quitosán adherida (P adhe).
- 3) Área en donde se adhirió la película de Quitosán y se dejó en contacto por 30 minutos, retirándola posteriormente (P desp).

4.2.4.3. Espectroscopía de Infrarrojo por Transformadas de Fourier/Reflectancia Total Atenuada (FTIR/ATR)

Como se mencionó anteriormente, esta técnica se basa en la capacidad de las moléculas para absorber energía infrarroja. La frecuencia a la que esto ocurra dependerá de los grupos funcionales que posean. En el caso del EC, los componentes de la membrana (lípidos y proteínas), dan origen a un espectro de absorción característico (Figura 12).

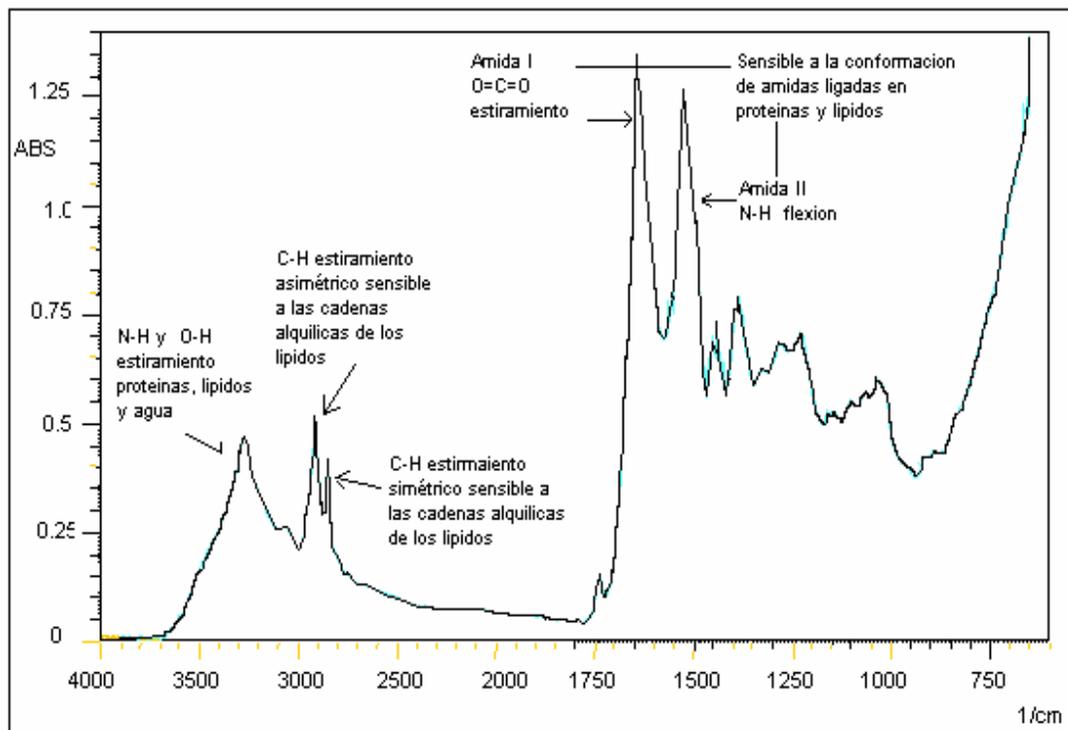


Figura 13. Espectro de Infrarrojo característico del estrato córneo.

Se corrieron espectros de infrarrojo en la parte interna del antebrazo de seis voluntarios sanos (sin antecedentes de alergias o padecimientos en la piel) empleando un Infrarrojo por Transformadas de Fourier FTIR/ATR-8300 (Shimadzu, Japón), como el mostrado en la Figura 13.



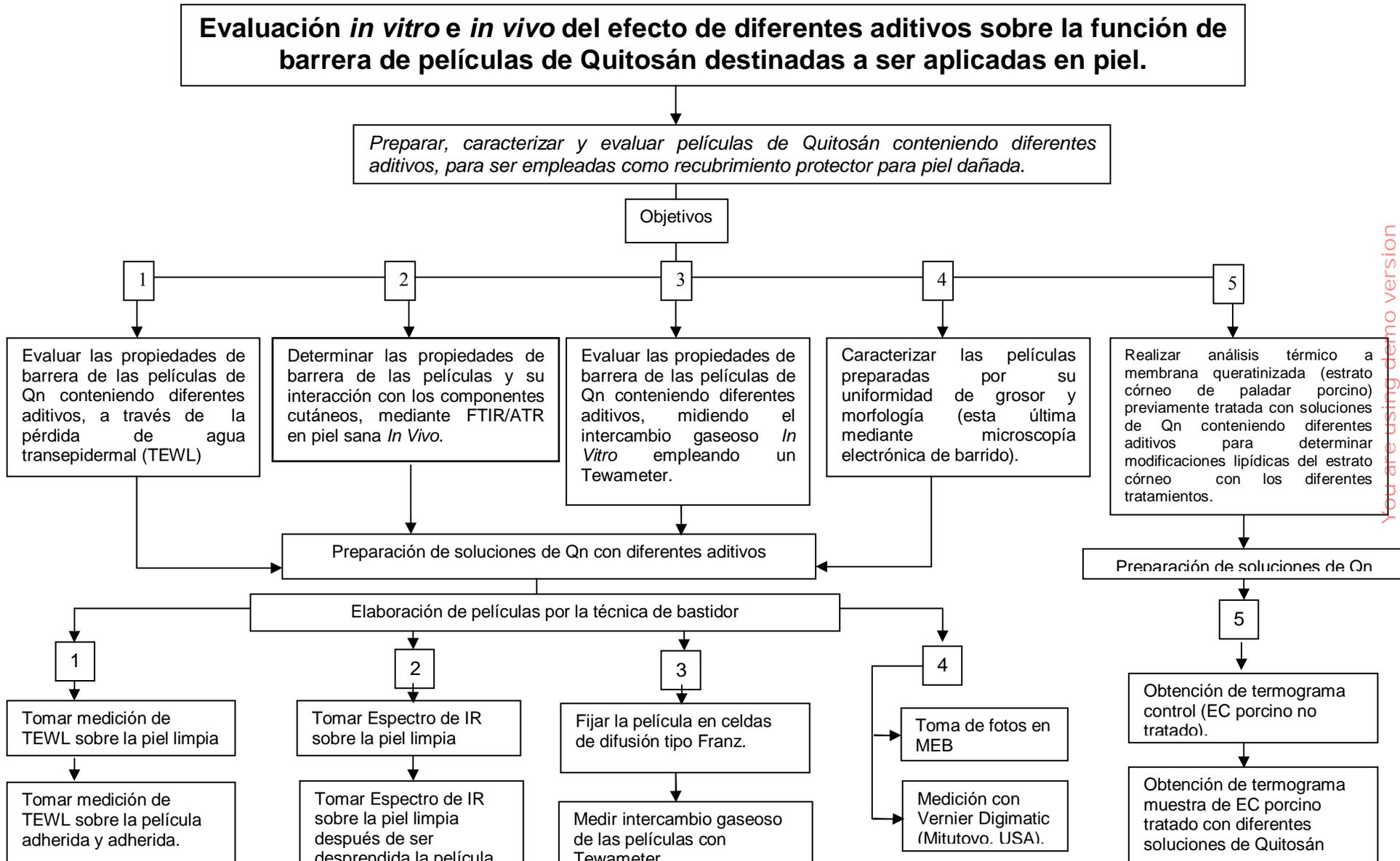
Figura. 14. Infrarrojo por Transformadas de Fourier, FTIR/ATR-8300

Los espectros de infrarrojo se corrieron para:

- 1) Piel no tratada (control)
- 2) Piel tratada con las películas. Para ello se delimitó un área de aproximadamente 11 x 3 cm en la parte interna del antebrazo, aplicando 1 mL de la solución de Quitosán a estudiar (de acuerdo a la Tabla 1) y permitiendo la formación de la película de Quitosán (esto tomó aproximadamente 15 minutos después de su aplicación). Posteriormente, la película formada se dejó en contacto con la piel durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, el área tratada se lavó con abundante agua para eliminar completamente la película y se secó con un paño suave, sin frotar. Se dejaron transcurrir 15 minutos para que se secase completamente el área y se pudiera proceder al corrimiento del espectro de infrarrojo de la piel.

Una vez registrado el espectro, se determinaron los números de onda correspondientes a las vibraciones simétricas (2850 cm^{-1}) y asimétricas (2920 cm^{-1}) correspondientes a las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos del estrato córneo, así como el área bajo la curva de estas señales.

4.3 DIAGRAMA DE FLUJO



You are using demo version
Please purchase full version from www.technocomsolutions.com

Resultados ***y*** ***Discusión***

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se prepararon soluciones de Quitosán y a partir de ellas películas de Quitosán, a las que se agregaron diferentes aditivos (ver Tabla 2). A simple vista, todas las disoluciones resultaron ser homogéneas y transparentes, pasando de incoloras a ligeramente amarillas al aumentar el contenido de Quitosán. En el caso de las películas obtenidas, estas fueron translúcidas, compactas, con superficies lisas sin poros o fisuras. Al secarse las películas fueron fácilmente manejables, esto coincide con lo reportado por Wong *et al* (1992) al elaborar películas de Quitosán.

5.1 Caracterización de las películas

5.1.1 Grosor

Las películas se caracterizaron por su grosor y morfología. En las Figuras 15 y 16 se muestran los grosores promedio para cada una de las películas, obtenidos a partir de películas cuya superficie fue de 8.5 x 8.5 cm divididas en 9 secciones y tomando 5 mediciones por sección.

Todos los grosores fueron medidos bajo una humedad relativa (HR) de 50 ± 5 % ya que a altas HR el agua difunde a través de cavidades microscópicas resultando así en un incremento del volumen libre (Morrillon, 2000). Los incrementos en los grosores de las películas elaboradas con 10 ml de solución van del orden del 4 al 40% con respecto a la película conteniendo solo Quitosán, siendo la de mayor grosor la película QnGli, y la de menor QnTwAO.

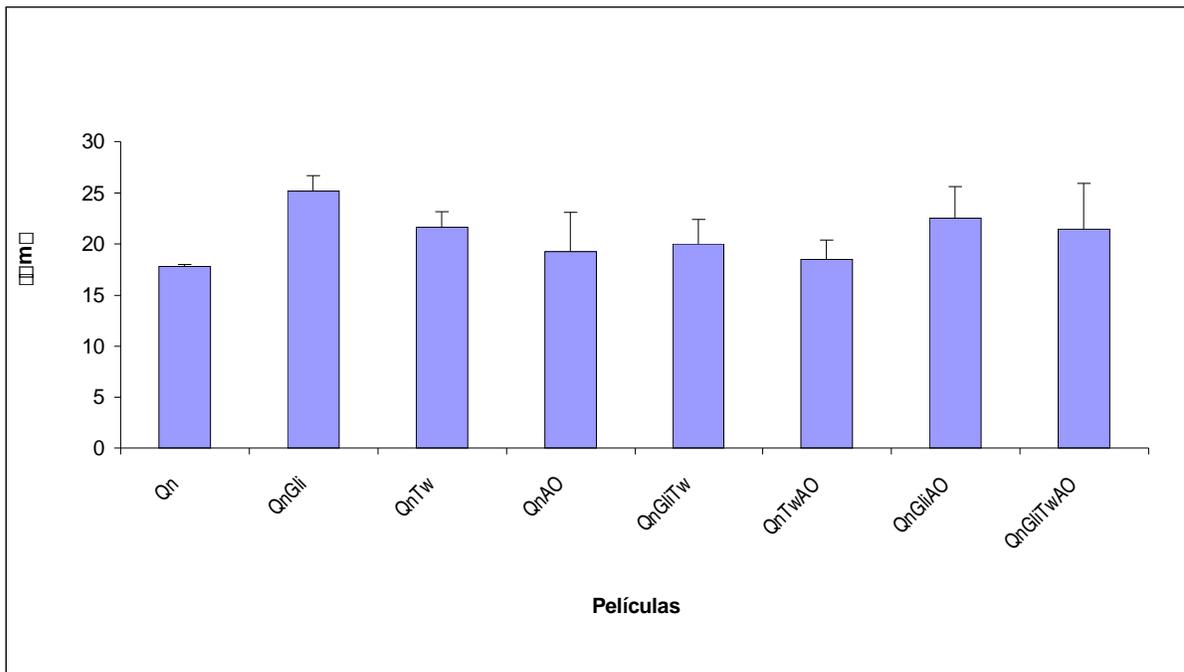


Figura 15. Grosos de películas de Qn formadas vertiendo 10 mL de solución en un área de 8.5 x 8.5 cm

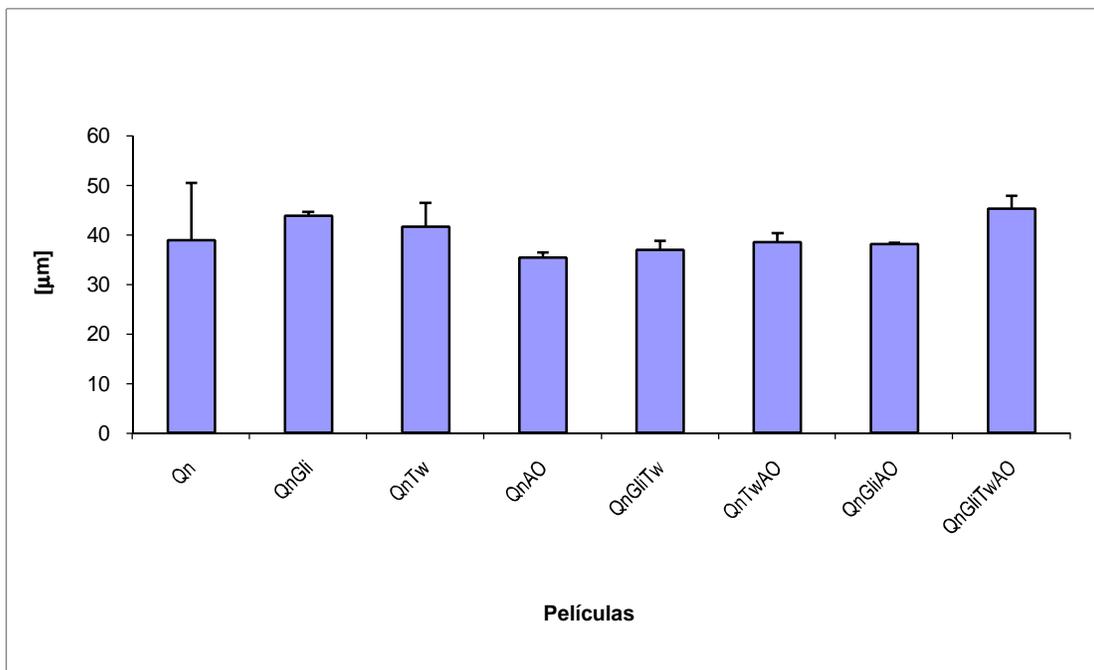


Figura 16. Grosos de películas de Qn formadas vertiendo 20 mL de solución en un área de 8.5 x 8.5 cm

Para el caso de las películas elaboradas con 20 ml la película con mayor grosor fue la QnGliTwAO y la de menor grosor la película QnAO. No obstante, al realizar el análisis de varianza de un factor ($\alpha=0.05$) se observa que no hay diferencias significativas entre los grosores de las diferentes películas elaboradas con 10 ml ($F=2.38$; $F_c=2.65$) y 20ml ($F=1.63$; $F_c=2.65$), respectivamente.

Aunque el grosor está en función de la relación volumen de solución, concentración, área, varios autores como Butler *et al.* (1996), Wiles *et al.* (2000), y Wong *et al.* (1992), han reportado en general un rango del grosor de películas de Quitosán entre 25 a 98 μm . El grosor se modifica cuando se utilizan plastificantes o ácidos grasos debido a que la conformación polimérica es diferente para cada caso.

5.1.2. Microscopía Electrónica de Barrido

Los resultados obtenidos de grosor y TEWL *in vitro* (expuesto en el apartado 5.2.1) realizados a las diferentes películas de Quitosán pueden verse reflejados en apreciables diferencias estructurales de las películas vistas a través de microscopía electrónica a 1000 X como se aprecia en las figuras 17-32. La inclusión de diferentes aditivos modifica las características superficiales y de canto de las películas. La adición de glicerol favorece un ordenamiento en forma de capas superpuestas, observables en los cortes transversales de las películas (Figuras 20, 26, 30 y 32), mientras que con el ácido oléico, se aprecian diferentes dominios, sobre todo cuando se combina con otros aditivos (Figura 32).

QUITOSÁN

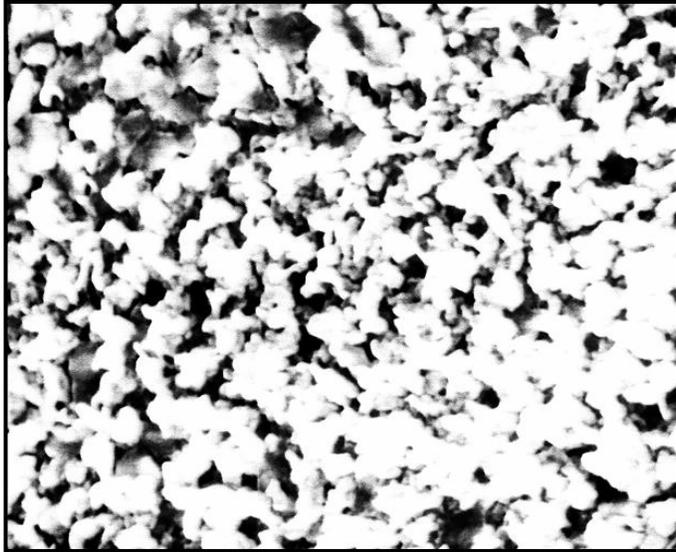


Figura 17. Película de Qn Superficie

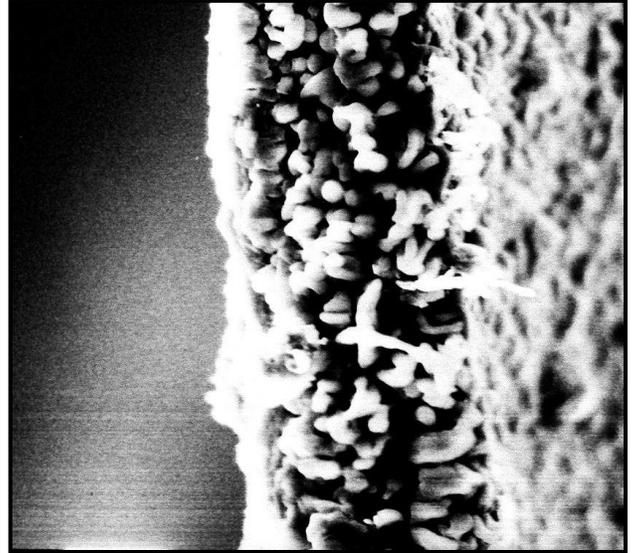


Figura 18. Película Qn Canto

QUITOSÁN + GLICEROL

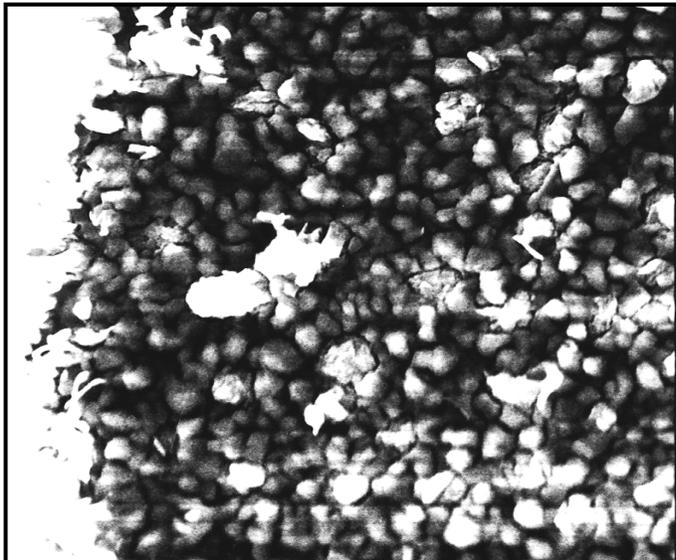


Figura 19. Película QnGli Superficie

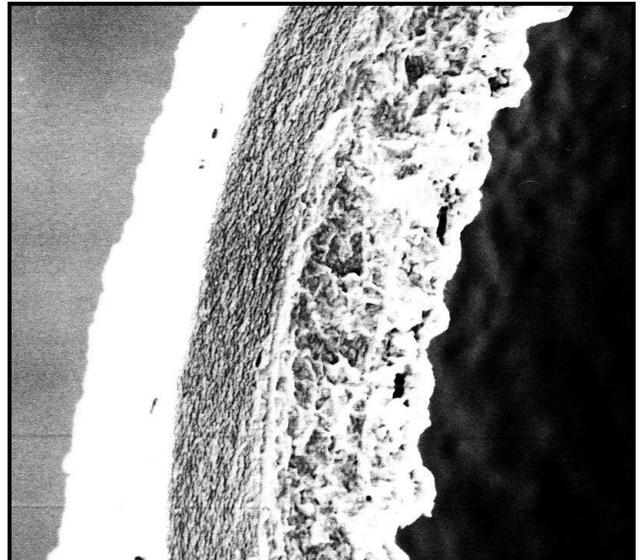


Figura 20. Película QnGli Canto

Microfotografías de Microscopía Electrónica de Barrido. Técnico: Rodolfo Robles Gómez.
Laboratorio de Microscopía Electrónica FES-Cuautitlán UNAM.

QUITOSÁN+TWEEN® 80

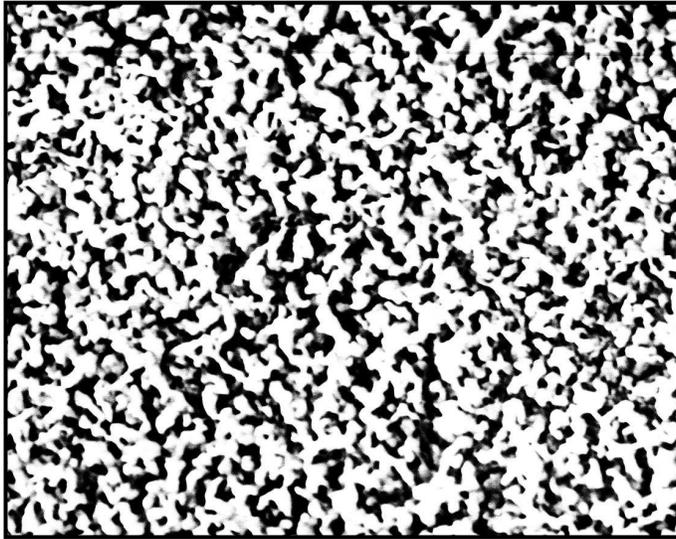


Figura 21. Película QnTw Superficie



Figura 22. Película QnTw Canto

QUITOSÁN-ÁCIDO OLÉICO



Figura 23. Película QnAO Superficie



Figura 24. Película QnAO Canto

Microfotografías de Microscopía Electrónica de Barrido. Técnico: Rodolfo Robles Gómez.
Laboratorio de Microscopía Electrónica FES-Cuautitlán UNAM.

QUITOSÁN+GLICEROL+TWEEN® 80

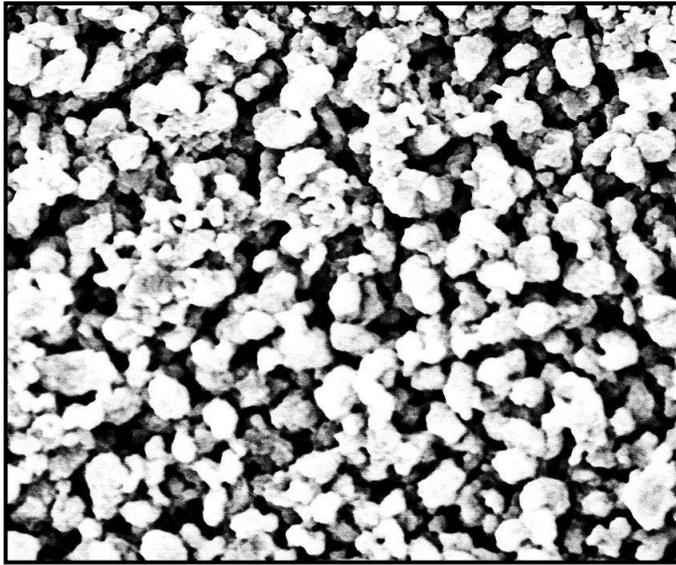


Figura 25. Película QnGliTw Superficie

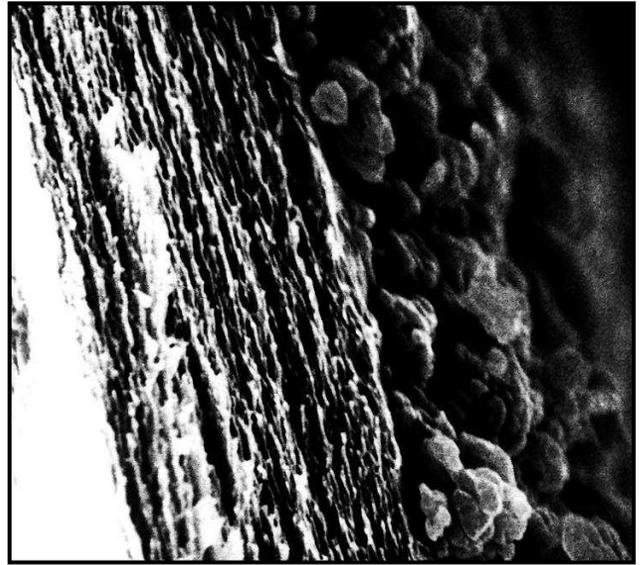


Figura 26. Película QnGliTw Canto

QUITOSÁN + TWEEN® 80 + ÁCIDO OLÉICO

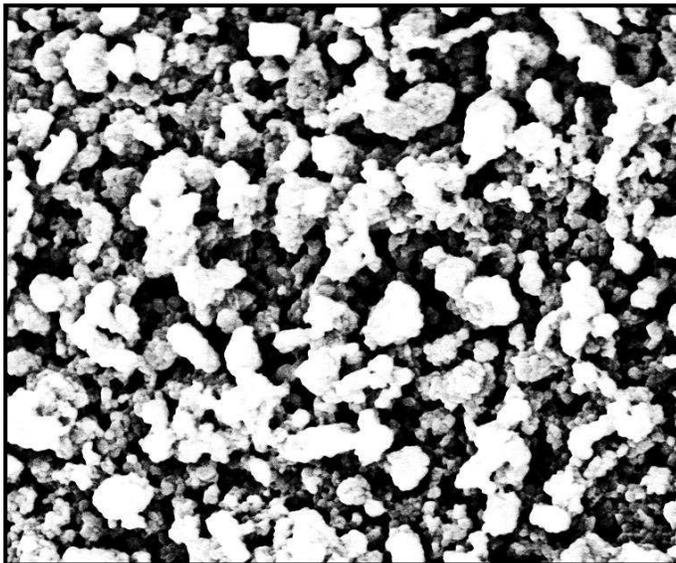


Figura 27. Película QnTWAo Superficie

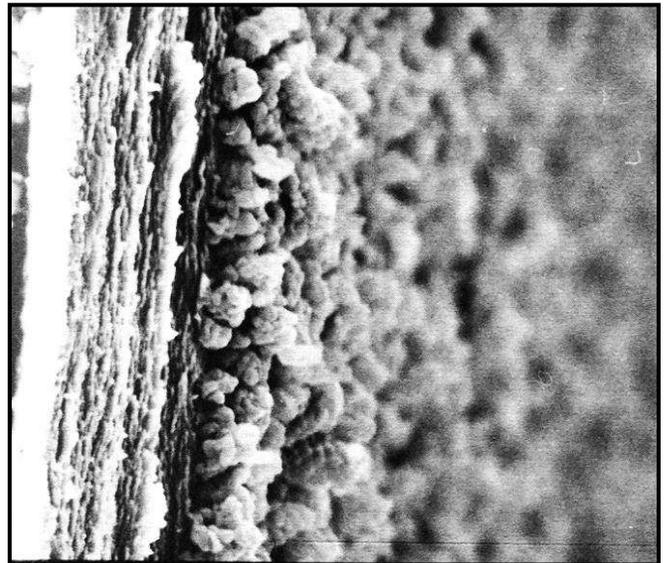


Figura 28. Película QnTWAo Canto

Microfotografías de Microscopía Electrónica de Barrido. Técnico: Rodolfo Robles Gómez.
Laboratorio de Microscopía Electrónica FES-Cuautitlán UNAM.

QUITOSÁN + GLICEROL + ÁCIDO OLÉICO

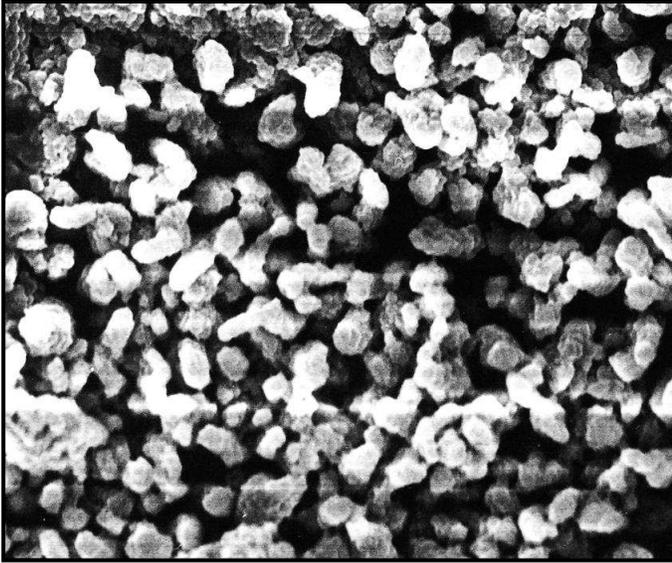


Figura 29. Película QnGliAO Superficie

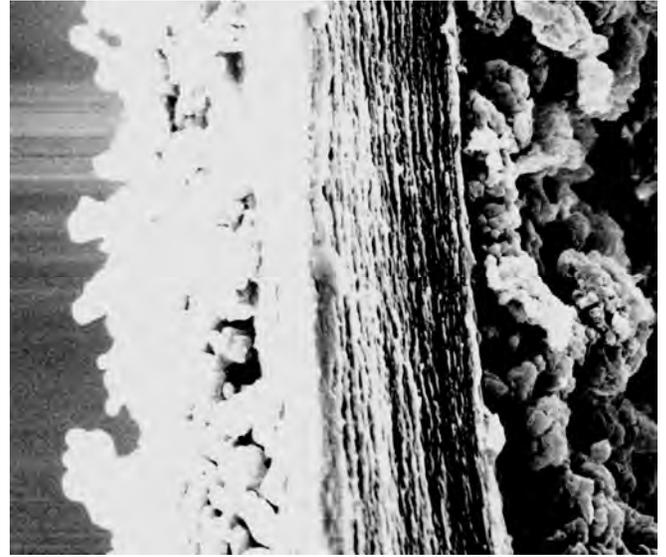


Figura 30. Película QnGliAO Canto

QUITOSÁN + GLICEROL + TWEEN® 80 + ÁCIDO OLÉICO

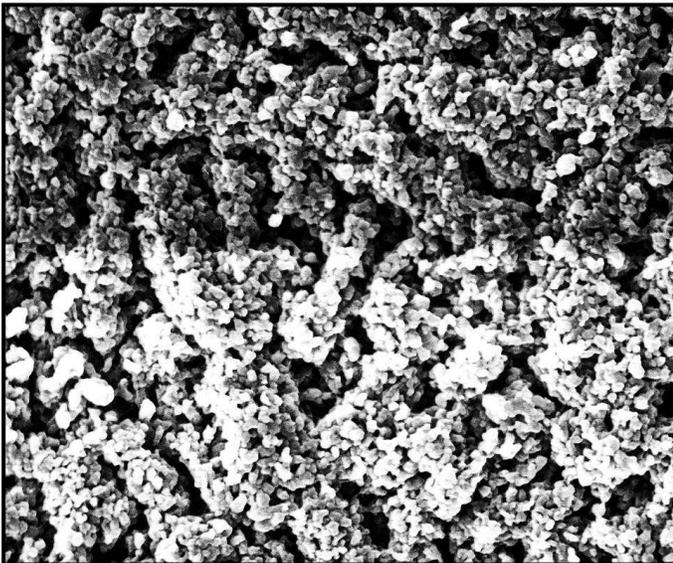


Figura 31. Película QnGliTWAO Superficie



Figura 32. Película QnGliTWAO Canto

5.2 Estudios In Vitro

5.2.1 Intercambio gaseoso

En este estudio, se utilizó el equipo destinado a medir pérdida de agua transepidermal (Tewameter, Courage-Khazaka, Köln, Alemania), para evaluar el intercambio gaseoso a través de las diferentes membranas. Los resultados obtenidos se expresan como gramos de agua detectados en la superficie de la membrana por hora y metro cuadrado.

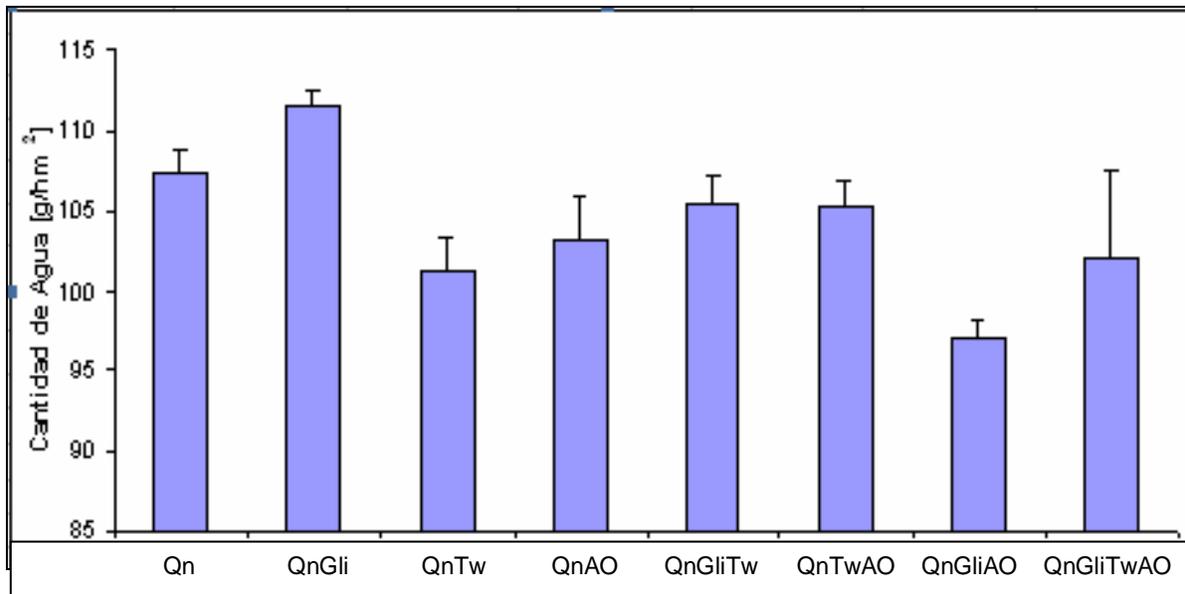


Figura 33. Valores de Intercambio gaseoso para las diferentes películas preparadas. Los valores se expresan como gramos de agua medidos por hora/metro cuadrado. (n=3)

Como se puede observar en la Figura 33, la fórmula QnGli presenta el mayor valor de agua permeada. Esto puede atribuirse al carácter higroscópico del glicerol, el cual es una molécula pequeña e higroscópica (comparada con las moléculas de Tween® 80 y de ácido oléico), por lo que puede retener una mayor cantidad de agua en la matriz de la película, resultando en un incremento del volumen libre e hinchamiento de la película, permitiendo así una alta difusión de moléculas de agua y un mayor valor de permeabilidad.

Esto coincide con Gontard *et al* (1993), McHung *et al* (1994) y Bangyekan *et al* (2006) y con los resultados obtenidos al medir el grosor, pues, aunque

estadísticamente se encontró que no hay diferencias significativas en los grosores de las diferentes películas, en las Figuras 15 y 16 se observa que la película QnGli presenta un grosor ligeramente superior al resto de las películas.

Por otro lado, el glicerol aumenta la movilidad de las cadenas poliméricas pues actúa como un plastificante, incrementando los coeficientes de difusión y la absorción de moléculas polares tales como el agua, resultando en altas permeabilidades al vapor de agua (Garnica, 2001).

Al realizar un análisis de varianza de un factor se encuentra que si hay diferencias significativas entre los TEWL determinados para las películas elaboradas con los diferentes aditivos ($F=9.94$ y $F_c=2.66$). De acuerdo a la prueba de Turkey las películas 1-3, 1-7, 1-8, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7, 2-8, 3-7, 4-7, 5-7, 6-7, y 8-7 presentan una diferencia estadística significativa (ver Anexo).

La película que contiene solo Qn presenta una menor permeabilidad que la de QnGli, lo que puede estar relacionado a la presencia de grupos hidrófobos en la cadena de Qn, resultado de la desacetilación parcial (Bangyekan, 2006) y por otro lado, como ya se explicó, en el caso de la película QnGli, la mayor permeabilidad está relacionada con el carácter higroscópico del glicerol.

Por su parte, los ácidos grasos, debido a su naturaleza hidrófoba, bloquean el transporte de humedad a través de la película, impartiendo no solo hidrofobia a la misma, sino incluso formando grandes intersticios a lo largo de la cadena polimérica constituyendo una red complicada debido a las diferentes posibilidades de interaccionar con el Quitosán, lo cual se evidencia en las Figuras 23 y 24 (Avena, 1993).

En este sentido, la fórmula QnAO presenta uno de los valores más pequeños de TEWL, lo cual concuerda con Chang *et al* (2000) y Morrillon *et al* (2002), quienes reportan que los lípidos son los más eficientes como barrera a la humedad debido a su carácter hidrófobo.

Los lípidos con bajos puntos de ebullición (ejemplo: ácido oléico), exhiben propiedades superiores de barrera, presumiblemente debido a su estructura uniforme y menos canales entre las placas cristalinas a través de las cuales el agua puede migrar fácilmente (McHugh, 2000). En general, las películas conteniendo ácido oléico presentan un intercambio gaseoso menor a las de Qitosán sólo, aún aquellas en las que se combina con el Tween® 80 y el glicerol. Sorprendentemente, la película con glicerol y ácido oléico (QnGliAO) es la que presenta la menor permeabilidad de todas.

En cuanto a los resultados obtenidos para las películas preparadas con surfactante (QnTw), se observa que sus valores son menores que las películas Qn y QnGli, estos resultados se atribuyen a que la parte polar de los surfactantes quedó unida a la parte polar de la molécula de Qitosán, y la parte no polar quedó orientada hacia el exterior de la molécula de Qitosán, ofreciendo así, mejores propiedades de barrera a la humedad y consecuentemente disminuyendo la permeabilidad al vapor de agua (Garnica, 2001).

5.2.2 Calorimetría Diferencial de Barrido

El efecto de las formulaciones sobre el comportamiento térmico del EC se evaluó mediante calorimetría diferencial de barrido. Como se expuso en el marco teórico, el EC presenta endotermas características que corresponden a los lípidos y proteínas que conforman la membrana. Cualquier modificación de estas endotermas refleja interacciones entre la formulación aplicada y los componentes membranales. Para ello, se empleo EC de paladar porcino, aunque la situación ideal hubiera sido el empleo de piel humana.

No obstante, la piel humana presenta limitaciones tales como escasa disponibilidad y problemas referentes al almacenaje (Rigg *et al.*, 1990). El EC de paladar porcino es una membrana con características histofisiológicas muy similares a las de la piel, además de que es más sencillo de aislar, sin tener que recurrir a tratamientos térmicos o enzimáticos, que pudieran falsear los resultados.

Típicamente, las transiciones térmicas ocurren en 35-42, 60-77, 70-90 y 95-120°C y se refieren como a T1, T2, T3 y T4, respectivamente. T1, T2 y T3 se atribuyen a los cambios de fase de los lípidos que se encuentran en las regiones intercelulares, mientras que T4 está asociado con la desnaturalización de las proteínas (Barry *et al.*, 1995). En el estrato córneo humano, una quinta transición en 51-55°C también se ha divulgado y atribuido a los lípidos unidos covalentemente a los córneocitos (Gay *et al.*, 1994; Cornwell *et al.*, 1996; Naik *et al.*, 1997). Generalmente se reconocen cuando hay impacto en la piel y por lo tanto en la permeabilidad. Cualquier alteración en la piel por efecto de vehículos, solventes o promotores de absorción, se ve reflejada como un cambio en las transiciones térmicas, ya sea en la temperatura a la que aparecen o en la entalpía.

Para estas evaluaciones, se corrió un control, poniendo en contacto el EC con agua destilada durante 30 minutos. El termograma obtenido se muestra en la Figura 34.

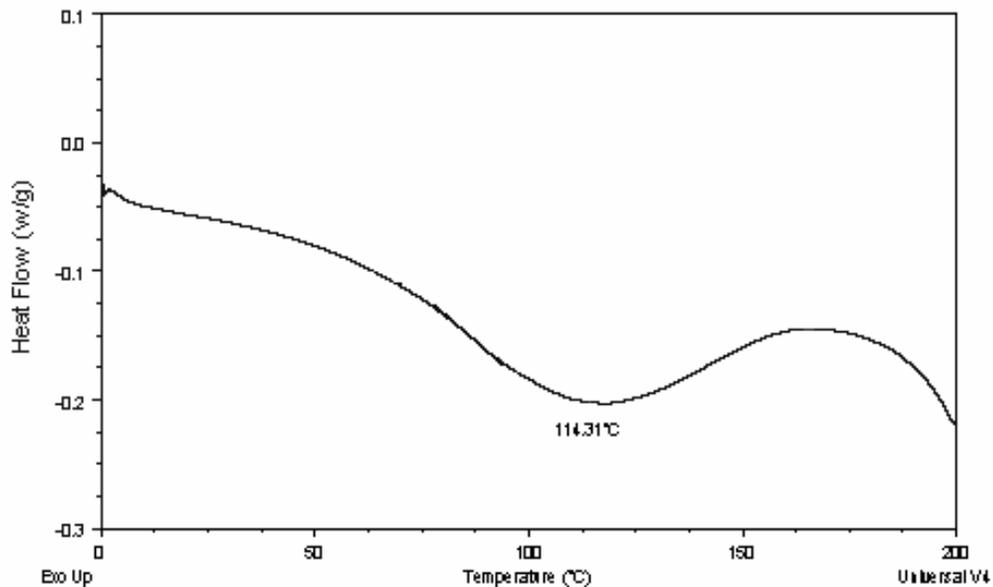


Figura 34. Termograma de EC no tratado (control)

Como puede verse, los picos endotérmicos característicos de las transiciones correspondientes a los lípidos que se mencionan anteriormente, no fueron observados. Se encuentra una única endoterma a aprox. 115 °C, relacionada, de acuerdo a lo reportado por otros autores (Ashton *et al*, 1992; Golden *et al*, 1986; Golden *et al.*, 1987; Leopold *et al*, 1994; Pouliot *et al.*, 1999; Rolim Baby *et al.*, 2006) con la pérdida de agua y la desnaturalización de la queratina.

Baby *et al.* (2006) observan la transición de desnaturalización de la queratina a 130 °C y una muy débil a aprox. 58 °C, atribuida a lípidos. No obstante, en nuestro caso y bajo las condiciones de trabajo expuestas con anterioridad, no logramos visualizar las transiciones relativas a lípidos, sino sólo la de queratina.

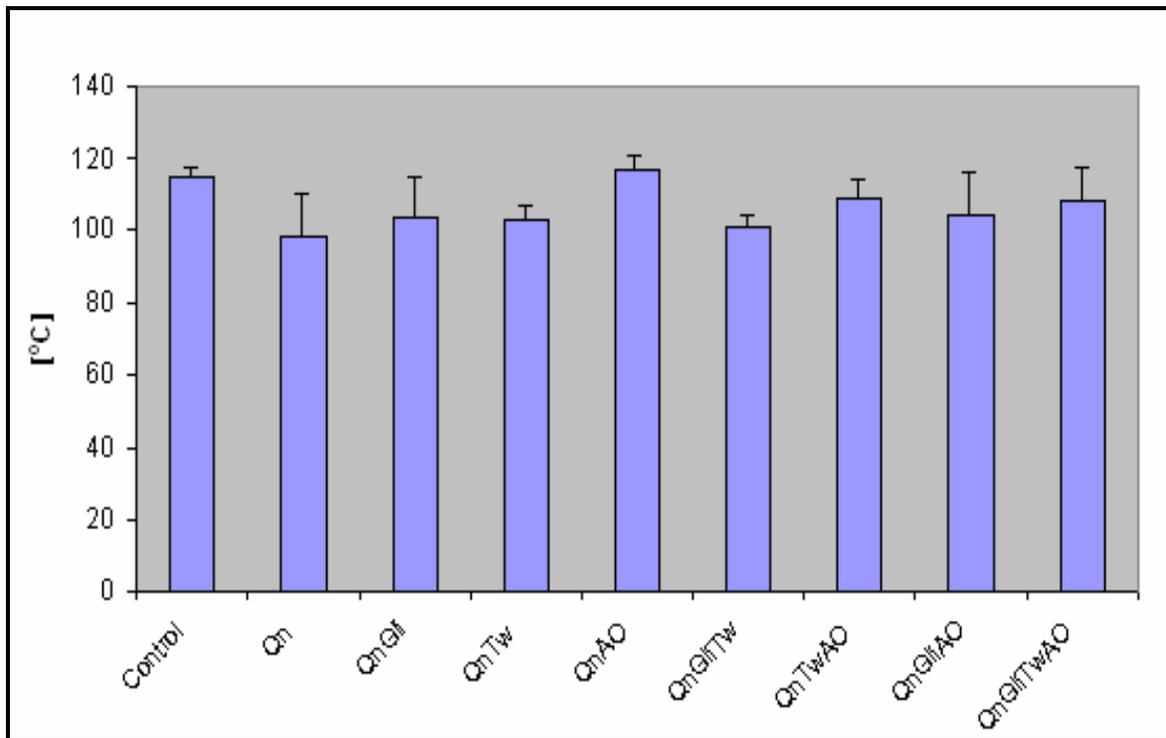


Figura 35. Temperatura a la que se observó la transición térmica relacionada con la desnaturalización de proteínas, al tratar EC con las diferentes formulaciones.

Como se observa en la Figura 35, no existen diferencias significativas ($F=2.11$; $F_c=2.51$) en la temperatura a la que ocurre la desnaturalización de queratina al tratar el EC con las diferentes formulaciones. Reportes previos (Baby *et al.*, 2006) explican que moléculas como los surfactantes iónicos son capaces de interactuar con las proteínas del EC, lo que puede provocar un incremento en la concentración local de agua y un aumento en la temperatura a la que ocurre la desnaturalización de la queratina. Sin embargo, en el caso de los surfactantes no iónicos, como el Tween[®] 80 empleado en el presente trabajo, se habla de la posibilidad de que se establezcan interacciones hidrofóbicas con la queratina; no obstante, el hecho de que no existan diferencias entre el control y las formulaciones que contenían Tween, implica que no hubo interacción con las proteínas, o bien esta fue tan débil, que no afectó el contenido de agua del EC (Waters *et al.*, 1988; Ananthapadmanabhan *et al.*, 1996).

Por otro lado, es bien sabido que todos los aditivos empleados (glicerol, Tween[®], ácido oléico) interaccionan fuertemente con los lípidos del estrato córneo, ya sea provocando transiciones de fases, lo que afecta las características de empaquetamiento de los lípidos, su orden y por tanto la permeabilidad a través de los espacios intercelulares; o bien, extrayendo los lípidos (Maghraby *et al.*, 2004). Estas alteraciones provocan cambios en la entalpía y temperatura a la que ocurren las transiciones, sin embargo, como no fue posible hacer visibles estas transiciones ni en el control, ni en las muestras tratadas con las formulaciones, no es factible discutir al respecto.

Así pues, al igual que en el caso del Tween, el ácido oléico y el glicerol no interaccionan con las proteínas del EC o bien la interacción es tan débil que no hay un cambio significativo en la temperatura a la que ocurre la transición.

5.3 In Vivo

5.3.1 Pérdida de agua Transepidermal (TEWL)

Como ya se expuso anteriormente en la Sección de Antecedentes, la medida de la pérdida de agua transepidermal (TEWL por sus siglas en inglés) ha sido ampliamente utilizada como un parámetro para verificar la integridad de la barrera de permeabilidad de la piel *In Vivo* (Tanojo *et al.*, 1997 y Pu y Li, 1999), considerando que cuando esta barrera se ve comprometida ya sea por que el EC ha sido dañado o bien por la interacción de los componentes de alguna formulación con los lípidos o proteínas de la piel, la pérdida de agua se incrementa. Así mismo, cuando se aplica un vehículo o formulación oclusiva, la pérdida de agua disminuye, mientras dure este efecto oclusivo.

Así pues, si al aplicar una formulación sobre la piel, la pérdida de agua se ve incrementada, esto puede ser el resultado de alteraciones a nivel de lípidos

(fluidización o desorganización de la bicapa lipídica o bien extracción de lípidos) o proteínas (desnaturalización o extracción de proteínas).

Las evaluaciones de TEWL hoy en día representan una herramienta altamente importante en la investigación farmacéutica y cosmetológica, ya que es muy útil al seleccionar los componentes de una formulación y al evaluar los efectos de los excipientes, debido a que cualquier sustancia que interaccione con los componentes de la piel y altere su conformación u orden natural, puede provocar un incremento en el TEWL. Por otro lado, es una medición útil para determinar la duración del efecto de la formulación, así como el tiempo en que la barrera de permeabilidad se reestablece.

El promedio de TEWL obtenido en este trabajo, medido en voluntarios sanos fue de 8.62 ± 1.18 g/hm², el cual se encuentra dentro del rango promedio reportado en estudios previos, el cual oscila entre 8 y 12 g/hm² (Takeuchi *et al.*, 1995; Fang *et al.*, 2002).

En este trabajo se determinó el efecto oclusivo de las películas cuando estas se adherían sobre la piel. Con la finalidad de evidenciar mejor los resultados y compararlos, se graficó el cambio absoluto de TEWL (cada valor obtenido al cubrir la piel con la película menos el obtenido con el control) en función de cada una de las formulaciones.

En las figuras 36 y 37 se muestran los cambios absolutos obtenidos al realizar las mediciones de TEWL sobre la película adherida en piel y una vez desprendida.

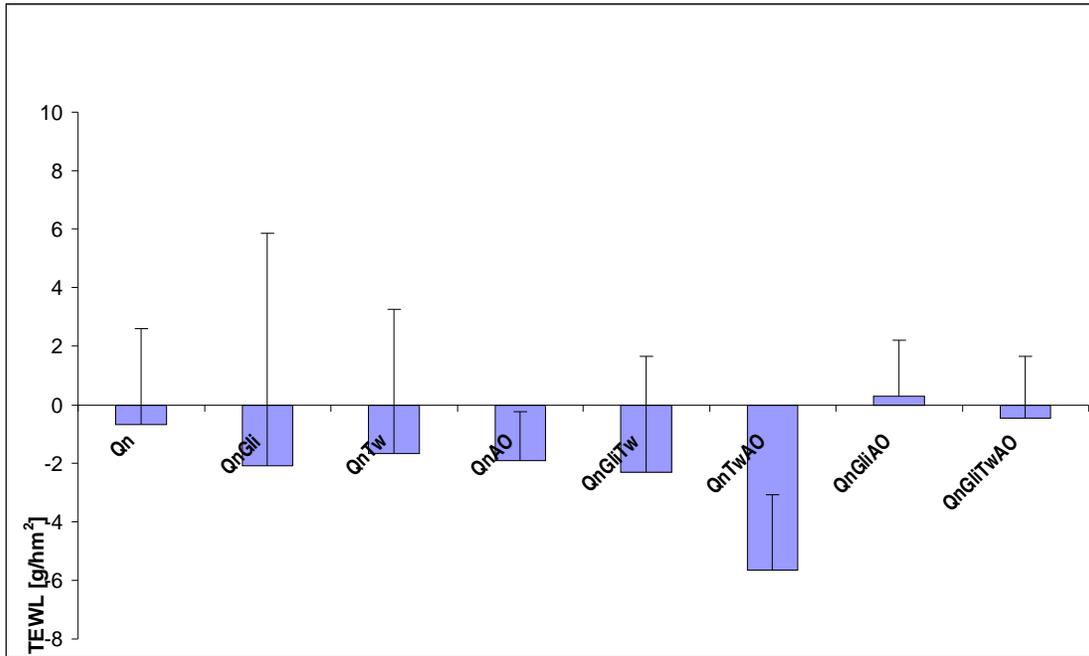


Figura 36. Cambios absolutos (cada valor de la formulación menos el control) obtenidos al medir el TEWL sobre las películas adheridas a la piel (n=6)

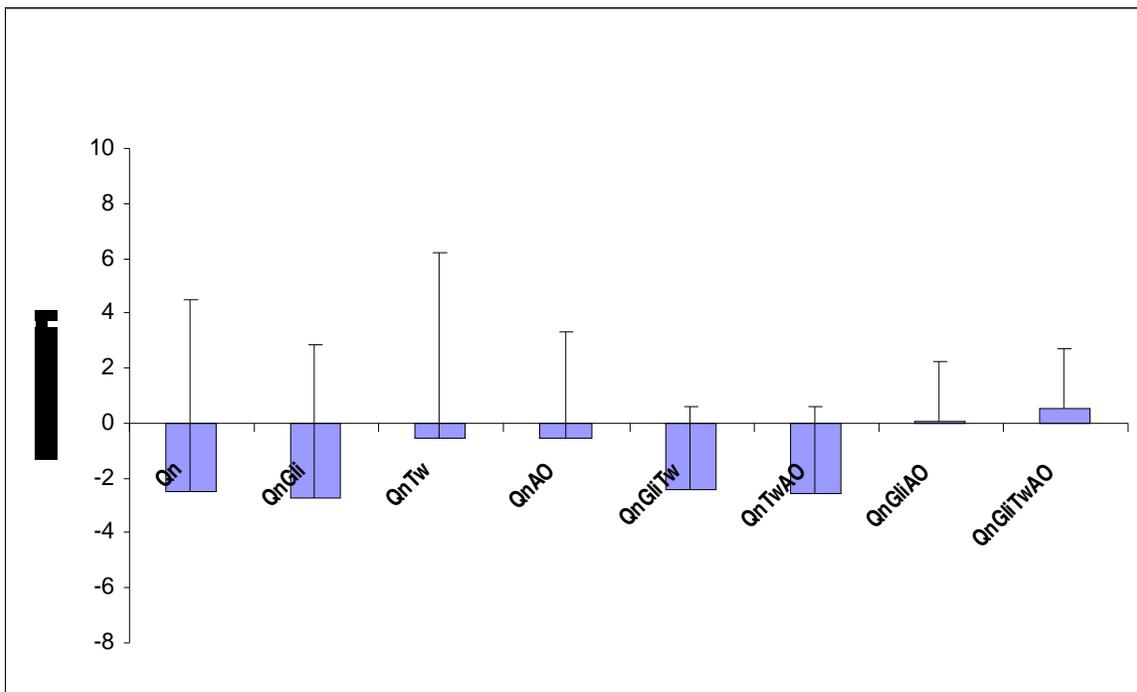


Figura 37. Cambios absolutos (cada valor de la formulación menos el control) obtenidos al medir el TEWL una vez retirada la película de la piel (n=6)

Como se puede observar en el Figura 36, debido al efecto oclusivo existe una disminución en el TEWL cuando se colocan las películas con los diferentes aditivos, apreciándose una mayor disminución para la formulación QnTwAO ($-5.65 \pm 2.5 \text{ g/hm}^2$), debido probablemente a que los grupos no polares del Tween[®] 80 se unieron con los grupos no polares del Quitosán formando una red más compacta (Martínez, 2001), además de que contiene un lípido con bajo punto de ebullición (ácido oléico) el cual exhibe buenas propiedades de barrera a la humedad dejando menos canales entre las placas cristalinas (McHungh, 2000; Garnica, 2001).

La disminución de TEWL una vez desprendidas las películas (Figura 37), se debió a que al adherirse las películas a la piel con una solución de Quitosán, promovió una mayor interacción con los componentes membranales, lo que favoreció que aún una vez retiradas, el efecto oclusivo se prolongara.

Al realizar el análisis estadístico (ANOVA de un factor con $\alpha=0.05$) reveló que tanto adherida ($F=1.16$, $F_c=2.26$), como una vez desprendida la película ($F=0.51$, $F_c=2.25$) no existen diferencias estadísticas entre las diferentes formulaciones estudiadas. No obstante, esto puede atribuirse a que las desviaciones estándar son grandes, debido a las variaciones interindividuales.

5.3.2. Espectroscopia de Infrarrojo por Transformadas de Fourier/Reflectancia Total Atenuada.

La espectroscopia de infrarrojo (FTIR/ATR) ha sido ampliamente utilizada para tratar de explicar los mecanismos de acción de los promotores y vehículos empleados en formulaciones tópicas y transdérmicas (López, 2003). Esta técnica junto con la de TEWL y la calorimetría diferencial de barrido (DSC) son aplicadas en conjunto para elucidar el mecanismo de acción de sustancias con acción promotora de absorción. Las tres en conjunto dan información sobre la interacción de vehículos o excipientes con componentes cutáneos y ayudan a definir qué tanto se compromete la barrera.

Como se mencionó en la Sección de Metodología se realizaron los estudios de infrarrojo a 6 voluntarios, a los cuales se les aplicaron en forma individual las soluciones a base de Quitosán que se muestran en la Tabla 2.

Los espectros de infrarrojo se corrieron en un Espectrofotómetro de Infrarrojo por Transformadas de Fourier, con celdas horizontales de ATR, (FTIR-8300, Shimadzu, Japón). Antes de realizar las pruebas se obtuvieron los espectros de infrarrojo de la piel sin ningún tratamiento (control).

La fluidización lipídica del EC se asocia al cambio en el número de onda o ensanchamiento de las bandas, ya sea para el caso de los estrechamientos asimétricos o simétricos correspondientes a las cadenas alquílicas de los lípidos del EC (Naik *et al*, 1997).

De acuerdo a lo reportado anteriormente por Naik y Guy (1997), para fines prácticos del análisis del presente trabajo, nos centramos principalmente en el análisis de las bandas que corresponden a las cadenas alquílicas de los lípidos localizadas en promedio en 2920 y 2850 cm^{-1} para la vibración asimétrica y simétrica, respectivamente. Considerando que los lípidos intercelulares constituyen la principal barrera, cualquier alteración en la organización de los mismos resulta en un incremento en la permeabilidad de la piel. La fluidización de los lípidos de la membrana por efecto de los componentes de una formulación provoca el desplazamiento de las bandas antes citadas hacia números de onda mayores, o bien su ensanchamiento; en el caso de extracción de lípidos, el área bajo la curva de las bandas se ve disminuida (en relación al control).

Como se muestra en la figura 38, desplazamientos a números de onda mayores fueron observados con todas las formulaciones para el caso de vibraciones asimétricas a 2920 cm^{-1} . Como se mencionó anteriormente, es posible asociar este desplazamiento con la fluidización de lípidos, lo cual implicaría un mayor desorden de las cadenas alquílicas de los lípidos, esto se relaciona frecuentemente a un incremento en la proporción de isómeros gauche (Naik *et al.*, 1997). Sin embargo al realizar el análisis de varianza de un factor con $\alpha=0.05$ ($F=0.22$, $F_c= 2.25$) no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los cambios absolutos de la banda asimétrica ocasionado por la variación interindividual.

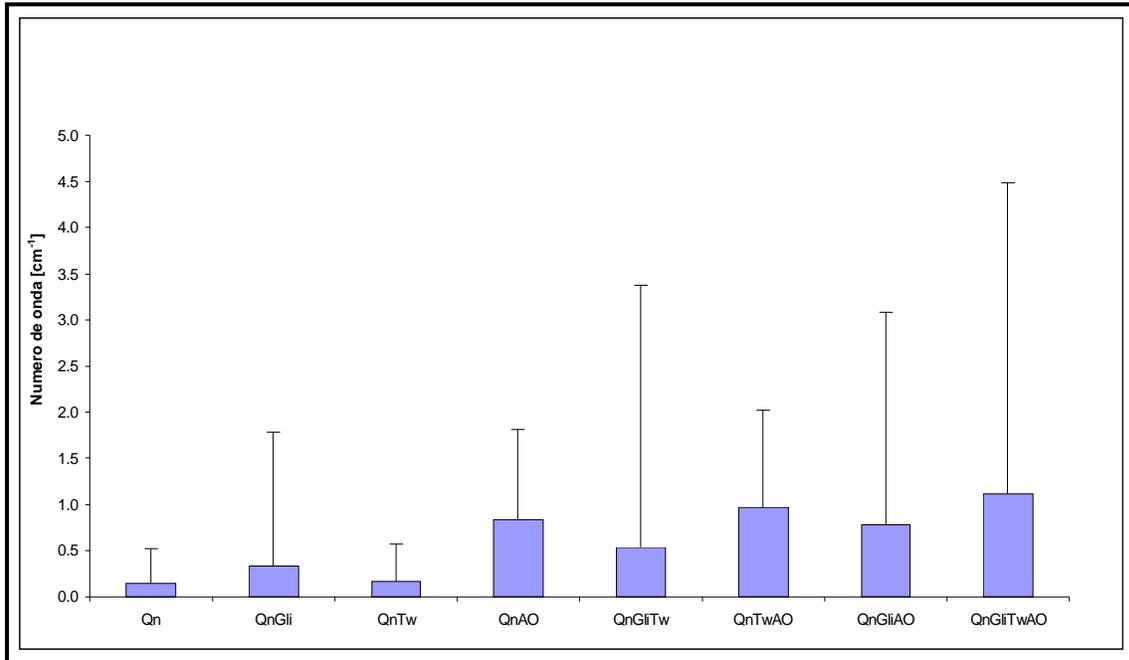


Figura 38. Cambios absolutos de los números de onda para la banda asimétrica de las cadenas alquílicas de los lípidos del EC

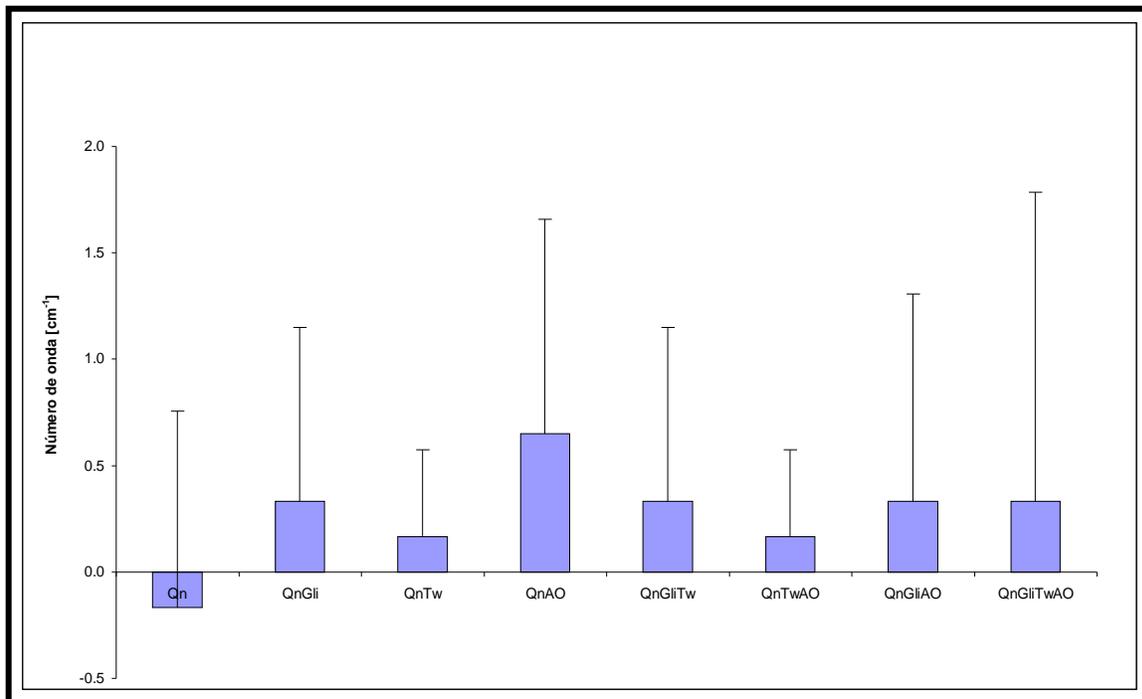


Figura 39. Cambios absolutos de los números de onda para la banda simétrica de las cadenas alquílicas de los lípidos del EC

Para el caso del cambio de banda de los picos de estrechamiento simétricos, 2850 cm^{-1} , (Fig. 39) se aprecia que todas las formulaciones, excepto la de Qitosán sin aditivo, causan fluidización en los lípidos del EC principalmente Qitosán con ácido oléico, no obstante al realizar el análisis de varianza de un factor ($F=0.39$, $F_c= 2.25$) también demostró que no hay diferencias estadísticas significativas.

Por otro lado, se midieron las áreas bajo la curva (ABC) de las bandas antes citadas, correspondientes a las vibraciones simétricas (2850 cm^{-1}) y asimétricas (2920 cm^{-1}), debido a que una disminución en las áreas bajo la curva puede indicar la extracción de lípidos, lo que implica un incremento importante en la permeabilidad de la piel (Naik *et al.*, 1997).

En los gráficos 40 y 41 se observa el cociente de las áreas bajo la curva (ABC) de las diferentes formulaciones con respecto al control. Se observa que tanto para las bandas simétricas como asimétricas, que las formulaciones de QnGli, QnAO y QnGliTwAO disminuyeron en promedio el ABC, por lo que de acuerdo a Naik y Guy (1997), estas formulaciones extraen los lípidos de membrana del EC. Por otro lado, la formulación con glicerol y ácido oléico (QnGliAO) presenta un incremento promedio del área, aunque con una desviación estándar muy grande. Ese fenómeno podría atribuirse a la penetración y retención del ácido oléico en los espacios intercelulares, lo que podría haber tenido un efecto aditivo. Sin embargo al realizar el análisis de varianza de un factor ($\alpha=0.05$) no se aprecian diferencias significativas para ambos casos, ABC asimétricas ($F=1.78$, $F_c=2.25$) y ABC simétricas ($F=1.51$, $F_c=2.25$) atribuidas a desviaciones estándar altas debido a las grandes diferencias interindividuales de los voluntarios.

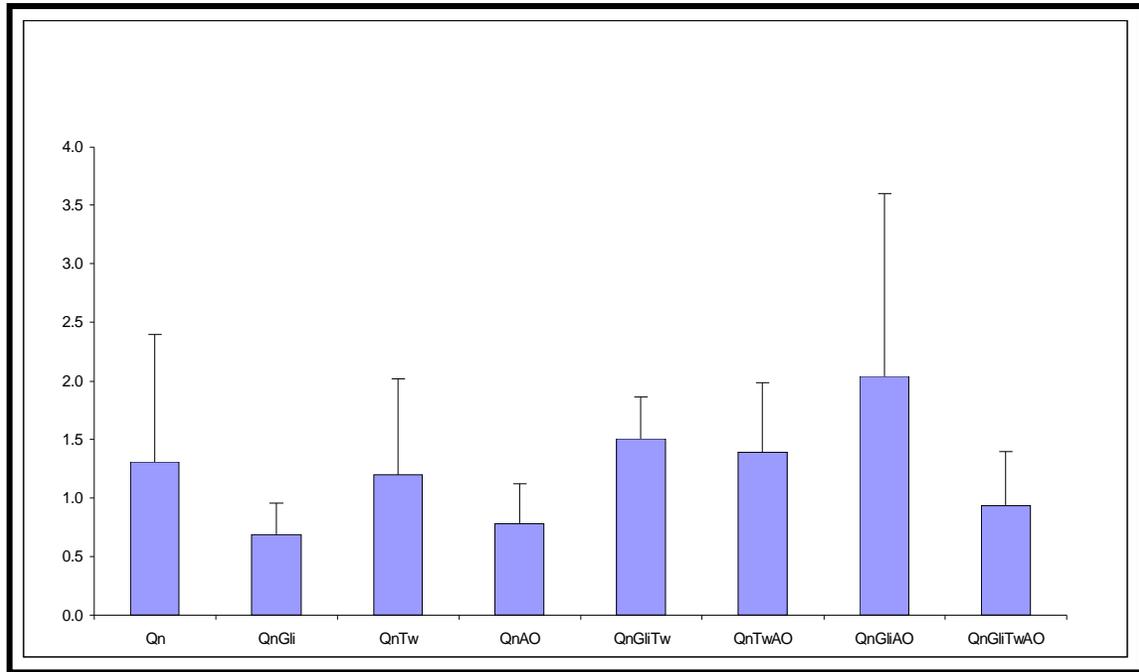


Figura 40. Cociente de áreas bajo la curva para bandas de estrechamiento asimétricas para las diferentes formulaciones en relación al control.

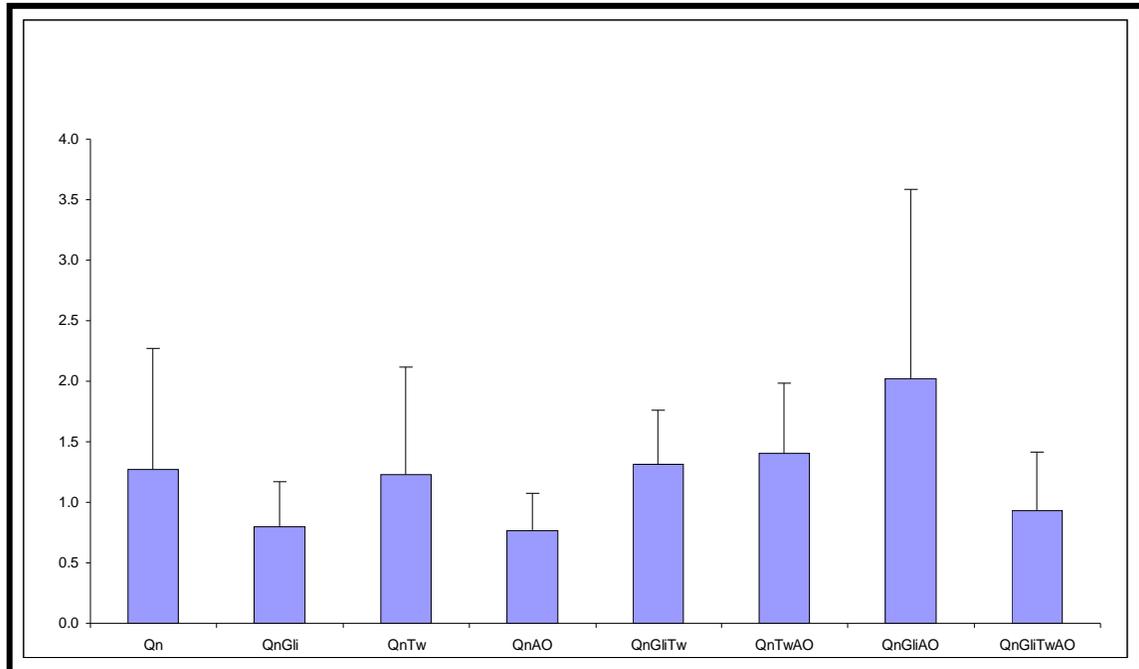


Figura 41. Cociente de áreas bajo la curva para bandas de estrechamiento simétricas para las diferentes formulaciones en relación al control.

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

Todas las películas de Quitosán modificadas con plastificante (glicerol), surfactante (Tween[®] 80) y ácido graso (ácido oléico) fueron transparentes, de contorno liso y libres de poros o fracturas.

Las películas de Quitosán modificadas mostraron un espesor uniforme, de 17.77 – 25.15 μm para las elaboradas con 10 mL de solución, y de 35.41 – 45.23 μm para las elaboradas con 20 mL, sin que existan diferencias estadísticas significativas entre las diferentes formulaciones para las películas preparadas con cada uno de los volúmenes.

La película con la fórmula QnGli presenta una mayor permeabilidad al vapor de agua (intercambio gaseoso) que el resto de las formulaciones, lo cual puede atribuirse a su propiedad como plastificante y su carácter higroscópico. Las películas conteniendo ácido oléico muestran en general una menor permeabilidad que el control (película de Qn).

Al realizar mediciones de pérdida de agua transepidermal (TEWL), se encontró que las películas QnGliAO, QnTw y QnAO, al ser colocadas sobre la piel, exhiben propiedades superiores de barrera comparadas con el resto de las formulaciones.

En los estudios de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) se observó una única endoterma a aproximadamente 115°C, relacionada con la pérdida de agua y la desnaturalización de la queratina, sin que hubiera diferencias en la temperatura a la que ocurrió esta transición para las diferentes formulaciones. Por tanto, los diferentes aditivos no mostraron una interacción con las proteínas de EC porcino, y por tanto no afectaron su desnaturalización.

Los resultados de TEWL y FTIR/ATR no muestran diferencias significativas para la piel tratada con las diferentes películas, lo que implicaría que sus componentes no alteran la estructura de la barrera de permeabilidad cutánea. Esto puede atribuirse a la baja concentración de aditivos en las películas.

Los estudios de FTIR/ATR realizadas en voluntarios indican que aparentemente no hay una extracción de lípidos del estrato córneo, al no haber una disminución significativa en las áreas de los picos correspondientes a las cadenas alquílicas de los lípidos del EC localizados en 2920 y 2850 cm^{-1} .

De acuerdo a los resultados obtenidos y a que no hubo diferencias en los datos obtenidos con las pruebas biofísicas, se sugiere que la película que contiene sólo Quitosán cumple con los requerimientos para fungir como barrera en piel dañada.

Las películas de Quitosán conteniendo aditivos que potencialmente actúan como promotores de absorción deben ser estudiadas incluyendo fármacos, con el fin de determinar su aplicación como plataformas para la liberación de activos en piel.

Sugerencias

y

Recomendaciones

7. SUGERENCIAS Y RECOMENDACIONES

Durante el desarrollo del presente trabajo y la obtención de resultados se observaron que podían tomarse en cuenta medidas como:

- Aumentar la concentración de los aditivos contenidos en las películas de Qn para evidenciar posibles interacciones con los componentes membranales que no pudieron posiblemente ser visualizados debido a la baja concentración manejada.
- Realizar pruebas de irritabilidad una vez aumentada la concentración de los aditivos (promotor de absorción) y proponer el uso de algunos otros (e.g., ésteres de sacarosa).
- Establecer un periodo de monitoreo para la prueba de pérdida de agua transepidermal más prolongado (mayor a 30 minutos).
- Realizar pruebas de permeabilidad a través de piel con películas conteniendo un fármaco.
- Realizar pruebas de liberación de fármaco a partir de películas de Quitosán.

El presente trabajo constituye una excelente referencia para iniciar estudios de investigación para nuevas formas de administración farmacéuticas, debido a que estas películas pueden fungir como parche transdérmico para la administración de una gran variedad de fármacos. También puede utilizarse el polímero natural Quitosán y promotores de absorción en geles termoreversibles.

Referencias

8. REFERENCIAS

Allan, G., En Smith, E. W. Y Mailbach, H. I., Percutaneous Penetration Enhancers, Ed., CRC. Press. Inc., USA, 1995, pp 129-136.

Ananthapadmanabhan, K.P., Yu, K.K., Meyers, C.L., Aronson, M.P., Binding of surfactants to stratum corneum. J. Soc. Cosmet. Chem. 47 (1996) 185-200.

Ashton, P., Walters, K.A., Brian, K.R., Hadgraft, J., Surfactant effects in percutaneous absorption I. Effects on protein and lipid structure of the stratum corneum. Int. J. Pharm. 87 (1992), 261-264.

Austin. P. R., Brine, C. J. et al., Chitin. New Facels o Research, Science. 15 (1981) pp 749.

Avena-Bustillos, R. J., Drochta, J.M., Water Vapor Permeability of Caseinate-Based Edible Films as Affected by pH, Calcium Crosslinking and Lipid Content., J. Food Sci, 58 (1993), 904-907.

Babur C. Stephen L., Simulation and Analysis of Differential Scanning Calorimetry Output: Protein Unfolding Studies 1, J. Chem. Edu., 74 (1997) pp 236.

Baby, R.A., Lemos L. A., Robles V. M., Santos, L. P., Kawano, Y., Kaneko T. M., Evaluation of the interaction de surfactants winc stratum corneum model membrane from Bothrops jacaraca by DSC., J, Pharm., 317 (2006), 7-9.

Berkeley R. C. W., Muzzarelli R. A. A., Proceedings of the first international conference on chitin/chitosan. Pariser ER. Eds., MIT Sea Grant Report. 1977, pp 570.

Bangyekan C., Aht-Ong D., Srikulkit K., Preeparation properties evaluation of chitosan-coated cassava starch film, 63 (2006), 61-71.

Barry, B. W., Mode of action of penetration enhancers in human skin, J. Control. Rel, 6 (1987) 85-97.

Barry, B.W., Williams, A.C., Permeation enhancement through skin. In: Swarbrick, J., Boylan, J.C., Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, vol.11. Marcel Dekker, New York, 1995, pp. 449-493.

Bronaugh, R. L, et al., Methods for In Vitro percutaneous absorption studies, Part 3. Hydrophobic compounds, J. Pharml. Sci 73 (1984), 1255-1528.

Butler, B. L., Vergano, P.J., Testing RF., Bunn, J., Wiles J.L. Mechanical and Barrier Properties of Edible Chitosan Films as affected by Composition and storage., *J. Food Sci*, 61 (1996), 953-955, 961.

Caner, C., Vergano P. J., Wiles J.L., Chitosan Film Mechanical and Permeation Properties as Affected by Acid, Plasticizer, and Storage., *J. Food Sci*, 63 (1998), 1049-1053.

Cazares. D. J. Estudios del efecto del pH sobre la absorción percutánea de Lidocaína utilizando laureato y oleato de sacarosa como promotores de absorción. Tesis de Licenciatura FES-C. UNAM (2003).

Chang, Y. P., B. B., Seow, C.C., Plasticizing-Antiplasticizing Effects of Water on Physical Properties of Tapioca Starch Films in the Glassy State, *J. Food Sci*, 65 (2000), 445-451.

Chien, Y.W., Caban, B. E., Mares S.E., Transdermal Controlled-Release Drug Administration. In: *Novel Drug Delivery Systems, Fundamentals Developmental Concepts and Biomedical assessment*. Marcel Dekker, inc. New York and Basel, 1982, pp 149-217.

Cornwell, P.A., Barry, B.W., Boustra, J.A., Gooris, G.S., Modes of action of terpene penetration enhancers in human skin; differential scanning calorimetry, small-angle X-ray diffraction and enhancer uptake studies, *J. Pharm.* 127 (1996), 9-26.

Fang, J.Y., Leu, Y.L, Wang, Y.Y., Tsai, Y.H., In vitro topical application and in vivo pharmacodynamic evaluation of nonivamide hydrogels using Wistar rat as an animal model, *Euro J Pharm Sci.*, 15 (2002), 417-23.

Fitzpatrick, T., Arnde, K., Clark, W., *Dermatology in General Medicine*. 5th ed. New York: McGraw-Hill, 1999, pp 171-174.

Ganem, R. A., Piñón, S. E., Quintanar, G. D., Uso de Promotores de Absorción Percutánea. *Ciencia Cosmética*, 4 (1998), 19-25.

García G. E. Tesis de Licenciatura QFB. Caracterización del Quitosán como excipiente de compresión directa, FES-C (1998).

Garnica M., Permeabilidad al vapor de agua y propiedades mecánicas de películas modificadas de Quitosán., Tesis de Licenciatura, I. A, México 2001, pp142.

Gay, C.L., Guy, R.H., Golden, G.M., Mak, V.H.W., Francoeur, M.L., Characterization of low-temperature (i.e. B65°C) lipid transitions in human stratum corneum. *J. Invest. Dermatol*, 103 (1994), 233-239.

Giardiono R, Castaldini C. Biológico material for wound healing. In: Brine CJ, Sanford PA, Zikakis JP, editors. *Advances in chitin and chitosan*. London: Elsevier, 1992, pp 16-23.

Giardiono R, Castaldini C. Biológico material for wound healing. In: Brine CJ, Sanford PA, Zikakis JP, editors. *Advances in chitin and chitosan*. London: Elsevier, 1992, pp 16-23.

Golden, G.M., Guzek, D.B., Harris, R.R., McKie, J.E., Potts, R.O., Lipid thermotropic transitions in human stratum corneum. *J. Soc. Invest. Dermatology*. 86 (1986), 255-259.

Golden, G.M., McKie, J.E., Potts, R.O., Role of stratum corneum lipid fluidity in transdermal drug flux. *J. Pharm. Sci.* 76 (1987), 25-28.

Gontard, N., Guilbert, S., Cuq, J. L., Water and Glycerol as Plasticizers Affect Mechanical and Water Vapor Barrier Properties of an Edible Wheat Gluten Film., *J. Food Sci.*, 58 (1993), 206-211.

González G., Virgilio A., Carlos A. Guerrero Salazar, Ubaldo Ortiz Méndez, *Estructura Química Y Compatibilidad De Poliamidas Con Quitina Y Quitosán CIENCIA UANL / 5* (2002), 343-348.

Hackman, R. H., Chitin and The Fine Structure Of Cuncles. Chitin and Benzoylohenyl Ureas. Wright, J. E and Rethakaran, A. Ed, Dr. W. Junk Publishers, (1987), pp 30-39.

Howes, D., et al., *Methods for assesing Percutaneous Absorptio*, Atlanta, 24 (1994), pp 81-90.

Knapczyk, J., Krowczynski. L., Krzek, J., *Requirements O Chitosan For Pharmaceutical and Biomedical Aplication*, Nicholas Copemicus Medical Academy. 1992, pp 657-663.

Knorr Diestrich., Use of chitinous polymers in food: A challenge for food research and development, *Food tecnology*, 38 (1984), 85-89.

Krochta, J. M., De Mulder Johnston, C., *Edible films Solve Problems*, *Food Technology*, 51 (1997), 60-74.

Langer R. Transdermal drug delivery: past progress, current status, and future prospects. *Adv Drug Deliv Rev* 56 (2005), 557-558.

Leopold, C.S., Lippold, B.C., An attempt to clarify the mechanism of the penetration enhancing effects of lipophilic vehicles with differential scanning calorimetry (DSC), *J. Pharm. Pharmacol.* 47 (1994), 276-281.

López C. M., Tesis de Maestría, Estudio del efecto del laurocapram (Azona®) y 4-deciloazolidin-2-ona (Dermac®) sobre la barrera de permeabilidad de la piel mediante pruebas de infrarrojo, pérdida de agua transepidermal y estudios de permeación In Vivo, FES-C. (2003).

Madison, K.C., Swatzenruber, D.S., Wertz, P.W., Presence of intact intercellular lipid lamellae in the upper layers of the stratum corneum., *J Inves Dermatol.*, 88 (1987), 714-718.

Maghraby, G. M. M., Williams, A. C, Barry B. W, Interactions of surfactants (edge activators) and skin penetration enhancers with liposomes., *J.Pharm*, 276 (2004), 143-161.

Marchionini, A., Schade, H., 1928 *Der Sauremantel der Haut*. *Klinisches Wochenschrift* 7, 12–20. Links

Martini Marié-Claude, Introducción a la dermatofarmacia y a la cosmetología. Editorial ACRIBIA, S.A., Zaragoza España 2005. pp 66, 67.

Matheson D.S., Green B.J., Friedman S.J., *J. Biol. Resp. Modif.*, 3,445 (1984).

McHugh, T, H., Senesi, E., Apple Wraps: A Novel Method to Improve the Quality and Extend the Shelf Life of Fresh-cut Apples, *J. Food Sci*, 65 (2000), 480-485.

Michael E. Brown, Introduction to Thermal Analysis, Techniques and Applications, Secaucus, NJ USA: Kluwer Acad., 2nd ed., 2001; libro electrónico.

Miranda, C.P., Tesis de Maestría, Propiedades antibacterianas del Quitosán, FESC (2000).

Morillon, V., Debeaufort, F., Capelle, M., Bond, G., Voilley, A., Influence of the Physical State of Water on the Barrier Properties of Hydrophilic and Hydrophobic Film. *J. Agric. Food Chem.* 43 (2000), 11-16.

Morrillon, B., Debeaufort, F., Blond, G., Capelle, M. and Voiller, A., Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: a review. *Crit., Rev. Food Sci. Nutr*, 42 (2002), 67-89.

Muzzarelli RAA, Monica MB, Pugnaroni A, Biagini G. Biochemistry, histology and clinical uses of chitins and chitosans in wound healing. In: Jolles P, Muzarelli RAA, editors. *Chitin and chitinases*. Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag, 1999. pp 251-264.

Muzzarelli, R. C., Jenunianux, C. and Gooday, G. *Chitin in Nature and Technology*, Plenum Press., N.Y. London 3rd. 1986.

Naik, A., Guy, R.H., *Mechanisms of transdermal drug delivery: infrared spectroscopy and differential scanning calorimetric investigation of the stratum corneum barrier function*, New York: Marcel Dekker, Inc., 1997, pp 87-162.

Paouliot, R., Germain, L., Auger, F. A., Tremblay, N., Juhaz, J., Physical characterization of the stratum corneum of an In Vitro human skin equivalent produced by tissue engineering and its comparison with normal human skin by ATR-FTIR spectroscopy and thermal analysis (DSC), *Biochimica et Biophysica* 1439 (1999), 341- 342.

Rao SB, Sharma CP. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potencial, *J. Biomed Mater Res.*, 4 (1996), 48-52.

Rassner GE. *Manual, Atlas de Dermatología*. Ed. HarcourtMadrid, España. 1999.

Rigg, P.C., Barry, B.W., Shed snake skin and hairless mouse skin as a model membrane for human skin during permeation studies, *J. Invest. Dermatol*, 94 (1990), 235-240.

Saúl A., *Lecciones de Dermatología*, Ed. Méndez Fernández. México DF, 9ª Edición, 1979, pp 8-9.

Setnikar, I. Cereda, R. Pacini, MA. and Revel L., Antireactive properties of glucosamine sulphate., *Arzneim-Forsch/Drug Res* 41 (1991), 157-161.

Setnikar, I., Greda, R., Pacine, M.A., *Arzneim-Forsch*, 41(1991), 157.

Shimahara, K., Kakiguchi. Y. 1998 "Preparation Of Curstaceo Chin And Chitosan" Bulletin 161(47), p417-423.

Stanley, J. W., Anatomía y Fisiología Humana Nva Ed. Interamericana. México,. 1ª. Edición. 1982, pp 78-86.

Takeuchi Y., Yasukawa H., Yamaoka Y., Taguchi K., Fukushima S., Shimonaka Y., Nishinaga H., Morimoto Y., Behavior of propylene glycol (PG) in dermis after treatment of rat intact skin surface with fatty acids, fatty amines or Azone dissolved in PG, Biological & pharmaceutical bulletin, 18 (1995), 304-309.

Tanojo, H., Hans E. Junginger, H., Harry E., In vivo human skin permeability enhancement by oleic acid: transepidermal water loss and fourier-transform infrared spectroscopy studies, J. of Controlled Release., 18 (1997), 31-39 .

Tanveer, A.k., Kok Khiang, P., and Hung, S.C., Mechanical, Bioadhesive strength and Biological Evaluations of chitosan films for wound dressing. J. Pharm Pharm Sci., 3 (2000), 303-311.

Villarino, N.F., Landoni, M.F., Administración transdérmica de fármacos: una alternativa terapéutica. Analecta Veterinaria, 2006, pp 28-37.

Vojdani, F., Torres, J. A., Potassium Sorbate Permeability of Methylcellulose and Hydroxypropyl Methylcellulose Coating: Effect of Fatty Acids, Journal of Food Science, 55 (1990), pp 841-851.

Walters, K.A. Penetration enhancers and their use in transdermal therapeutic systems. In: Hadgraft, J. And Guy, R.H. Trandermal Drug Delivery, Mardel. Dekker, Inc., USA., 1989 pp 197-246.

Waters, K.A., Walker, M., Olejnik, O., Non-ionic surfactant effects on hairless mouse skin permeability characteristic. J. Pharm. Pharmacology. 40 (1988), 525-529.

Wertz, P.W., Van Den Bergh B, The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers, Chem Phys Lipids., 91 (1998), 85-96.

Wiles, J.L., Vergano P.J., barron, FH., Bunn, J.M., Testin, RF., Water Vapor Transmission Fates and Sorption Behavior of Chitosan Films., J. Food Sci., 65 (2000), 1175-1179.

Windra, A., Skin, Synthetic, in Mark, H.F., Bikales, N.M., Overger, C.G., and Menges, G., (eds), Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, 2nd edition, Vol 15, John Willey and Sons, USA, 1989 pp 335-344.

Wong, D. W., Gastineau, F. A, Gregorsy, K.S., Tillin, S. J., Pavlath, A. E., Chitosan-Lipid Films: Microstructure and Surface Energy, J. Agric. Food Chem. 40 (1992), 540-544.

www.hipernatural.com/images/skin.jpg

www.tecsup.edu.pe

Yong, C., Schmidt R. J., Hamlyn P. F., Andrews A. M., Turner T.D., Biocompatibility of potential wound management products: Fungal mycelia as a source of chitin/Chitosan and their effect on the proliferation of human F1000 fibroblast in culture. J. Biomed Mater Res., 28 (1994), 463-469.

Zupanets, I.A., Drogovoz SM, Iakovleva LV, Pavliř AI, Bykova OV., Physiologic importance of glucosamine Fiziol Zh. 1990 pp 115-20.

Zupanets, I.A., Drogovoz, S.M., Iakovleva, L.V., Pavli, A.I., Bykova, O.V., Physiologic importance of glucosamine, Fiziol Zh., 36 (1990), 115-120.

***A*nexo**

CLASIFICACIONES FOTOTIPO

Se conoce como fototipo a la capacidad de la piel para asimilar la radiación solar.

- § **Fototipo I.** Piel muy clara y muy sensible, con muchas pecas, que responde a cabello pelirrojo, ojos verdes o azules. De mínimo bronceado, necesita siempre protección. Su finura resplandece en la juventud, pero pronto aparecen los signos del envejecimiento.
- § **Fototipo II.** Piel clara y sensible con pecas, propia de cabellos rubios y ojos claros. De bronceado ligero, necesita la máxima protección, y presenta de forma temprana los signos del fotoenvejecimiento.
- § **Fototipo III.** Piel clara o mate, de pocas pecas y asidua de cabellos rubios o castaños, y ojos pardos. De sensibilidad media, se broncea ligeramente y sólo necesita protección alta los primeros días, al adaptarse bien a la agresión de los rayos U.V. Ligera tendencia a las manchas.
- § **Fototipo IV.** Piel mate, sin pecas, de escasa sensibilidad, propia de cabellos castaños y ojos oscuros. De bronceado intenso, sólo requiere protección media los primeros días del bronceado. Tiene tendencia a discromías, pero a cambio, presenta un fotoenvejecimiento tardío.
- § **Fototipo V.** Piel oscura, sin pecas y poco sensible, propia de cabellos castaño-oscuro y ojos oscuros, Su tendencia a las discromías es acentuada. En cambio, el fotoenvejecimiento, es tardío y leve.
- § **Fototipo VI.** Piel prácticamente insensible, sin pecas, que se corresponde con cabello y ojos negros. Se oscurece más con el sol y en ocasiones, aparecen manchas. (http://www.karysabeauty.com/color_para_tu_piel.aspx)

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

In Vitro.
Intercambio gaseoso
(n=3)

| PELICULAS | 1 | 2 | 3 | PROMEDIOS | DESVEST | C.V |
|-----------|--------|--------|--------|-----------|---------|------|
| Qn | 107.62 | 106.02 | 108.57 | 107.40 | 1.29 | 1.20 |
| QnGli | 112.36 | 110.29 | 111.64 | 111.43 | 1.05 | 0.94 |
| QnTw | 102.30 | 102.54 | 98.80 | 101.22 | 2.10 | 2.07 |
| QnAO | 102.44 | 103.45 | 103.84 | 103.17 | 2.69 | 2.72 |
| QnGliTw | 103.43 | 105.73 | 106.87 | 105.35 | 1.75 | 1.66 |
| QnTwAO | 106.89 | 105.10 | 103.68 | 105.22 | 1.61 | 1.53 |
| QnGliAO | 98.33 | 96.48 | 96.46 | 97.09 | 1.07 | 1.11 |
| QnGliTwAO | 107.05 | 102.79 | 96.36 | 102.07 | 5.38 | 5.27 |

Análisis de varianza de un factor la película ($\alpha=0.05$)

ANÁLISIS DE VARIANZA

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|------------|--------------|----------------------|
| Entre grupos | 389.637938 | 7 | 55.6625626 | 9.93524737 | 8.4481E-05 | 2.6571966 |
| Dentro de los grupos | 89.6405463 | 16 | 5.60253414 | | | |
| Total | 479.278485 | 23 | | | | |

Multiple Range Tests for TEWL *In Vitro* by formulas *In Vitro*

 Method: 95.0 percent Tukey HSD

| Level | Count | LS Mean | LS Sigma | Homogeneous Groups |
|-------|-------|---------|----------|--------------------|
| 7 | 3 | 97.0893 | 1.36657 | X |
| 3 | 3 | 101.215 | 1.36657 | X |
| 8 | 3 | 102.067 | 1.36657 | X |
| 4 | 3 | 103.175 | 1.36657 | X |
| 6 | 3 | 105.221 | 1.36657 | X |
| 5 | 3 | 105.345 | 1.36657 | X |
| 1 | 3 | 107.402 | 1.36657 | X |
| 2 | 3 | 111.429 | 1.36657 | X |

Multiple Range Tests for TEWL *In Vitro* by formulas *In Vitro*

 Method: 95.0 percent Duncan

| Level | Count | LS Mean | LS Sigma | Homogeneous Groups |
|-------|-------|---------|-------------|--------------------|
| 7 | 3 | 97.0893 | 2.69627E134 | X |
| 3 | 3 | 101.215 | 2.69627E134 | X |
| 8 | 3 | 102.067 | 2.69627E134 | X |
| 4 | 3 | 103.175 | 2.69627E134 | XX |
| 6 | 3 | 105.221 | 2.69627E134 | XX |
| 5 | 3 | 105.345 | 2.69627E134 | XX |
| 1 | 3 | 107.402 | 2.69627E134 | XX |
| 2 | 3 | 111.429 | 2.69627E134 | X |

| Contrast | Difference |
|----------|------------|
| 1 - 2 | -4.02711 |
| 1 - 3 | *6.18653 |
| 1 - 4 | 4.22654 |
| 1 - 5 | 2.05682 |
| 1 - 6 | 2.18105 |
| 1 - 7 | *10.3126 |
| 1 - 8 | *5.33474 |
| 2 - 3 | *10.2136 |
| 2 - 4 | *8.25365 |
| 2 - 5 | *6.08393 |
| 2 - 6 | *6.20815 |
| 2 - 7 | *14.3397 |
| 2 - 8 | *9.36185 |
| 3 - 4 | -1.95999 |
| 3 - 5 | -4.12971 |
| 3 - 6 | -4.00549 |
| 3 - 7 | *4.12607 |
| 3 - 8 | -0.851794 |
| 4 - 5 | -2.16972 |
| 4 - 6 | -2.0455 |
| 4 - 7 | *6.08606 |
| 4 - 8 | 1.1082 |
| 5 - 6 | 0.124225 |
| 5 - 7 | *8.25578 |
| 5 - 8 | 3.27792 |
| 6 - 7 | *8.13156 |
| 6 - 8 | 3.15369 |
| 7 - 8 | *-4.97786 |

* denotes a statistically significant difference.

In Vitro
Calorimetria Diferencial de Barrido
(DSC)
n=3

| Fórmula | 1 | 2 | 3 | Promedio | Des. Est | CV |
|------------------|----------|----------|----------|-----------------|-----------------|-----------|
| Control | 118 | 113.75 | 114.58 | 115.44 | 2.25 | 1.95 |
| Qn | 87.17 | 96.18 | 110.4 | 97.92 | 11.71 | 11.96 |
| QnGli | 95.24 | 98.03 | 116.09 | 103.12 | 11.32 | 10.98 |
| QnTw | 105.58 | 99.74 | 86.48 | 102.66 | 4.13 | 4.02 |
| QnAO | 112.19 | 115.84 | 120.88 | 116.30 | 4.36 | 3.75 |
| QnGliTw | 98.3 | 102.98 | 92.43 | 100.64 | 3.31 | 3.29 |
| QnTwAO | 109.49 | 113.28 | 102.75 | 108.51 | 5.33 | 4.92 |
| QnGliAO | 96.05 | 117.72 | 97.38 | 103.72 | 12.15 | 11.71 |
| QnGliTwAO | 114.21 | 97.2 | 111.56 | 107.66 | 9.15 | 8.50 |

Análisis de varianza de un factor DSC ($\alpha=0.05$)

| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i> | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|----------|---------------------|-----------------------------|
| Entre grupos | 1,262.44 | 8 | 157.80 | 2.11 | 0.09 | 2.51 |
| Dentro de los grupos | 1,345.70 | 18 | 74.76 | | | |
| Total | 2,608.14 | 26 | | | | |

Perdida de Agua Transepidermal (TEWL) *In Vivo* “Adherida”

| Voluntario Fórmula | A | D | E | F | M | V | Promedio | Des. Est | CV |
|-----------------------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|----------|----------|--------|
| Qn | - 5.82 | 0.88 | - 1.85 | | 2.39 | 1.08 | - 0.66 | 3.27 | 493.53 |
| QnGli | - 7.48 | - 1.18 | - 2.38 | - 12.47 | - 0.28 | 11.18 | - 2.10 | 7.96 | 378.68 |
| QnTw | - 9.10 | 0.29 | - 6.54 | 0.62 | 1.20 | 3.44 | - 1.68 | 4.95 | 294.28 |
| QnAO | - 1.23 | - 2.50 | - 4.43 | - 2.86 | 0.20 | - 0.66 | - 1.91 | 1.68 | 87.74 |
| QnGliTw | - 4.38 | - 2.65 | - 0.57 | 3.67 | - 1.71 | - 8.26 | - 2.32 | 3.97 | 171.40 |
| QnTwAO | - 5.08 | - 6.72 | - 5.36 | - 5.85 | - 1.48 | - 9.43 | - 5.65 | 2.58 | 45.66 |
| QnGliAO | 2.50 | - 1.33 | - 0.47 | - 1.71 | - 0.02 | 2.76 | 0.29 | 1.91 | 661.43 |
| QnGliTwAO | 3.65 | - 2.46 | - 1.11 | - 1.11 | - 1.16 | - 0.46 | - 0.44 | 2.11 | 477.93 |

Análisis de Varianza de un factor de TEWL *In Vivo* “Adherida” la película ($\alpha=0.05$)

| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i> | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|----------|---------------------|-----------------------------|
| Entre grupos | 135.14 | 7 | 19.31 | 1.16 | 0.35 | 2.26 |
| Dentro de los grupos | 649.02 | 39 | 16.64 | | | |
| Total | 784.16 | 46 | | | | |

Perdida de Agua Transepidermal (TEWL) *In Vivo* “Desprendida”

| Voluntario Fórmula | A | D | E | F | M | V | Promedio | Des. Est | CV |
|-----------------------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|----------|----------|------------|
| Qn | - 7.37 | | 1.44 | - 11.72 | - 0.04 | 5.39 | - 2.46 | 6.94 | - 282.14 |
| QnGli | - 6.56 | 1.78 | - 2.40 | - 11.69 | - 0.49 | 3.19 | - 2.70 | 5.58 | - 206.72 |
| QnTw | - 6.17 | 0.01 | - 5.76 | - 4.04 | 0.51 | 11.96 | - 0.58 | 6.76 | - 1,162.91 |
| QnAO | - 0.51 | - 0.09 | - 5.04 | - 4.30 | 1.27 | 5.45 | - 0.54 | 3.84 | - 716.79 |
| QnGliTw | 0.70 | - 6.57 | - 1.14 | - 2.56 | 0.55 | - 5.42 | - 2.41 | 3.05 | - 126.63 |
| QnTwAO | - 3.46 | - 4.89 | 0.72 | - 2.16 | 1.26 | - 6.83 | - 2.56 | 3.16 | - 123.61 |
| QnGliAO | - 1.12 | - 0.10 | - 3.55 | 0.55 | 1.93 | 2.52 | 0.04 | 2.20 | 5,950.78 |
| QnGliTwAO | 4.05 | - 2.64 | 0.00 | - 0.33 | 1.45 | 0.56 | 0.51 | 2.20 | 429.25 |

Análisis de Varianza de un factor de TEWL *In Vivo* “Desprendida” la película ($\alpha=0.05$)

| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | F | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|----------|---------------------|-----------------------------|
| Entre grupos | 72.35 | 7 | 10.34 | 0.51 | 0.82 | 2.26 |
| Dentro de los grupos | 795.44 | 39 | 20.40 | | | |
| Total | 867.7886432 | 46 | | | | |

**GROSORES DE PELÍCULAS PREPARADAS
A PARTIR DE 10 ML DE SOLUCIÓN DE QUITOSÁN**

| PELÍCULAS | PROMEDIO (MCM) | DESVEST | CV |
|-----------|-------------------|---------|-------|
| Qn | 17.77 | 0.19 | 1.05 |
| QnGli | 25.15 | 1.54 | 6.13 |
| QnTw | 21.61 | 1.54 | 7.15 |
| QnAO | 19.24 | 3.86 | 20.05 |
| QnGliTw | 19.99 | 2.38 | 11.92 |
| QnTwAO | 18.49 | 1.87 | 10.14 |
| QnGliAO | 22.49 | 3.11 | 13.81 |
| QnGliTwAO | 21.46 | 4.43 | 20.65 |

**Análisis de varianza de un factor de grosores de películas preparadas
a partir de 10 ml de solución de Quitosán ($\alpha=0.05$)**

| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i> | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|----------|---------------------|-----------------------------|
| Entre grupos | 121.4367 | 7 | 17.34809 | 2.386276 | 0.07096553 | 2.657197 |
| Dentro de los grupos | 116.3191 | 16 | 7.269943 | | | |
| Total | 237.7558 | 23 | | | | |

**GROSORES DE PELÍCULAS PREPARADAS
A PARTIR DE 20 ML DE SOLUCIÓN DE QUITOSÁN**

| Películas | Promedio | Des. Est | CV |
|------------------|-----------------|-----------------|--------------|
| Qn | 38.84 | 11.57 | 29.79 |
| QnGli | 43.87 | 0.78 | 1.78 |
| QnTw | 41.56 | 4.80 | 11.55 |
| QnAO | 35.41 | 0.97 | 2.74 |
| QnGliTw | 36.99 | 1.80 | 4.87 |
| QnTwAO | 38.53 | 1.74 | 4.52 |
| QnGliAO | 38.12 | 0.21 | 0.56 |
| QnGliTwAO | 45.23 | 2.58 | 5.71 |

**Análisis de varianza de un factor de grosores de películas preparadas
a partir de 20 ml de solución de Quitosán ($\alpha=0.05$)**

| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i> | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|----------|---------------------|-----------------------------|
| Entre grupos | 245.0406 | 7 | 35.0058 | 1.633332 | 0.19668149 | 2.6571966 |
| Dentro de los grupos | 342.9142 | 16 | 21.43214 | | | |
| Total | 587.9548 | 23 | | | | |

FTIR/ATR
Áreas asimétricas
(n=3)

| Voluntario Fórmula | E | V | D | A | F | M | Promedio | Destd | CV |
|-----------------------|------|------|------|------|------|------|----------|-------|-------|
| Qn | 0.24 | 0.39 | 1.73 | 3.16 | 0.84 | 1.51 | 1.31 | 1.08 | 82.54 |
| QnGli | 1.05 | 0.26 | 0.75 | 0.80 | 0.53 | 0.74 | 0.69 | 0.27 | 38.51 |
| QnTw | 2.71 | 0.32 | 1.02 | 0.80 | 0.98 | 1.35 | 1.20 | 0.82 | 68.17 |
| QnAO | 0.81 | 0.27 | 0.82 | 0.58 | 0.89 | 1.30 | 0.78 | 0.34 | 43.70 |
| QnGliTw | 1.06 | 2.02 | 1.52 | 1.13 | 1.72 | 1.55 | 1.50 | 0.36 | 23.97 |
| QnTwAO | 0.70 | 1.73 | 0.79 | 1.15 | 1.84 | 2.14 | 1.39 | 0.60 | 42.84 |
| QnGliAO | 1.34 | 1.30 | 0.53 | 3.16 | 1.21 | 4.67 | 2.04 | 1.56 | 76.70 |
| QnGliTwAO | 0.81 | 0.77 | 0.35 | 0.69 | 1.59 | 1.38 | 0.93 | 0.46 | 49.77 |

Áreas asimétricas
Análisis de varianza de un factor de áreas asimétricas ($\alpha=0.05$)

| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i> | <i>Probabilidad crítica para F</i> | <i>Valor</i> |
|--------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--|----------|--|--------------|
| Entre grupos | 8.04 | 7 | 1.15 | 1.78 | 0.12 | 2.25 |
| Dentro de los grupos | 25.83 | 40 | 0.65 | | | |
| Total | 33.86 | 47 | | | | |

FTIR/ATR
Áreas simétricas
n=3

| Voluntario Fórmula | E | V | D | A | F | M | Promedio | Destd | CV |
|-----------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------------|--------------|-----------|
| Qn | 0.23 | 0.39 | 1.67 | 2.95 | 0.89 | 1.49 | 1.27 | 1.00 | 78.89 |
| QnGli | 1.08 | 0.27 | 0.76 | 0.79 | 0.57 | 1.33 | 0.80 | 0.37 | 46.57 |
| QnTw | 2.92 | 0.33 | 1.02 | 0.78 | 1.00 | 1.31 | 1.23 | 0.89 | 72.68 |
| QnAO | 0.83 | 0.26 | 0.84 | 0.57 | 0.94 | 1.15 | 0.77 | 0.31 | 40.51 |
| QnGliTw | 0.68 | 1.92 | 1.51 | 1.12 | 1.60 | 1.04 | 1.31 | 0.45 | 34.12 |
| QnTwAO | 0.75 | 1.72 | 0.80 | 1.15 | 1.97 | 2.03 | 1.40 | 0.58 | 41.18 |
| QnGliAO | 1.29 | 1.29 | 0.55 | 2.95 | 1.27 | 4.77 | 2.02 | 1.56 | 77.40 |
| QnGliTwAO | 0.82 | 0.78 | 0.35 | 0.62 | 1.67 | 1.32 | 0.93 | 0.48 | 52.00 |

Áreas simétricas
Análisis de varianza de un factor de áreas simétricas ($\alpha=0.05$)

| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i> | <i>Probabilidad crítica para F</i> | <i>Valor</i> |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|----------|------------------------------------|--------------|
| Entre grupos | 6.92 | 7 | 0.99 | 1.51 | 0.19 | 2.25 |
| Dentro de los grupos | 26.23 | 40 | 0.66 | | | |
| Total | 33.15 | 47 | | | | |

FTIR/ATR
Picos asimétricos
n=3

| Voluntario Fórmula | E | V | D | A | F | M | Promedio | Des. Est. | CV |
|-----------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------------|------------------|-----------|
| Qn | 0.9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.15 | 0.37 | 244.95 |
| QnGli | 0 | 0 | 0 | 1.9 | -1.9 | 2 | 0.33 | 1.45 | 435.84 |
| QnTw | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.17 | 0.41 | 244.95 |
| QnAO | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0.83 | 0.98 | 117.98 |
| QnGliTw | 3.9 | -3.8 | 1 | -1.9 | 2 | 2 | 0.53 | 2.85 | 533.99 |
| QnTwAO | 2 | 0 | 1.9 | 0 | 1.9 | 0 | 0.97 | 1.06 | 109.61 |
| QnGliAO | -2.9 | 1.9 | 1.9 | 0 | 3.8 | 0 | 0.78 | 2.30 | 293.27 |
| QnGliTwAO | -1.9 | 0 | 4.8 | 0 | 5.8 | -2 | 1.12 | 3.37 | 301.85 |

Picos asimétricos
Análisis de varianza de un factor de picos asimétricos ($\alpha=0.05$)

| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i> | <i>Probabilidad crítica para F</i> | <i>Valor F</i> |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|----------|------------------------------------|----------------|
| Entre grupos | 5.73 | 7 | 0.82 | 0.22 | 0.98 | 2.25 |
| Dentro de los grupos | 146.26 | 40 | 3.66 | | | |
| Total | 151.98 | 47 | | | | |

FTIR/ATR
Picos simétricos
n=3

| Voluntario Fórmula | E | V | D | A | F | M | Promedio | Des. Est | CV |
|-----------------------|------|---|------|---|-----|---|----------|----------|--------|
| Qn | 0.9 | 0 | -1.9 | 0 | 0 | 0 | 0.17 | 0.92 | 553.39 |
| QnGli | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0.33 | 0.82 | 244.95 |
| QnTw | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.17 | 0.41 | 244.95 |
| QnAO | 0 | 2 | 0 | 0 | 1.9 | 0 | 0.65 | 1.01 | 155.00 |
| QnGliTw | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.33 | 0.82 | 244.95 |
| QnTwAO | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0.17 | 0.41 | 244.95 |
| QnGliAO | -0.9 | 0 | 1 | 0 | 1.9 | 0 | 0.33 | 0.98 | 292.51 |
| QnGliTwAO | -1.9 | 0 | 2 | 0 | 1.9 | 0 | 0.33 | 1.45 | 435.84 |

Picos simétricos
Análisis de varianza de un factor de picos asimétricos ($\alpha=0.05$)

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad crítica para F | Valor |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|------|-----------------------------|-------|
| Entre grupos | 2.23 | 7 | 0.32 | 0.39 | 0.90 | 2.25 |
| Dentro de los grupos | 32.97 | 40 | 0.82 | | | |