



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

**PREPARACIÓN DE FILMS DE
COMPLEJO POLIELECTROLITO QUITOSANO - ALGINATO
Y COMPARACIÓN DE SUS PROPIEDADES MECÁNICAS Y
BIOLÓGICAS CON FILMS DE QUITOSANO**

Profesor Patrocinante

Dr. Cristian Tapia V.
Departamento de Ciencia de los
Alimentos y Tecnología Química

Directores de Memoria

Prof. Olosmira Correa B.
Prof. Edda Costa C.
Departamento de Ciencia y
Tecnología Farmacéutica

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO
CARLA ANDREA CÁRCAMO GÁTICA

SANTIAGO – CHILE

2005

*Con amor
a mi padre Patricio,
a mi madre Ximena,
a mi hermana Paula,
y a mi Frangi.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis directoras de memoria, las académicas Olosmira Correa, Edda Costa y a mi profesor patrocinante Cristian Tapia, que con sus conocimientos, paciencia, ayuda y buena disposición, me permitieron realizar esta memoria de título.

Al proyecto de investigación Facultad – CEPEDQ 2002 y al de Memoria de Título 2004, “Preparación y Caracterización de *Films* de Quitosano y de Complejo Polielectrolito (CPE) Quitosano – Alginato como Apósitos para el Tratamiento de Quemaduras” que financió este trabajo.

A Claudia López (Químico Farmacéutico), Juan José Cabrera (Químico), Evelyn Martínez (Técnico Químico) y Eva Nilo (Técnico Químico) por su ayuda en la preparación de los *films* de quitosano y de complejos polielectrolito quitosano – alginato. Y a Juan Francisco Mora por su ayuda en el montaje del ensayo de bioadhesión.

A Cynthia Vidal, Pedro Villela, Cristian Freite, Juan Francisco Mora y Viviana Cáceres por su ayuda y compañía durante las jornadas en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica.

A mi padre Patricio, a mi madre Ximena y a mi hermana Paula por el amor, la paciencia y el apoyo incondicional entregados en mi camino hacia el logro de este sueño.

A Eduardo, porque en días como estos, sé que es mi amigo.

A Catalina, Patricia, Victoria y a todos esos eternos amigos de que conocí durante mi paso por esta universidad.

Y a Frangi, por su inmenso amor, ayuda, comprensión y compañía.

TABLA DE CONTENIDOS

PORTADA	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
TABLA DE CONTENIDOS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE ECUACIONES	ix
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA	x
RESUMEN	xi
SUMMARY	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Piel	1
1.2. Quemaduras	2
1.3. Curación de Quemaduras y Apósitos	2
1.4. Quitosano	4
1.5. Propiedades del Quitosano como Apósito	7
1.5.1. Formación de <i>Films</i>	7
1.5.2. Propiedades Bioadhesivas	7
1.5.3. Regeneración de Tejidos	8
1.5.4. Propiedades Hemostáticas	8
1.5.5. Propiedades Antimicrobianas	8
1.5.6. Biocompatibilidad	9
1.5.7. Biodegradación	9
1.6. Alginato	10
1.7. Propiedades del Alginato como Apósito	10
1.7.1. Regeneración de Tejidos	11
1.7.2. Biodegradación	11
1.7.3. Bioadhesión	11
1.7.4. Biocompatibilidad	11
1.7.5. Propiedades Hemostáticas	12
1.8. Complejo Polielectrolito Quitosano - Alginato (CPEQA)	12
1.9. Contexto e Implicaciones del Desarrollo de esta Memoria de Título	13
2. HIPÓTESIS	14
3. OBJETIVOS	15
3.1. Objetivo General	15
3.2. Objetivos Específicos	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS	16
4.1. Materiales	16
4.1.1. Quitosanos	16

4.1.2.	Alginatos	16
4.1.3.	Otros	17
4.2.	Preparación de las Soluciones de Quitosano	17
4.3.	Preparación de los <i>Films</i> de Quitosano	17
4.4.	Neutralización de los <i>Films</i> de Quitosano	18
4.5.	Preparación de las Soluciones de Alginato	18
4.6.	Preparación de las Soluciones de CPEQA	18
4.7.	Preparación de Muestras de Ensayo	19
4.8.	Caracterización de la Microestructura de los <i>Films</i>	19
4.9.	Determinación de las Propiedades Mecánicas	20
4.10.	Determinación de Propiedades de Bioadhesión	21
4.11.	Determinación del Grado de Transmisión de Vapor de Agua, TVA.	23
4.12.	Ensayo de Irritación Primaria Dérmica	24
4.13.	Ensayo Intracutáneo	26
4.14.	Protocolo de Evaluación de la Tasa de Descamación del Estrato Córneo	27
4.15.	Análisis Estadístico de Datos	28
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
5.1.	Soluciones de Quitosano, Alginato y CPEQA	29
5.2.	<i>Films</i> de Quitosano, Alginato, CPEQA y Tegaderm®	29
5.2.1.	<i>Films</i> de Quitosano	29
5.2.2.	<i>Films</i> de Alginato	30
5.2.3.	<i>Films</i> de CPEQA	31
5.2.4.	<i>Films</i> de Poliuretano (Tegaderm®)	31
5.2.5.	Microestructuras	31
5.3.	Propiedades Mecánicas	32
5.3.1.	Alargamiento Porcentual, A%	32
5.3.2.	Esfuerzo de Tracción en el Corte, ETC	33
5.4.	Propiedades de Bioadhesión	35
5.5.	Grado de Transmisión de Vapor de Agua, TVA	39
5.6.	Ensayo de Irritación Primaria Dérmica	43
5.7.	Ensayo Intracutáneo	44
5.8.	Protocolo de Evaluación de la Tasa de Descamación del Estrato Córneo	45
6.	CONCLUSIONES	48
7.	BIBLIOGRAFÍA	50
7.1.	Recursos en Línea	55
8.	ANEXOS	57
8.1.	Clasificación de apósitos según la FDA	57
8.2.	Situación nacional de accidentes por quemaduras en la población infantil	58
8.3.	Situación del sector pesquero y Quitosano en Chile	59
8.4.	Industria del Alginato en Chile	60
8.5.	Especificaciones del Analizador de Texturas	61

8.6. Microscopía Electrónica de Barrido	62
8.7. Propiedades Mecánicas	64
8.8. Propiedades de Bioadhesión	66

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1.1.	Clasificación de las quemaduras y sus características importantes.	2
1.2.	Clasificación de apósitos.	3
1.3.	Requisitos generales de un apósito.	4
1.4.	Actividad antimicrobiana del quitosano con respecto a microorganismos que comúnmente infectan quemaduras.	9
4.1.	Descripción de los quitosanos RYMAR y SIGMA.	16
4.2.	Descripción de los <i>films</i> acondicionados para los ensayos.	19
4.3.	Tabla de puntuación utilizada para los ensayos de irritación primaria e intracutáneo.	25
4.4.	Interpretación de puntajes para los ensayos de irritación primaria e intracutáneo.	26
5.1.	pH y Espesor de los <i>Films</i> .	31
5.2.	Propiedades de Permeabilidad de los <i>Films</i> Ensayados.	40
5.3.	TVA de Algunos Apósitos Comerciales.	42
5.4.	Puntajes para la Formación de Eritema y Edema de los <i>Films</i> .	43
5.5.	Puntajes de Irritación Promedio de los <i>Films</i> .	45
8.1.	Características de los Accidentes por Quemaduras en Niños.	58
8.2.	Desembarque Total y de Crustáceos en Chile durante el Periodo 2000 – 2003 (en toneladas).	59
8.3.	Especies de Crustáceos en Chile.	59
8.4.	Especies productoras de Alginato en Chile.	60
8.5.	Especificaciones del Software DAPMAT 3.0.	61
8.6.	Alargamiento Porcentual (A%) de los <i>Films</i> .	64
8.7.	Espesor de los <i>Films</i> de Quitosano Almacenados a 30 y 50% HR.	65
8.8.	Fuerza Máxima de Desprendimiento ($F_{m\acute{a}x}$) de los <i>Films</i> .	66

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1.1.	Diagrama de la sección transversal de la piel humana.	1
1.2.	Estructura química de la celulosa, quitina y quitosano.	5
1.3.	Procesamiento tradicional de los caparzones de crustáceos para la obtención de quitosano.	6
1.4.	Estructura química del alginato.	10
4.1.	Mordazas de aluminio.	20
4.2.	Diagrama de los ensayos mecánicos realizados a los <i>films</i> .	20
4.3.	Diagrama del gráfico Carga vs. Extensión del que se obtuvieron los datos de las propiedades mecánicas.	21
4.4.	Diagrama del plano inclinado construido para la medición de las propiedades de bioadhesión <i>in vitro</i> de los <i>films</i> .	22
4.5.	Diagrama del gráfico Fuerza vs. Extensión del que se obtuvieron los datos de bioadhesión de los <i>films</i> .	22
4.6.	Sistema de medición del TVA.	23
4.7.	Esquema de aplicación de los <i>films</i> para el desarrollo del ensayo destinado a mediar la renovación celular de la piel.	27
5.1.	Reacción química que ocurre durante el tratamiento con una solución de NaOH 0,1 M a los <i>films</i> de quitosano.	30
5.2.	Alargamiento Porcentual (A%) de los <i>films</i> .	33
5.3.	Esfuerzo de Tracción en el Corte (ETC) de los <i>films</i> .	34
5.4.	Comparación de los valores de A% y ETC con valores encontrados en la literatura para los <i>films</i> de Q _o .	35
5.5.	Propiedades de Bioadhesión de los <i>films</i> .	36
5.6.	Comparación de los resultados de la fuerza máxima de desprendimiento (F _{máx}) de los <i>films</i> de quitosano con los descritos por KHAN ET AL. (2000).	38
5.7.	Cinética de evaporación de agua a través de los <i>films</i> ensayados.	39
5.8.	Comparación de los valores de TVA de los <i>films</i> de quitosano con los descritos por el trabajo de WILES ET AL. (2000).	41
8.1.	Esquema del analizador de textura utilizado en la medición de las propiedades mecánicas y de bioadhesión de los <i>films</i> .	61
8.2.	Microfotografías electrónicas de barrido con un aumento de 7000x de los <i>films</i> de Q _o S-LA.	62
8.3.	Microfotografías electrónicas de barrido con un aumento de 7000x de los <i>films</i> de Q _o R-LA.	62
8.4.	Microfotografías electrónicas de barrido con un aumento de 7000x de los <i>films</i> de Q _o S-OH.	63
8.5.	Microfotografías electrónicas de barrido con un aumento de 7000x de los <i>films</i> de Q _o R-OH.	63
8.6.	Coefficientes de Variación (CV) en función de la velocidad de prueba correspondientes a la determinación del Alargamiento Porcentual.	64

ÍNDICE DE ECUACIONES

ECUACIÓN	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
4.1.	Alargamiento Porcentual, A%	21
4.2.	Esfuerzo de Tracción en el Corte, ETC	21
4.3.	Área Transversal Inicial de los <i>Films</i> , A_R	21
4.4.	Grado de Transmisión de Vapor de Agua, TVA	24
4.5.	Grado de Transmisión de Vapor de Agua Especifico, TVA ϵ	24
4.6.	Coefficiente de Variación	28

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

SÍMBOLO	DESCRIPCIÓN
[η]	Viscosidad Intrínseca
A%	Alargamiento Porcentual
Alg	Alginato
Alg14000	Alginato de Viscosidad 3.500 cP
Alg3500	Alginato de Viscosidad 14.000 cP
Atm	Atmósferas
CMC	Carboximetilcelulosa
cP	Centipoises
CPEQA	Complejo Polielectrolito Quitosano – Alginato
CV	Coefficiente de Variación
Da	Daltons
DHA	Dihidroxiacetona
ETC	Esfuerzo de Tracción en el Corte
F _{máx}	Fuerza Máxima de Desprendimiento
GD	Grado de N-Desacetilación
GlcN	$\beta(1\rightarrow4)$ -2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa, Glucosamina
GlcNAc	$\beta(1\rightarrow4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranososa, N-acetilglucosamina
HR	Humedad Relativa
N	Newton
n	Número de Muestras Ensayadas
PII	Índice de Irritación Primaria
PM	Peso Molecular
psi	Libra por Pulgada Cuadrada
Q _o	Quitosano
Q _o R	Quitosano RYMAR
Q _o R-LA	Quitosano RYMAR en ácido láctico
Q _o R-OH	Quitosano RYMAR tratado con Hidróxido de Sodio
Q _o S	Quitosano SIGMA
Q _o S-LA	Quitosano SIGMA en ácido láctico
Q _o S-OH	Quitosano SIGMA tratado con Hidróxido de Sodio
r ²	Coefficiente de Regresión
rpm	Revoluciones por Minuto
T _{des}	Trabajo de Desprendimiento
TVA	Grado de Transmisión de Vapor de Agua
TVA ϵ	Grado de Transmisión de Vapor de Agua Especifico
ϵ	Espesor

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue el de desarrollar *films* de Quitosano, Alginato y de Complejo Polielectrolito Quitosano – Alginato (CPEQA), evaluar sus propiedades físicas y mecánicas y seleccionar los *films* mas adecuados para su uso como apósitos en el tratamiento de quemaduras. Con este propósito, se preparan *films* de quitosano de camarón y de cangrejo, de alginato de diferentes pesos moleculares y CPEQA con los quitosanos de distintas fuentes y los alginatos de diferentes pesos moleculares. Se evaluó el efecto de la fuente de quitosano y del peso molecular del alginato en las propiedades de permeabilidad, mecánicas, bioadhesivas y biológicas de los *films* preparados.

Las propiedades mecánicas y bioadhesivas se estudiaron en un analizador de texturas de acuerdo con la Norma Chilena Oficial NCh1151.Of76 y la ASTM D 5458-95 respectivamente. El grado de transmisión de vapor de agua (TVA) fue analizado con el método de la copa húmeda propuesto por la Norma Chilena Oficial NCh2098.Of2000. Las evaluaciones biológicas de irritación primaria dérmica e intracutánea se hicieron de acuerdo con las especificaciones de la ASTM F 719-81 y USP 24, respectivamente.

Los *films* de quitosano de camarón mostraron menor resistencia mecánica, elasticidad y bioadhesión comparados con los de quitosano de cangrejo, pero tuvieron mayor permeabilidad y produjeron menor irritación.

Debido a que los estudios biológicos con los *films* de quitosano de ambas fuentes mostraron baja y mediana irritación, fueron neutralizados con una solución de NaOH para obtener *films* con pH cercanos a 5,7, parecidos a los de la piel humana. Los *films* de quitosano tratados con NaOH mostraron mayor resistencia y menor elasticidad comparado a los *films* de quitosano no tratados.

Los *films* de alginato también mostraron diferencias en sus propiedades: los de menor peso molecular fueron más elásticos que los de mayor peso molecular, pero mostraron menor resistencia y bioadhesión aunque la permeabilidad fue semejante, además de causar menor irritación dérmica e intracutánea. En comparación con los *films* de quitosano, tuvieron mayor resistencia y elasticidad, pero menor bioadhesión, permeabilidad y capacidad irritante.

Los *films* de CPEQA mostraron propiedades mecánicas pobres y propiedades bioadhesivas y de irritación intermedias entre los *films* de quitosano y alginato.

Los *films* de quitosano, alginato y de CPEQA presentaron propiedades fisicoquímicas y biológicas diferentes, sin embargo, todos presentaron una adecuada permeabilidad para ser utilizados como apósitos debido a que garantizan la mantención de un ambiente húmedo que promueve la curación de quemaduras.

SUMMARY

PREPARATION OF CHITOSAN – ALGINATE POLYELECTROLYTE COMPLEX FILMS AND COMPARISON OF ITS MECHANICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES WITH CHITOSAN FILMS

The aim of this work was to develop chitosan, alginate and polyelectrolyte complex (PEC) films of chitosan and alginate, to evaluate its physical and mechanical properties, and to select the more adequate films for later use as dressing for burns treatment. Thus, chitosan films from crab shells and shrimps sources were prepared, and PEC chitosan-alginate films with chitosan from different sources and alginate from different molecular weights were prepared. The effect of the chitosan source and the molecular weight of alginate in the permeability, mechanical, bioadhesives and biological properties of both types of films were evaluated.

The mechanical and bioadhesives properties were studied in the texture analyzer according to Official Chilean Norm NCh1151.Of76 and ASTM D 5458-95 respectively. The water vapor rate transmission (WVTR) was analyzed using the wet cup method according to the norm NCh2098.Of2000. Also, biological evaluations of primary skin irritation and intracutaneous test were developed according to the specifications of ASTM F 719-81 and USP 24, respectively.

Chitosan films from shrimps showed less mechanical resistant, elasticity, and bioadhesion compared with chitosan films from crab shells but they had more permeability and produced less irritation.

Since that biological studies with chitosan films from both sources showed low and moderate irritation index they were neutralized with NaOH to obtain films with pH close to 5.7 more suitable with human skin. The chitosan films treated with NaOH showed more mechanical resistant, less elastic and permeable compared with chitosan films not treated.

The low molecular weight alginate films showed more elasticity but less mechanical resistant and bioadhesion, similar permeability, and less skin and intracutaneous irritation compared with high molecular weight alginate films. Both alginate films showed

high mechanical resistant and elasticity, but less bioadhesion, permeability and irritation compared with chitosan films.

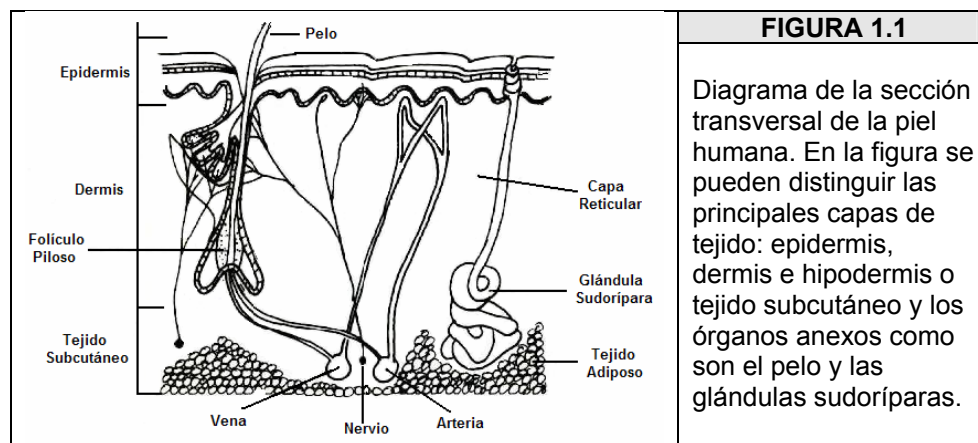
PEC chitosan-alginate films showed poor mechanical properties. They showed a bioadhesion property between chitosan and alginate films. The irritation index was also between chitosan and alginate films.

The chitosan, alginate and CPE chitosan – alginate showed different physicochemical and biological properties, however, all of them showed an adequate permeability for later use as dressing for burns treatment because they guarantee a humid ambient which promote the healing of burns.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Piel

La piel conforma la capa límite exterior entre el ser humano y el medio ambiente, actuando por una parte como barrera y por otra como enlace al mundo exterior. Cuando la superficie se encuentra intacta, la piel impide la pérdida de fluidos corporales, presenta una gran capacidad de resistencia y preserva a los órganos internos de agresiones que puedan ser causadas por factores externos, brinda protección frente a invasiones de microorganismos y puede resistir, hasta cierto punto, las influencias dañinas de productos químicos y de los rayos ultravioleta. Además, gracias al mecanismo de secreción y evaporación de agua (transpiración), realiza un importante aporte al mantenimiento de la temperatura corporal. Como órgano sensorial, la piel posibilita la percepción y localización de estímulos mecánicos, así como también la temperatura y el dolor, mediante la presencia de terminaciones nerviosas independientes y de receptores especiales por lo que transporta información de contenido muy valioso acerca de la realidad, sin la cual no podría tener lugar el proceso de desarrollo del ser humano [WALTERS, 2002].



Desde exterior hacia el interior se distinguen tres capas de tejidos que componen la piel (figura 1.1): la epidermis, la dermis y el tejido subcutáneo o hipodermis. También se consideran parte de la piel a aquellos órganos anexos a la misma como son el pelo, las uñas y las glándulas sudoríparas [FLOREZ, 2001].

1.2. Quemaduras

Las quemaduras representan un gran daño biológico y causan severas alteraciones metabólicas, son propensas a infecciones y dan lugar a severos síndromes de desacondicionamiento. Las secuelas pueden causar graves deformidades y limitaciones funcionales. Se entiende por quemaduras a un conjunto de fenómenos locales y sistémicos que resultan de la acción de altas temperaturas, electricidad o algunos agentes químicos. Se pueden producir en cualquier lugar del organismo, pero son mucho más frecuentes en la piel y aquí se clasifican en tipos o grados (tabla 1.1) de acuerdo con su profundidad [FERRADA, 1997].

TABLA 1.1. Clasificación de las Quemaduras y sus Características Importantes		
Tipo	Grado	Características
A	I	Comprometen solo a la epidermis. Se produce descamación y no se forma cicatriz ni hay cambios de pigmentación. Epiteliza en 7 a 10 días.
	II Superficial	Comprometen a la dermis de forma superficial. Cicatrizan en un plazo de 12 a 15 días sin dejar secuelas importantes.
AB	II Intermedio	Destruyen parte importante de la dermis. Cicatrizan en un plazo de 18 a 21 días y la cicatriz que se forma es de mala calidad con apariencia de queloide, hiper o hipopigmetada y con retracciones.
B	III	Destruye toda la dermis y por lo tanto no deja restos dérmicos o epidérmicos que permitan la epitelización. La cicatrización se produce por segunda intención, es decir, por aproximación de los bordes de la superficie cruenta.
	IV	Implican destrucción de músculo o estructuras óseas. Generalmente es el resultado de la energía por electricidad. Cicatrizan por segunda intención.

Las principales complicaciones derivadas de una quemadura son la pérdida de la función de barrera y de los mecanismos de defensa de la piel. Aunque la restauración de la continuidad de tejidos luego de un daño es un fenómeno natural, es un proceso complejo en el que las infecciones, la calidad y velocidad de la cicatrización, la pérdida de fluidos, el desbalance entre la síntesis y degradación de la matriz extracelular y otras complicaciones aumentan el periodo de curación [MIDDLEKOOP ET AL., 2003].

1.3. Curación de Quemaduras y Apósitos

Curación se puede definir como aquella técnica que favorece la cicatrización de los tejidos. En general, existen dos grandes formas de realizar una curación: la tradicional y la avanzada. La curación tradicional se realiza en un ambiente seco, utiliza apósitos pasivos y medicamentos tópicos. Por otro lado, la curación avanzada se realiza en un

ambiente húmedo similar al fisiológico, utiliza apósitos activos y en lo posible no usa medicamentos tópicos [ANDRADES ET AL., 2004]. En la tabla 1.2 se presenta una clasificación de apósitos basada en la naturaleza de la acción que ejercen sobre la herida [PAUL & SHARMA, 2004]. En noviembre de 1999, la FDA reclasificó los apósitos y su descripción se encuentra en el anexo 8.1.

TABLA 1.2. Clasificación de Apósitos		
Tipos de Apósitos	Descripción	Ejemplos
Pasivos	No permiten el intercambio con el medio ambiente. Protegen, aíslan y rellenan.	Gasas; Tull ó Mallas de Contacto
Interactivos	<i>Films</i> poliméricos permeables al vapor de agua y al oxígeno pero impermeables a las bacterias.	Espumas Hidrofilicas; Espuma de Poliuretano; Nylon
Bioactivos	Promueven la curación de heridas porque liberan productos bioactivos o el mismo apósito es una de tales sustancias.	Proteoglicanos; Colágeno; Alginatos; Quitosano

El ambiente húmedo intenta otorgar a la herida un medio natural para que los procesos de reparación tisular se realicen sin mayores alteraciones; previene la desecación y mantiene una temperatura y humedad adecuadas que favorecen la síntesis de colágeno, la migración y comunicación celular y promueve la angiogénesis ya que mantiene un pH levemente ácido (5,5 - 6,6) y una baja tensión de oxígeno en la superficie de la herida. Todos estos elementos se traducen en efectos clínicos como menor dolor, aislamiento térmico, desbridamiento autolítico, mayor velocidad de cicatrización y mejor calidad de la cicatriz [STASHAK ET AL., 2004].

Los apósitos son materiales destinados a aplicarse sobre heridas para proteger y ayudar a la curación y constituyen el medio ideal para controlar el ambiente de las heridas, sin embargo, existe una gran variedad disponible en el mercado pero ninguno es ideal para todos los casos debido a lo dinámico de los procesos biológicos involucrados en la regeneración tisular. Aunque la mayoría entrega condiciones óptimas para la reepitelización y posterior curación, es muy variable la tasa a la que ésta ocurre, la calidad del epitelio formado y la simplicidad del manejo del apósito. En la tabla 1.3 se describen los requisitos que debería cumplir un apósito ideal [LLOYD ET AL., 1998]. Por ejemplo, para las quemaduras que generalmente están caracterizadas como de epitelización limpia y con exudados medios a altos se requieren apósitos con

permeabilidades que permitan absorber o evaporarlo pero que mantengan un ambiente húmedo alrededor de la herida y libre de contaminación microbiana [LOKE ET AL., 2000].

TABLA 1.3. Requisitos Generales de un Apósito Ideal	
Requisito	Descripción
Permeabilidad	Debe mantener una alta humedad en la interfase del apósito, mientras remueve por adsorción el exceso de exudados y los compuestos tóxicos asociados. Además debe permitir el intercambio de gases manteniendo una capa impermeable a los microorganismos.
Biocompatibilidad	No debe ser tóxico, antigénico o alergénico.
Bioadhesión	Debe ser fácil de aplicar y remover sin provocar traumas durante los cambios de apósito y adherirse rápida y uniformemente a la herida para prevenir la formación de bolsillos de aire o fluidos lo que reduce el dolor, facilita la descontaminación, previene la creación de canales por los que puedan entrar microorganismos y promueve la unión de tejidos.
Mecánicas	Debe ser resistente, durable, flexible, plegable y elástico, aun cuando esté húmedo. Además debe tener propiedades de tensión razonables para que pueda soportar las fuerzas producidas por diferentes partes del cuerpo y sus variados contornos.
Esterilidad	Debe poder ser producido en forma estéril.
Otras	Es deseable que el apósito tenga un bajo costo monetario, fácil disponibilidad y almacenamiento, larga vida útil y que sea fácil de desechar una vez removido. Otras ventajas son que sea hemostático, transparente (para evidenciar la presencia de infección), biodegradable y que restaure la funcionalidad normal de la piel.

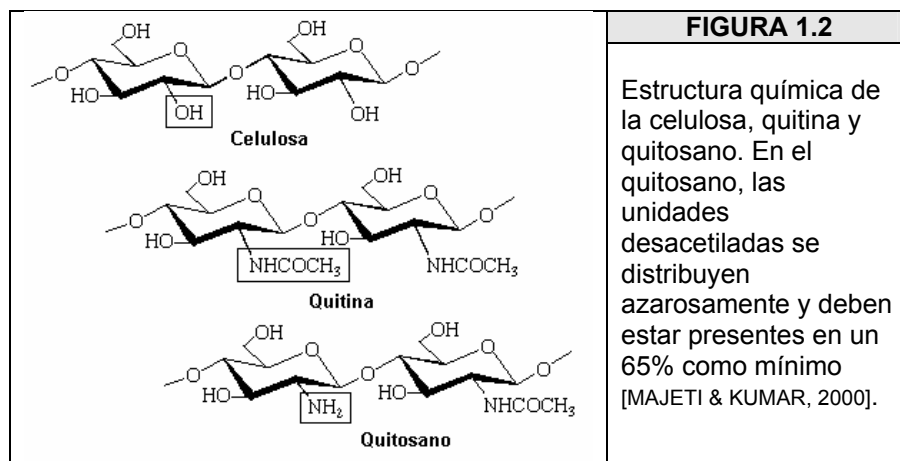
1.4. Quitosano

Biomaterial se define como *‘una sustancia o combinación de estas, de origen natural o sintético y distintas a fármacos, que pueden ser usadas por cualquier período de tiempo, como un todo o parte de un sistema que trata, aumenta o reemplaza a cualquier tejido, órgano o función del cuerpo’* [NIH, EE.UU.]. Los polímeros son los materiales más utilizados en aplicaciones biomédicas como la ingeniería de tejidos, el diseño de implantes quirúrgicos y órganos artificiales, prótesis, sistemas de liberación de fármacos, terapia génica, etc. Los polisacáridos representan una clase importante de biomateriales naturales, en los que se incluyen el almidón, celulosa, agarosa, alginato, dextrano y quitina [DHANIKULA ET AL., 2004].

La quitina es el polímero natural más abundante luego de la celulosa, con la que guarda similitudes estructurales y como ella, funciona naturalmente como un polisacárido estructural, encontrándose en los exoesqueletos de crustáceos como cangrejos y camarones y en menor cantidad en la pared celular de hongos, bacterias,

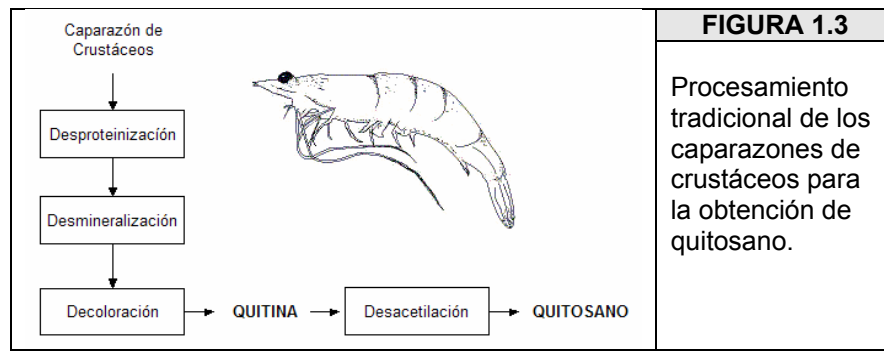
levaduras y en las cutículas de insectos. Es un homopolímero lineal compuesto por cadenas formadas por unidades de *2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranososa* (GlcNAc, *N-acetilglucosamina*) unidas por enlaces glicosídicos $\beta(1\rightarrow4)$. Es un polisacárido blanco, duro, inelástico y nitrogenado y constituye la mayor fuente de contaminación en las zonas costeras [MAJETI & KUMAR, 2000].

El quitosano (Q_0) es el derivado N-desacetilado de la quitina, con un grado de desacetilación no menor al 65% [MAJETI & KUMAR, 2000]. La definición de la ASTM F2103-01 define al Q_0 como “un polisacárido lineal constituido por unidades de GlcNAc y de 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa (GlcN, Glucosamina) unidas por enlaces glicosídicos $\beta(1\rightarrow4)$ ”. Cabe destacar que las unidades de GlcNAc y la GlcN se distribuyen azarosamente a lo largo de la cadena polimérica, por lo que el Q_0 es un polímero al azar. La figura 1.2 muestra la estructura de la quitina, el Q_0 y la celulosa.



El Q_0 puede ser obtenido fácilmente a partir de la quitina (figura 1.3). El procesamiento tradicional de los caparazones de crustáceos involucra la remoción de proteínas con hidróxido de sodio diluído y la disolución del carbonato de calcio presente en altas concentraciones con ácido clorhídrico. La quitina es luego decolorada exponiéndola al sol ó bien con permanganato de potasio y ácido oxálico. Finalmente, el producto es desacetilado con hidróxido de sodio concentrado y a altas temperaturas para obtener el Q_0 . Este tratamiento produce Q_0 con un grado de desacetilación cercano al 70% [MAJETI & KUMAR, 2000].

El peso molecular del Q_0 varía entre 1×10^5 a $2,5 \times 10^6$ Da y es básico, con un pK_a aproximado de 6,3 [MAJETI & KUMAR, 2000]. Es insoluble en agua, en ácidos concentrados, bases y los solventes orgánicos comunes, pero es soluble en ácidos minerales y orgánicos diluidos. La solubilización del Q_0 se produce vía protonación de su grupo amino libre en ambientes ácidos y permanece en solución hasta un pH cercano a 6,2 después del cual comienza a formar precipitados similares a geles hidratados [CHENITE ET AL., 2000].



El Q_0 es un copolímero catiónico no ramificado que puede ser modificado químicamente con el fin de alterar sus propiedades físicas y químicas. Es posible la modificación química del grupo amino y de los hidroxilos primario y secundario. Derivatizaciones posibles incluyen su entrecruzamiento, eterificación, esterificación y copolimerización [LLOYD ET AL., 1998] y debido a esta versatilidad ha encontrado muchas aplicaciones tecnológicas y biomédicas, las que incluyen la ingeniería de tejidos y esto debido a su biocompatibilidad, baja toxicidad, biodegradación y bioactividad [MAJETI & KUMAR, 2000]. Más aún, el Q_0 es un material abundante, renovable y su producción es de bajo costo y de interés ecológico [BERGER ET AL., 2004].

Aunque la estructura primaria del Q_0 es una cadena de residuos de GlcN acetilados al azar, el término Q_0 es en realidad una denominación general para quitinas desacetiladas que difieren en el peso molecular y en el grado y sitios de desacetilación. Los métodos de producción y el origen son los principales responsables de estas diferencias y por tanto, la caracterización física y química del Q_0 es fundamental debido a que estos parámetros están relacionados con la funcionalidad [CHATELET ET AL., 2001].

1.5. Propiedades del Quitosano como Apósito

El Q₀ posee varias características que lo hacen un material idóneo para la formación de apósitos útiles en el tratamiento de las quemaduras, las que se revisarán brevemente en las siguientes secciones.

1.5.1. Formación de *Films*:

El Q₀ puede ser solubilizado en soluciones diluidas de ácidos minerales como el clorhídrico o ácidos orgánicos como el acético, láctico y cítrico. Una vez disueltos, los *films* de Q₀ se forman simplemente mediante la evaporación del solvente. Esta capacidad se debe a la formación de puentes de hidrógeno intra e intermoleculares en las cadenas de Q₀ [RITTHIDEJ ET AL., 2002]. Sin embargo, las características y calidad de los *films* resultantes varían de acuerdo a la fuente de Q₀ empleada, el solvente utilizado, la metodología de preparación de los *films* y tipo y cantidad, si existiera, de copolímeros y plastificantes utilizados [CERVERA ET AL., 2003]. Para que un *film* pueda ser utilizado como apósito, debe ser durable, resistente, flexible, plegable y elástico y debe servir como barrera mecánica para proteger a la herida, por lo que es imprescindible caracterizar sus propiedades mecánicas [KHAN ET AL., 2000].

1.5.2. Propiedades Bioadhesivas:

El término bioadhesión describe la capacidad de ciertas macromoléculas, sintéticas o biológicas, de adherirse a los tejidos del organismo mediante interrelaciones entre algunas agrupaciones químicas concretas de los polímeros y los tejidos biológicos ó interpenetración de cadenas [RODRÍGUEZ ET AL., 2000]. Idealmente, los apósitos deberían tener fuerzas de bioadhesión razonables que le permitan adherirse a la herida pero sin causar daños al epitelio recién formado sobre la herida y al tejido circundante cuando se produzcan los cambios de apósitos [DYKES ET AL., 2003]. Muchas de las propiedades del Q₀ dependen de su naturaleza catiónica. A pH ácido, es un polielectrolito lineal con gran densidad de carga (una carga positiva por cada residuo de GlcN), por lo que interactúa con moléculas cargadas negativamente, incluidas proteínas, polisacáridos aniónicos y ácidos nucleicos, muchos presentes en la superficie de la piel, confiriendo propiedades de bioadhesión [LLOYD ET AL., 1998].

1.5.3. Regeneración de Tejidos:

Se ha demostrado que el Q_o promueve la curación de las heridas y reduce la formación de cicatrices debido a que incrementa la acción de queratinocitos, leucocitos polimorfonucleares, neutrófilos, fibroblastos y macrófagos [MORI ET AL., 2005] y promueve la síntesis de colágeno [KOJIMA ET AL., 2004]. Como resultado, el Q_o promueve la formación de tejido de granulación con angiogénesis y la organización, por lo que es beneficioso para la curación de heridas [UENO ET AL., 2001].

1.5.4. Propiedades Hemostáticas:

Estudios realizados en cerdos indican que los apósitos fabricados de Q_o reducen la cantidad de sangre perdida mejorando la hemostasia [PUSATERI ET AL., 2003]. Esta propiedad del Q_o es independiente de las cascadas de coagulación normales y se debe a su interacción con las membranas celulares de eritrocitos, lo que lo convierte en un adhesivo biológico [ISHIHARA, 2002].

1.5.5. Propiedades Antimicrobianas:

El Q_o inhibe el crecimiento de una gran variedad de hongos, levaduras y bacterias. En soluciones diluidas de ácidos las cargas positivas del Q_o interactúan con los residuos cargados negativamente de las macromoléculas de la superficie celular de los microorganismos presumiblemente en competencia con el Ca²⁺ por los sitios electronegativos de la membrana, pero sin conferir estabilidad dimensional, lo que compromete la integridad de la membrana produciendo entonces su debilitamiento [BEGIN & VAN CALSTEREN, 1999]. La tabla 1.4 describe las actividades antimicrobianas del Q_o relacionadas con aquellos microorganismos que generalmente causan infecciones en quemaduras.

Esta propiedad es de especial importancia porque se ha demostrado que los agentes antimicrobianos que son incorporados a los apósitos generalmente producen citotoxicidad, retrasando el proceso de curación o que generan resistencia en los patógenos. En el caso del Q_o como los efectos antimicrobianos provienen directamente del apósito, se minimiza la necesidad de aplicar sustancias antibacterianas o de efectuar cambios de apósitos para aplicarlas [LOKE ET AL., 2000].

TABLA 1.4. Actividad antimicrobiana del Quitosano con respecto a microorganismos que comúnmente infectan quemaduras
 [MUZARELLI ET AL., 1990; BOWLER ET AL., 2001, MORIMOTO ET AL., 2002]

Microorganismos Sensibles	Microorganismos No Sensibles o Sin Referencias en la Literatura
<i>Candida albicans</i> ; <i>Enterobacter cloacae</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>Escherichia coli</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> ; <i>Aeromonas hydrophila</i> ; <i>Aspergillus spp</i> ; <i>Bacteroides spp.</i> ; <i>Mucor spp.</i> ; <i>Peptostreptococcus spp.</i>

1.5.6. Biocompatibilidad:

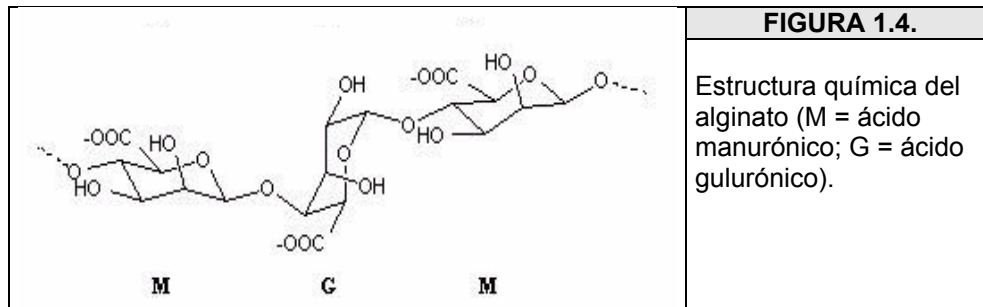
Los biomateriales deben ser biocompatibles, es decir, que su contacto con el cuerpo no produzcan reacciones adversas, por lo que deben ser capaces de reconocer y cooperar en armonía con las estructuras y células del organismo sin producir interacciones no-específicas [JAGUR-GRODZINSKI, 1999]. Las pruebas clínicas realizadas hasta ahora no han reportado reacciones inflamatorias o alérgicas luego de la implantación, inyección, aplicación tópica o ingestión de Q₀ en el cuerpo humano [CHATELET ET AL., 2001]. Estas propiedades se deberían a que el Q₀ está compuesto de unidades de GlcN y GlcNAc, las que son constituyentes naturales de los tejidos de mamíferos [KHAN ET AL., 2000].

1.5.7. Biodegradación:

Es deseable que los biopolímeros sean biodegradables, es decir, que puedan ser degradados en el cuerpo y que no generen productos dañinos como resultado de su degradación [JAGUR-GRODZINSKI, 1999]. Varios estudios han demostrado que la quitina y el Q₀ son polímeros que se biodegradan *in vivo* debido a su susceptibilidad a la hidrólisis enzimática de los enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ mediada por lisosima, enzima omnipresente en el organismo humano. Sus productos de degradación son oligosacáridos o monosacáridos, metabolitos naturales que son luego absorbidos y pueden ser incorporados a las rutas metabólicas de glicosaminoglicanos o glicoaminoproteínas, o bien, excretados [CHATELET ET AL., 2001]. Sin embargo, la biodegradación del Q₀ es dependiente de factores tales como su origen, método de preparación y grado de desacetilación [KRISTIANSEN ET AL., 1998]. La cinética de degradación del Q₀ es más bien lenta [DHANIKULA ET AL., 2004], lo que resulta beneficioso porque se reduciría la frecuencia de cambio de apósitos.

1.6. Alginato

El termino alginato (Alg) se refiere a una familia de copolímeros en bloque, aniónicos y lineales derivados del ácido algínico encontrado en las algas pardas y está constituido de unidades de los ácidos β -D-manurónico y α -L-gulurónico unidos por enlaces 1,4 (figura 1.4). La proporción que existe entre los grupos de ácido gulurónico y los de manurónico contribuye a generar variadas características en lo que se refiere a estructura y biocompatibilidad. Este polisacárido hidrofílico tiene un alto peso molecular (90.000 – 290.000 Da), es soluble en soluciones acuosas y es estable entre los pH 4 – 10 [BECKER ET AL., 2001].



El Alg de sodio puede ser entrecruzado con cationes divalentes (Ca^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} , etc.) o trivalentes (Al^{3+} , etc.). Estos complejos son de dos o tres dimensiones respectivamente [WANG ET AL., 2003]. La reactividad con calcio y el resultante gel Alg – Ca^{2+} , insoluble en medio ácido pero soluble en medio alcalino, es función directa del largo de la cadena del ácido gulurónico. Es así como Alg con altos porcentajes de este ácido muestran mayor habilidad para la formación de geles. La proporción de ácido manurónico y gulurónico y su distribución en la cadena depende de la fuente de alga usada [PILLAY & FASSIHI, 1999].

1.7. Propiedades del Alginato como Apósito

El Alg posee varias características que lo hacen un material idóneo para la formación de apósitos útiles en el tratamiento de las quemaduras, las que se describirán brevemente en las siguientes secciones.

1.7.1. Regeneración de Tejidos:

La curación de heridas cutáneas requiere del desarrollo de tejido granular vascularizado, rellenar las porciones de tejido faltantes y la restauración de la capa de queratinocitos. El Alg de calcio aumenta la proliferación de fibroblastos pero disminuye la de las células endoteliales microvasculares y de los queratinocitos, resultados que sugieren que el Alg puede mejorar algunos aspectos celulares del proceso natural de curación y otros no [DOYLE ET AL., 1996]. Por otra parte, el tejido de granulación de la herida contiene un gran número de macrófagos y se ha demostrado que el Alg proveniente de apósitos activa su función [THOMAS ET AL., 2000].

1.7.2. Biodegradación:

Las fibras de Alg que quedan atrapadas en las heridas son prontamente biodegradadas por mecanismos hidrolíticos que involucran a enzimas como la lisosima, que degrada los enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ del Alg [GILCHRIST & MARTIN, 1983].

1.7.3. Bioadhesión:

Debido a que el Alg es un material hidrofílico puede absorber 20 a 30 veces su peso en exudados y sangre, con valores cercanos a 22 gg^{-1} [Lloyd et al., 1998]. Este proceso convierte al material seco inicial en un gel hidrofílico sobre la herida que puede ser removido fácilmente [STASHAK ET AL., 2004]. Además, los apósitos de Alg pueden ser retirados de la herida con suero salino, por lo que la remoción no interfiere con el tejido de granulación, lo que hace sus cambios prácticamente indoloros [MOTTA, 1989].

1.7.4. Biocompatibilidad:

El Alg exhibe baja toxicidad, irritabilidad e inmunogenicidad [GOMBOTZ ET AL., 1998]. Hasta la fecha, sólo existe un estudio publicado que describe una reacción adversa debido al uso de apósitos de Alg de calcio en humanos, en el que se describe una reacción de las células gigantes siete meses después del uso de Alg para obtener hemostasia, lo que sugiere que las fibras de Alg dejadas sobre las heridas podrían provocar reacciones adversas a largo plazo [ODELL ET AL., 1994].

1.7.5. Propiedades Hemostáticas:

En los apósitos de Alg de calcio, el calcio es liberado del apósito y promueve la activación de la protrombina en la cascada de coagulación. Pareciera que la disponibilidad de calcio y la matriz fibrosa del Alg contribuyen a la coagulación sanguínea [STASHAK ET AL., 2004]. Se ha demostrado que el Alg de zinc potencia aun más la coagulación protrombótica y la activación de plaquetas [SEGAL ET AL., 1998].

1.8. Complejo Polielectrolito Quitosano – Alginato (CPEQA)

En el campo de los polímeros, los complejos polielectrolitos (CPE) son de gran relevancia puesto que ofrecen la posibilidad de combinar las propiedades fisicoquímicas de al menos dos polielectrolitos. La formación de los CPE esta determinada por las interacciones electrostáticas entre polielectrolitos de distintas cargas lo que lleva a formar condensaciones iónicas interpoliméricas y a la concomitante liberación de los contraiones. También pueden presentarse otras interacciones en la formación de los CPE, como puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, fuerzas de *Van der Waals*, etc. [SCHATZ ET AL., 2004].

El Complejo Polielectrolito Quitosano – Alginato (CPEQA) presenta ventajas sobre sus constituyentes individuales cuando se aplica como membrana de recubrimiento y sistema de liberación controlada de droga. Es más estable a los cambios de pH y se ha probado que es más efectivo en limitar la liberación de material en comparación con cualquiera de los polímeros solos. El CPEQA presenta un potencial uso como material de apósito en el tratamiento de quemaduras [WANG ET AL., 2001]. La literatura indica que es razonable estudiar la preparación de *films* de CPEQA debido a que tanto Q₀ como Alg por sí solos tienen excelentes propiedades como apósito junto con la ventaja que presenta el CPEQA de ser más estable al pH y permitir una liberación más controlada de droga lo cual puede ser beneficioso pensando en la incorporación de medicamentos en el apósito. Además, como el Alg no tiene un potencial adhesivo suficiente, la adición de Q₀ potenciaría la unión a los tejidos [KUMAR ET AL., 2005].

Un estudio realizado por Yan et al. (2001) demostró que los CPEQA exhiben buena biocompatibilidad *in vitro* con fibroblastos de humanos, sugiriendo buenas expectativas para aplicaciones biomédicas. Un estudio posterior demostró que los *films* de CPEQA, comparados con la gasa tradicional, producen un aumento de la velocidad de curación

de heridas en ratones. Ambos hallazgos hacen de este complejo un candidato idóneo para la fabricación de apósitos para el tratamiento de quemaduras [WANG ET AL., 2002].

1.9. Contexto e Implicaciones del Desarrollo de esta Memoria de Título

De acuerdo con estadísticas entregadas por el Ministerio de Salud, en Chile cada año se ven afectadas cerca de 250.000 personas por quemaduras que requieren algún grado de atención médica (Anexo 8.2) y los costos del tratamiento fluctúan entre 100 mil y 4 millones de pesos anuales dependiendo de la gravedad de las secuelas [COANIQUEM, 2005]. Las lesiones por quemaduras constituyen la variedad de trauma que deja en el paciente las más graves y permanentes secuelas que deterioran los mecanismos de defensa del individuo. Es por ello que el tratamiento de las quemaduras debe procurar una rápida regeneración de la piel. El uso de apósitos que funcionen como piel sintética tanto en sus propiedades de cubrir y proteger las capas más profundas de la piel, como de estimular el proceso de regeneración celular implica un elevado costo en los servicios de salud, es por ellos que el uso de este tipo de materiales es más bien escaso.

En Chile existen las condiciones para producir este tipo de apósitos en base a Q_0 y Alg debido a que posee amplias costas que hacen posible la extracción de crustáceos y algas en grandes volúmenes (anexos 8.3 y 8.4). Los caparazones de crustáceos hasta ahora son considerados material de desecho y son una fuente importante de contaminación costera. Así, el estudio y desarrollo de *films* de Q_0 , Alg y CPEQA es un aporte a este importante problema de salud pública.

En este proyecto planteamos mejorar los procedimientos de preparación y obtención de *films* de CPEQA. Para los *films* de Q_0 , Alg y de CPEQA se desarrollarán ensayos para evaluar la permeabilidad al vapor de agua, la resistencia mecánica, la bioadhesión y ensayos biológicos que midan la irritación cutánea e intracutánea y de regeneración del estrato córneo.

Para comparar las propiedades de los materiales ensayados en este trabajo fueron seleccionados los apósitos Tegaderm® [3M HEALTH CARE, EE.UU]. Tegaderm® es un apósito transparente estéril constituido por una película de poliuretano semipermeable, cubierta por un adhesivo hipoalergénico de acrilato y son frecuentemente utilizados en el tratamiento de quemaduras y heridas en general.

2. HIPÓTESIS

Los *films* de CPEQA presentarían un comportamiento diferente en relación con los *films* de Quitosano y Alginato en sus propiedades de permeabilidad, mecánicas y bioadhesivas.

Si bien el Q_o y el Alg tienen una microestructura fibrosa similar, el complejo formado por la interacción electrostática entre el residuo de glucosamina del Q_o y el grupo carboxilato del Alg produciría una estructura más compacta que debiera modificar la permeabilidad al vapor de agua y las propiedades mecánicas en relación con el Q_o y Alg sólo. Dado que el comportamiento de bioadhesión está controlado principalmente por la interacción electrostática entre grupos cargados del polímero y las cargas aniónicas presentes en la piel, el comportamiento de bioadhesión de los *films* sería diferente para el CPEQA, Q_o y Alg.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Desarrollar *films* de Q_o, Alg y CPEQA, evaluar sus características mecánicas, bioadhesivas, de permeabilidad y biológicas y seleccionar los más adecuados para su posterior aplicación como apósitos útiles en el tratamiento de quemaduras.

3.2. Objetivos Específicos

Preparar *films* de complejo CPEQA mediante coagulación líquida usando Q_o proveniente de cangrejo (SIGMA) y camarón (RYMAR) y Alg (SIGMA) de diferentes pesos moleculares con adecuada resistencia mecánica.

Evaluar el efecto de la fuente de Q_o (camarón o cangrejo) en las propiedades mecánicas, bioadhesivas, de permeabilidad y biológicas de los *films* de Q_o.

Evaluar el efecto del peso molecular de Alg en las propiedades mecánicas, bioadhesivas, de permeabilidad y biológicas de los *films* de Alg.

Evaluar el efecto del peso molecular del Alg y de la fuente de Q_o en las propiedades de permeabilidad, mecánicas, bioadhesivas y biológicas de los *films* de CPEQA

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Quitosanos

El Quitosano Rymar (Q_oR) fue obtenido de la industria chilena Rymar Ltda. ubicada en la ciudad de Coquimbo. De acuerdo con los datos informados por el fabricante, este Q_o es obtenido a partir de cuerpo de camarón. Sus características fisicoquímicas se determinaron en el laboratorio de Operaciones Unitarias. Se determinó que el Q_oR tiene un grado de desacetilación del 84,2%, un peso molecular viscosimétrico de $3,45 \times 10^5$ Da estimado a partir de la viscosidad intrínseca $[\eta]$ según el método descrito por Rinaudo et al. (1993) usando como solvente una solución de acetato de sodio 0,2 M y ácido acético 0,3 M. En este solvente el valor de $[\eta]$ fue de 1.230 mL/g (tabla 4.1).

Q _o	Peso Molecular Viscosimétrico	Grado de Desacetilación	Viscosidad Intrínseca $[\eta]$	Fuente
Q _o R	$3,45 \times 10^5$ Da	84,2 %	1.230 mL/g	<i>Camarón</i>
Q _o S	$4,08 \times 10^5$ Da	> 85 %	1.395 mL/g	<i>Cangrejo</i>

El Quitosano Sigma (Q_oS) de grado práctico fue obtenido de la compañía estadounidense Sigma – Aldrich Inc. De acuerdo con los datos informados por el fabricante, este Q_o es obtenido de caparazones de cangrejo y tiene un grado de desacetilación mínimo de 85%. El peso molecular viscosimétrico fue determinado en el laboratorio de Operaciones Unitarias y tuvo un valor de $4,08 \times 10^5$ Da estimado a partir de la determinación de $[\eta]$ según el método descrito por Rinaudo et al. (1993) usando como solvente una solución de acetato de sodio 0,2 M y ácido acético 0,3 M. En este solvente, el valor de $[\eta]$ fue de 1.395 mL/g (tabla 4.1).

4.1.2. Alginatos

Los alginatos (Alg) fueron obtenidos de la compañía estadounidense Sigma-Aldrich Inc. Según los datos entregados por el fabricante el Alg se obtiene de la alga parda *Macrocystis pyrifera*. Para la formación de *films* de Alg y de CPEQA se ensayaron 2 tipos de Alg: uno de viscosidad media, Alg3500 (3.500 cP, solución al 2%) y otro de viscosidad alta, Alg14000 (14.000 cP, solución al 2%).

4.1.3. Otros

- Ácido láctico 85% [W&Z AC-0100, EE.UU.].
- Acetona [MERCK, ALEMANIA].
- Apósitos Tegaderm® Estándar [3M HEALTH CARE, EE.UU.].
- Cloruro de calcio anhidro [MERCK, ALEMANIA].
- Etanol desnaturalizado 95° [MONTERO, CHILE].
- Gentamicina 0,3% [LABORATORIO CHILE, CHILE].
- Hidróxido de sodio en lentejas [MERCK, ALEMANIA].
- Suero fisiológico isotónico (NaCl 0,9%) [LABORATORIOS SANDERSON S.A. CHILE].

4.2. Preparación de las Soluciones de Quitosano

El Q_o que se obtuvo en forma de escamas se pulverizó en un molino de cuchillas [ANALYSENMUCHLE, MODELO A-10, ALEMANIA] con cámara refrigerada [COLE PARMER, MODELO 1268-14, EE.UU.] a -10°C y luego se hizo pasar por un tamiz malla #100, luz de malla de $150\ \mu\text{m}$ [ASTM E-11]. Se prepararon soluciones de Q_o al 1% p/v en solución de ácido láctico al 1% p/v, disolviendo el Q_o con agitación constante [AGITADOR MAGNÉTICO IKA-COMBIMAG, MODELO RCH, ALEMANIA] durante 3 horas. Las soluciones se dejaron a temperatura ambiente durante la noche y luego se microfiltraron en un filtro a una presión de 70 psi o 4,8 atm [SARTORIUS, MODELO SM16249, ALEMANIA], a través de un prefiltro/filtro absoluto de microfibras de borosilicato [MFS, GRADO GC5, EE.UU.] / nitrato de celulosa de tamaño de poro de $0,45\ \mu\text{m}$ [SARTORIUS, CAT 11406, ALEMANIA]. Se determinó pH [pHMETRO ORION, MODELO 420A, EE.UU.] y la turbidez de las soluciones filtradas [TURBIDÍMETRO HANNA INSTRUMENTS, MODELO HI 93703, EE.UU.]. Las soluciones se dejaron en reposo en un refrigerador a 4°C durante al menos 24 horas antes de ser utilizadas con el fin de eliminar las burbujas.

4.3. Preparación de los *Films* de Quitosano

Se agregaron exactamente 25 mL de solución filtrada de Q_o sobre placas de acero inoxidable con medidas de $10 \times 10 \times 0,3\ \text{cm}^3$ que luego fueron dejadas en una estufa [WTB BINDER, MODELO TF, ALEMANIA] a 40°C durante 16 horas hasta evaporar el agua, obteniéndose los *films* de Q_oR en ácido láctico ($Q_oR\text{-LA}$) y de Q_oS en ácido láctico ($Q_oS\text{-LA}$) los que fueron cuidadosamente extraídos de las placas.

4.4. Neutralización de los *Films* de Quitosano

Los *films* de Q_oR-LA y Q_oS-LA fueron sumergidos en un recipiente de vidrio Pirex[®] con medidas de 20x20x5 cm³, durante 5 minutos en 100 mL de una solución de hidróxido de sodio 0,1 M y luego lavados 2 veces y durante 10 minutos cada vez con 100 mL de una solución de agua – etanol (60:40) para eliminar el exceso de álcali. Los *films* fueron cuidadosamente estirados y puestos entre papeles filtro [WHATMAN 50, INGLATERRA] y se les dejó secar durante 24 horas en una sala con humedad y temperatura controladas (50% HR; 23°C), obteniéndose *films* de Q_oR tratados con NaOH (Q_oR-OH) y de Q_oS tratados con NaOH (Q_oS-OH).

4.5. Preparación de las Soluciones de Alginato

Se prepararon soluciones de Alg3500 y Alg14000 al 1% p/v en agua destilada, disolviendo el Alg con agitación constante [AGITADOR MAGNÉTICO IKA-COMBIMAG, MODELO RCH, ALEMANIA] durante 1 hora y a temperatura ambiente. La formación de los *films* se hizo de acuerdo con lo descrito en el punto 4.3.

4.6. Preparación de las Soluciones de CPEQA

Para la preparación de los *films* de CPEQA se ensayó el método descrito por Wang et al. (2001) con ciertas modificaciones. Se agregaron 400 mL de solución de Q_o filtrada (0,25 % p/v en una mezcla de 400 mL de ácido láctico 1% y 400 mL de acetona) a 400 mL de solución de Alg (0,25% p/v en agua). Se dejó reaccionar por 1 hora con agitación constante [AGITADOR MAGNÉTICO IKA-COMBIMAG, MODELO RCH, ALEMANIA]. Luego se aisló el complejo mediante centrifugación por 30 min a 3000 rpm. El complejo se lavó cinco veces con agua destilada, se resuspendió en 20 mL de agua destilada y se agitó por 1 hora con 16 mL de una solución de CaCl₂ al 2% p/v en agua destilada. Los CPEQA se colocan en las placas de acero inoxidable de 10x10x0,3 cm³ y se dejaron secar durante 3 días en una sala con humedad y temperatura controladas (50% HR; 23°C), obteniéndose los *films* de CPEQA de Q_oS-Alg3500 y de Q_oR-Alg3500, los que fueron cuidadosamente extraídos de las placas. La filtración de los complejos de Q_oS-Alg14000 y de Q_oR-Alg14000 fue difícil debido a su alta viscosidad, por lo que no se pudieron fabricar *films* a partir de ellas.

4.7. Preparación de las Muestras de Ensayo

Se determinó el pH de los *films* de Q_o, Alg y CPEQA. Con este propósito, los *films* fueron cortados en trozos de 2,5 x 2,5 cm² y colocados por separado en 100 mL de agua destilada e incubados durante 24 horas a 40°C [ESTUFA WTB BINDER, MODELO TF, ALEMANIA]. Se midió el pH de la solución que estuvo en contacto con los *films* a 23°C [pHMETRO ORION, MODELO 420A, EE.UU.].

Para los ensayos, los *films* fueron cortados con un bisturí de acuerdo con las dimensiones necesarias para cada uno de éstos (tabla 4.2) cuidando que sus bordes quedaran uniformes. Se midió el espesor en distintos puntos de los *films* que serían utilizados en los ensayos en distintos puntos con un micrómetro digital [N°E5010109, VETO Y CIA., CHILE] de acuerdo con las medidas de cada uno y se calculó el espesor promedio. Aquellos *films* que presentaron imperfecciones físicas como burbujas o rasgaduras, analizadas con un microscopio [ZEISS, MODELO STANDARD 20, AMPLIACIÓN DE 40X, ALEMANIA], o que su espesor promedio tuviera un coeficiente de variación mayor al 5% con respecto al promedio fueron descartados y reemplazados.

TABLA 4.2. Descripción de los *Films* Acondicionados para los Ensayos

Ensayos	Forma de los <i>films</i>	Medidas de los <i>films</i>	Puntos de medición del espesor
Mecánicos	Rectangular	1 cm x 5 cm	3
Bioadhesión	Rectangular	1 cm x 4 cm	3
Permeabilidad	Circular	8 cm de diámetro	5
Irritación Primaria	Cuadrangular	0,5 cm x 0,5 cm	1

Los *films* se almacenaron en una sala a $23 \pm 0,6^{\circ}\text{C}$ y $50 \pm 2\%$ HR [ACONDICIONADOR DE AIRE YORK, MODELO MCH12PM, EE.UU.; DESHUMIDIFICADOR HUMIDEX, MODELO 4, EE.UU.]. Todos los *films* fueron acondicionados a esta temperatura y HR durante al menos 1 semana antes de ser utilizados.

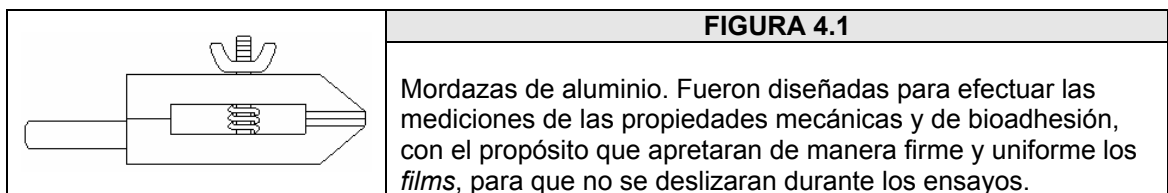
4.8. Caracterización de la Microestructura de los *Films*

La microestructura superficial y transversal de los *films* fueron caracterizadas mediante microscopía electrónica de barrido [MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO JEOL, MODELO JSM-25-SII, JAPÓN] con un aumento de 7000x.

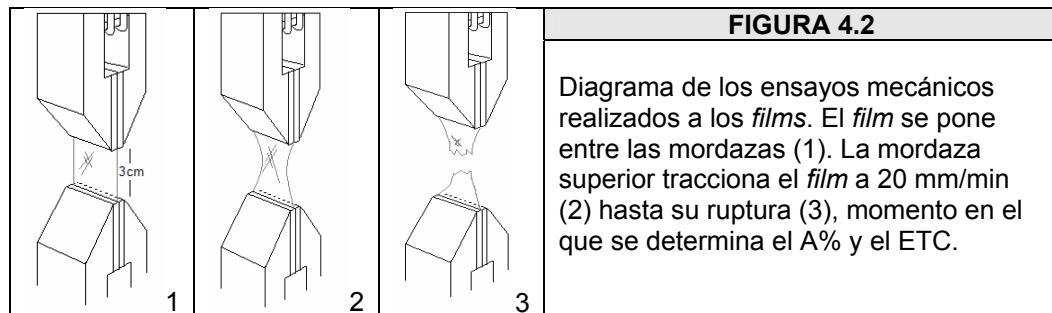
4.9. Determinación de las Propiedades Mecánicas

Se evaluaron el Alargamiento Porcentual (A%) y el Esfuerzo de Tracción en el Corte (ETC) en Nmm^{-2} , de acuerdo con la Norma Oficial Chilena Nch1151.Of.76, equivalente a la norma internacional ISO R1184-1970, con algunas modificaciones que se detallarán a continuación.

Se utilizaron 10 *films* de cada material con dimensiones de 10 mm de ancho y 50 mm de largo. Las mediciones se realizaron en un analizador de textura [LLOYD, MODELO LR5K, INGLATERRA] equipado con una celda de carga de 5 kN. En el anexo 8.5 se diagrama el equipo utilizado y se especifican los parámetros ingresados en el *software* de control del analizador de textura [DAPMAT, V3.05, EE.UU.].



Los *films* fueron puestos entre dos mordazas de aluminio, diseñadas para las mediciones (figura 4.1), instaladas en el analizador de textura y separadas por una distancia de 3 cm. Se apretaron las mordazas firme y uniformemente para evitar que los *films* se deslizaran durante los ensayos. Los *films* fueron traccionados por la mordaza superior a una velocidad de 20 mm/min. Se registró la curva Carga vs. Alargamiento hasta el punto de ruptura de los *films* (figura 4.2).



Se calcularon el A% y el ETC de acuerdo con las ecuaciones 4.1, 4.2 y 4.3 al momento de producirse el corte del *film* con los datos entregados por el *software* de control del

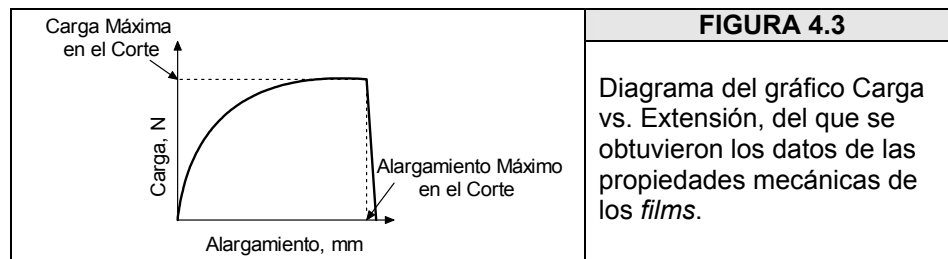
anализador de textura. Los *films* para los cuales la ruptura se produjo en las mordazas o se originó por un defecto evidente se descartaron y fueron reemplazados por otros.

$A\% = \frac{D_f - D_i}{D_i} \times 100$	A% = Alargamiento porcentual	Ecuación 4.1
	D_f = Distancia de alargamiento hasta el corte, en mm	
	D_i = Distancia inicial de referencia, en mm	

$ETC = \frac{C_{MAX}}{A_R}$	ETC = Esfuerzo de tracción en el corte, en Nmm^{-2}	Ecuación 4.2
	C = Carga máxima de tracción en el corte del <i>film</i> , en N	
	A_R = Área transversal inicial del <i>film</i> , en mm^2	

$A_R = \varepsilon \times A$	A_R = Área transversal inicial del <i>film</i> , en mm^2	Ecuación 4.3
	ε = Espesor del <i>film</i> , en mm	
	A = Ancho del <i>film</i> , en mm	

En la figura 4.3 se diagraman aquellos puntos importantes en el cálculo de las propiedades mecánicas descritas en este trabajo. El ETC se calcula dividiendo la fuerza máxima en el corte por el área de la sección transversal inicial de los *films*. El A% se calcula dividiendo el alargamiento máximo en el corte por el largo inicial del *film*.



4.10. Determinación de Propiedades de Bioadhesión

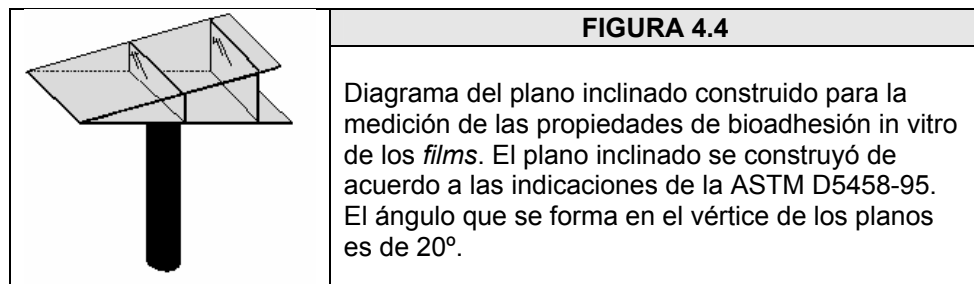
Con el fin de determinar las propiedades de bioadhesión *in vitro* de los *films* se utilizó la metodología propuesta por la ASTM D5458-95, con algunas variaciones que se detallarán a continuación.

La piel de cerdo fue limpiada eliminando las cerdas y la capa grasa y se cortó en trozos cuadrados de 4 cm^2 con espesores cercanos a 3 mm que fueron almacenados a 4°C en una solución al 0,01 mg/mL de gentamicina disuelta en suero fisiológico que tenía un tiempo de almacenamiento máximo de 15 días [NINAN ET AL., 2003]. Al momento de las mediciones se extrajeron los trozos de piel de cerdo, se lavaron con suero fisiológico y se midió la humedad del estrato córneo con un corneómetro

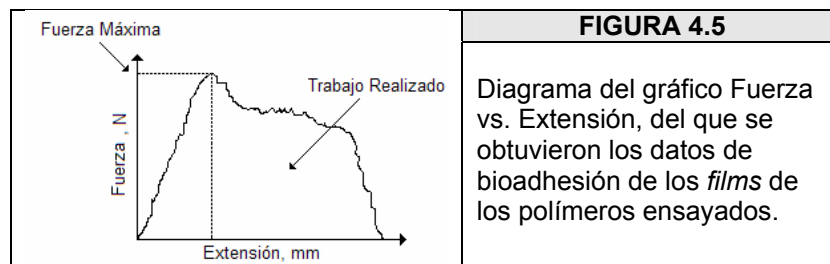
[COURGAGE+KHAZAKA, MODELO CM825, ALEMANIA] en la zona central del corte. Luego, la piel de cerdo se fijó con cianocrilato al centro de un plano inclinado con un ángulo de 20°, especialmente diseñado para este ensayo (figura 4.4).

Las mediciones se efectuaron en un analizador de textura [LLOYD, MODELO LR5K, EE.UU.] equipado con una celda de carga de 5 kN en el que se instaló en la parte inferior el plano inclinado con la piel de cerdo y en la parte superior, y a una distancia de 10 mm, una mordaza (figura 4.2).

Se utilizaron 10 *films* de cada material con dimensiones de 40 mm de largo y 10 mm de ancho. El *film* se adhirió a la piel de cerdo y luego se sujetó a la mordaza que lo traccionó a una velocidad de 5 mm/min hasta una distancia de 20 mm y en un ángulo de 110°.



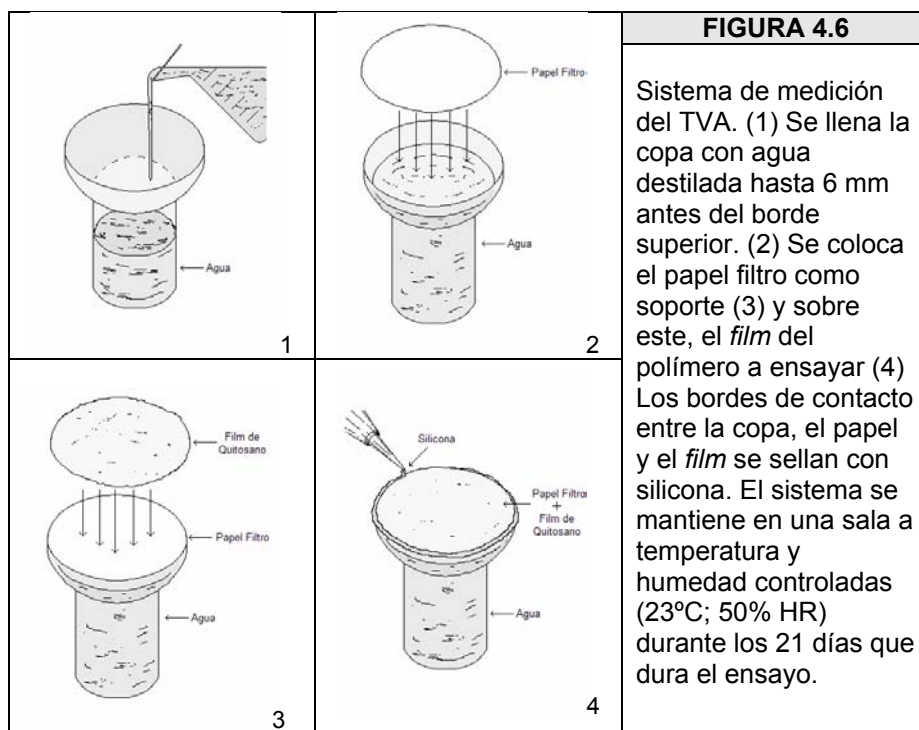
Con las propiedades bioadhesivas medidas de los *films* se estimaron la Fuerza Máxima de Desprendimiento ($F_{m\acute{a}x}$) y el Trabajo de Desprendimiento (T_{des}) necesarios para desprender el *film* de la piel de cerdo. Los datos se obtuvieron a partir del *software* incorporado al analizador de textura [DAPMAT, V3.05, EE.UU.]. En la figura 4.5 se esquematiza el gráfico Fuerza vs. Extensión del que se obtuvieron los datos de bioadhesión.



4.11. Determinación del Grado de Transmisión de Vapor de Agua, TVA.

El ensayo se realizó de acuerdo con la Norma Chilena Oficial NCh2098.Of2000, equivalente a las normas ASTM D1653-93 y DIN 52615, utilizando el método de la copa húmeda y ensayando 6 *films* de cada material.

Las copas se llenaron con agua destilada hasta alcanzar una distancia de 6 mm medidos desde el borde superior, sobre el que se colocó un disco de papel filtro [WHATMAN 50, INGLATERRA] de 8 cm de diámetro como soporte y sobre el cual se montó el *film* de igual diámetro. Finalmente se sellaron con silicona los bordes de contacto entre el papel filtro, el *film* y la copa (figura 4.6).



Las copas se colocaron en una sala con humedad y temperatura controladas ($50 \pm 2\%$ HR; $23 \pm 0,6^\circ\text{C}$) y cada 24 horas y por un periodo de 21 días se registró su cambio de peso utilizando una balanza electrónica [CHYO, MODELO MJ-300, JAPÓN]. También se registraron diariamente las condiciones de la sala de ensayo mediante la información entregada por el sistema de control del acondicionador de aire [YORK, MODELO MCH12PM, EE.UU.], por un higrómetro y un termómetro de máximas y mínimas.

Para el cálculo del TVA se graficó el cambio de masa de las copas en función del tiempo transcurrido. La pendiente de la porción lineal de este gráfico que mejor se ajustó a una recta (coeficiente de regresión, r^2 , cercano a 1) representó la estabilización de la difusión de vapor de agua a través de los *films* por unidad de tiempo (g/h), que luego se normalizó por el área de los *films* utilizados. El valor obtenido es el TVA de los *films* ensayados, que se expresó entonces como los gramos de agua evaporados por hora y por unidad de área del *film* (ecuación 4.4).

$\text{TVA} = \frac{\Delta m}{t \times A}$	TVA = Grado de transmisión de vapor de agua, en $\text{gm}^{-2}\text{h}^{-1}$	Ecuación 4.4
	Δm = Cambio de masa ocurrido en el tiempo, en g	
	T = Tiempo entre lecturas, en h	
	A = Área de ensayo de la muestra, en m^2	

Estudios realizados por Hu et al. (2001) relacionados con el método de la copa húmeda demostraron que el TVA de *films* poliméricos de pequeño espesor y con TVA moderados a altos depende del espesor y del área expuesta de los *films* en estudio. Debido a que el área de los *films* ya se considera dentro de la fórmula para el cálculo del TVA, sólo se necesita corregir multiplicándolo por el espesor, obteniendo entonces el Grado de Transmisión de Vapor de Agua Específico, TVA_ε , con unidades de $\text{mmgm}^2\text{h}^{-1}$ (ecuación 4.5).

$\text{TVA}_\varepsilon = \frac{\Delta m}{t \times A} \times \varepsilon$	TVA_ε = TVA específico, $\text{mm gm}^{-2}\text{h}^{-1}$	Ecuación 4.5
	Δm = Cambio de masa ocurrido en el tiempo, g	
	T = Tiempo entre lecturas, en h	
	A = Área de ensayo de la muestra, en m^2	
	ε = Espesor de los <i>films</i> , mm	

4.12. Ensayo de Irritación Primaria Dérmica

Este ensayo se realizó en conejos de acuerdo a las especificaciones entregadas por la ASTM F 719 – 81 con algunas modificaciones que se señalarán a continuación. Los estudios se realizaron en dependencias y con animales del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP).

Se seleccionaron 6 conejos angora albinos de sexo femenino que pesaban entre 2 y 2,5 Kg. Cada conejo fue puesto en jaulas individuales y no hubo restricción de agua o comida para la realización del ensayo.

En el día de la realización del ensayo se rasuró el lomo de cada conejo con un *clipper* eléctrico [OSTER, GOLEEN A5, MODELO 5-555], que luego fue desinfectado con etanol 70° [MERCK, ALEMANIA]. Se trazó una línea central a lo largo del lomo de cada animal con un lápiz quirúrgico [SECURLINE, N°1000, FINE TIP, JAPÓN] obteniéndose dos áreas; en el lado derecho se hicieron abrasiones usando agujas estériles [BECTON DICKINSON, 25G X 5/8, BRASIL] con el fin de romper parcialmente la continuidad del estrato córneo. El lado izquierdo se mantuvo intacto.

Se cortaron *films* con medidas de 0,5 x 0,5 cm, los que se pusieron dentro de cámaras de aluminio [FINN CHAMBERS OF SCANPOR, ESTÁNDAR, EPITEST LTD., FINLANDIA], las que posteriormente fueron humectadas con 25 µL de agua destilada. Cada muestra se preparó por duplicado para cada conejo, para la zona con abrasión y la que no tenía. Por otra parte, el control se preparó adicionando sólo los 25 µL de agua destilada a la cámara de aluminio.

Los parches con las cámaras fueron acomodados en el lomo del animal. Después de 24 horas de contacto con los *films*, se removieron los parches y se evaluaron los resultados según la tabla 4.3 para eritema y edema. Posterior a la lectura se aplicaron las muestras nuevamente usando la misma técnica descrita. Se repitió la evaluación a las 48 y 72 horas de iniciado el ensayo.

TABLA 4.3. Tabla de Puntuación Utilizada para los Ensayos de Irritación Primaria e Intracutáneo			
Puntaje	Eritema		Edema
0	Sin eritema		Sin edema
1	Eritema levemente perceptible		Edema levemente perceptible
2	Eritema bien definido		Edema leve, con orillas bien definidas por un levantamiento de piel.
3	Eritema moderado a severo		Edema moderado; levantamiento de piel de ± 1 mm.
4	Eritema severo y con llagas		Edema severo, levantamiento de piel mayor a 1 mm, expandido en toda el área de exposición

El Índice Promedio de Irritación Primaria (PII Promedio) fue calculado sumando los promedios de los puntajes para eritema y edema de las zonas con y sin abrasión para cada muestra ensayada. De esta forma, el máximo potencial irritante tiene un puntaje de 8 y el mínimo de 0 (tabla 4.4).

4.13. Ensayo Intracutáneo

Este ensayo se realizó con el fin de evaluar la respuesta local a los extractos de los *films* al ser inyectados intracutáneamente en conejos. Se utilizó el procedimiento descrito por la USP 24 con algunas modificaciones. Los ensayos se realizaron en dependencias y con animales del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP).

Para la preparación de los extractos, se cortaron trozos de los *films* con medidas de 5 cm de largo y 2 cm de ancho. Se agregó a cada *film* suero salino 0,9% hasta completar 10 mL y se agitó hasta obtener total disolución. El control consistió en 10 mL suero salino 0,9%. Luego, todas las muestras se dejaron en una estufa [WTB BINDER, MODELO TF, ALEMANIA] a 70°C durante 2 días.

Se utilizaron 2 conejos angora albinos de sexo femenino cuyos pesos fluctuaban entre 2 y 2,5 Kg. El día del ensayo se rasuró la piel del lomo de los animales con un *clipper* eléctrico, intentando minimizar la irritación mecánica y el trauma. Se frotó suavemente con etanol 70° en la piel expuesta del animal y se secó la zona antes de la inyección.

Se inyectaron 200 µL de cada muestra o control de forma intracutánea con una jeringa para tuberculina [1 mL, 25G 5/8, BECTON DICKINSON, BRASIL], usando un lado del animal para la muestra y el otro para el control.

Se observaron los animales a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la inyección en busca de evidencias de reacción del tejido como eritema, edema o necrosis, los que se evaluaron de acuerdo con la escala numérica presentada en la tabla 4.3.

Se calcularon los puntajes totales y los valores promedio para eritema y edema de cada extracto de los *films* ensayados, los que luego fueron sumados para obtener el puntaje total. Nuevamente, 0 es el valor mínimo y 8 el valor máximo para irritación como respuesta a la inyección intracutánea de los extractos de los *films* (tabla 4.4).

TABLA 4.4: Interpretación de Puntajes para los Ensayos de Irritación Primaria e Intracutáneo	
Valor	Interpretación
0 – 1,9	No irritante, probablemente seguro al contacto con piel humana sana.
2 – 3,9	Medianamente irritante, puede ser seguro de usar, pero es apropiado tomar medidas de protección durante el contacto.
4 – 8	Demasiado irritante al contacto con piel humana. Evitar contacto.

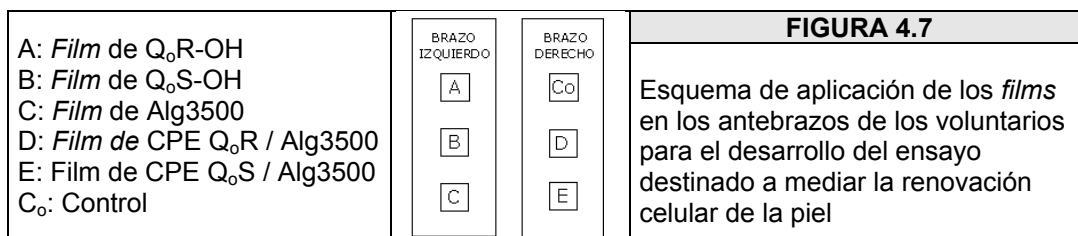
4.14. Protocolo de Evaluación de la Tasa de Descamación del Estrato Córneo

Con este ensayo se pretende establecer si los *films* de Q_o o CPEQA modifican la velocidad de renovación del estrato córneo, lo que estaría relacionado con su capacidad cicatrizante. El ensayo sería positivo si la tinción de DHA desaparece en un tiempo menor al del control no sometido a tratamiento con los *films*.

Los resultados positivos a las pruebas de irritación intracutánea y dérmica no permitieron realizar este ensayo (ver resultados en secciones 5.6 y 5.7). Sin embargo, se realizó un protocolo de aplicación de la técnica, utilizando el colorante y placebos.

Para la realización de los ensayos se deben reclutar al menos 20 voluntarios jóvenes, mayores de 18 y menores de 50 años, a los que se les marcará con un lápiz indeleble quirúrgico 3 zonas de 2 cm de ancho por 2 cm de largo en cada antebrazo, separadas por 1 a 2 cm. Sobre cada uno de estos recuadros se colocaran los *films* de 2 cm de ancho por 2 cm de largo mediante la humectación de la zona con 30 µL de agua destilada, los que deben ser distribuidos uniformemente, desde el centro hacia la periferia (figura 4.7).

Luego se debe cubrir cada una de las 6 zonas demarcadas con un parche Tegaderm[®] y se mantiene este sistema durante 15 días, periodo en el cual se produciría la activación de la mitosis, si es que los *films* tuvieran esa propiedad. Luego de este tiempo, se debe retirar los parches Tegaderm[®] y los *films*. Para el control, se recomienda hacer el mismo tratamiento pero sólo se debería agregar el parche Tegaderm[®].



En cada una de las 6 zonas delimitadas, libres ya de los *films*, se debería teñir con 0,05 mL de DHA al 5% en gel de metilcelulosa al 0,5%. Esta tinción se debe distribuir con 3 ciclos de 10 movimientos circulares, cada 3 minutos. Luego se debería esperar 5 minutos aproximadamente hasta verificar la penetración de la tinción en la piel. Se

debe tener en cuenta que la coloración se estabiliza solo después de 5 horas de la aplicación [PUCCETTI & LEBLANC, 2000].

Se debería hacer un seguimiento diario o máximo cada 2 días para verificar la evolución de la tinción durante aproximadamente 20 días.

4.15. Análisis Estadístico de Datos

Todos los datos de los estudios incluidos en este trabajo se calcularon usando el promedio como medida de la tendencia central y la desviación estándar como medida de dispersión, los que son presentados como promedio \pm desviación estándar. Donde correspondió, la precisión de los resultados fue analizada mediante la determinación del Coeficiente de Variación (CV) que se calculó de acuerdo con la ecuación 4.6 [SKOOG & LEARY, 1994].

$CV = \frac{s}{\bar{X}} \times 100\%$	CV = Coeficiente de Variación, % s = Desviación estándar de la muestra \bar{X} = Promedio de la muestra	Ecuación 4.6
---------------------------------------	---	-------------------------

Las diferencias entre grupos fueron comparadas utilizando el método de análisis de varianza *t de Student* [SOFTWARE ORIGIN, VERSIÓN 5.0, MICROCAL SOFTWARE INC., EE.UU.], considerando un $p \leq 0,05$ como indicador de diferencias significativas. El análisis se hizo con 2 colas y asumiendo igual varianza entre las muestras.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Soluciones de Quitosano, Alginato y CPEQA

El Q_o en polvo se disolvió fácilmente en el ácido láctico debido a que es una base débil que forma una sal por las interacciones electrostáticas entre el grupo amino protonado del Q_o y el ión carboxilato del ácido láctico. Esta reacción es ventajosa ya que este ácido es considerado no dañino [RITTHIDEJ ET AL., 2002]. Según estudios realizados por Khan et al. (2000), los *films* de Q_o obtenidos con ácido láctico mantendrían sus propiedades de baja toxicidad debido a que el ácido láctico es un intermediario normal en los procesos de fermentación (oxidación y metabolismo) del azúcar.

Las soluciones filtradas de Q_oR y Q_oS eran transparentes, con leves tonalidades amarillas y luego de haber sido dejadas en reposo estuvieron libres de burbujas. Tuvieron pH bajos y significativamente diferentes de 2,88 y 3,24 (*t-student*; p≤0,05; n=3) respectivamente. Las soluciones filtradas de Q_oR tuvieron una turbidez de 7,48 ± 0,27 FTU (n=4) y las de Q_oS de 11,0 ± 0,30 FTU (n=4), resultados bajos que aseguran la transparencia y pureza de los *films* fabricados a partir de ellas [URIBE, 2003].

Las soluciones de Alg3500 y Alg14000 filtradas eran transparentes e incoloras y luego de haber sido dejadas en reposo estuvieron libres de burbujas.

La mezcla entre Q_o y Alg formó una suspensión de coacervados fibrosos. Las soluciones fabricadas a partir de los Q_o y Alg14000 presentaron una muy lenta filtrabilidad, por lo que no se pudieron fabricar *films* a partir de ellas. Por esta razón se recomienda no utilizar este Alg de alta viscosidad para la preparación de CPEQA.

5.2. *Films* de Quitosano, Alginato, CPEQA y Tegaderm®.

El espesor y el pH de todos los *films* preparados se describen en la tabla 5.1.

5.2.1. *Films* de Quitosano

Los *films* de Q_oR-LA y Q_oS-LA eran compactos, transparentes, con superficies suaves y brillantes y de color amarillo pálido y sin poros ni fracturas. Los pH de estos *films* fueron mayores a los obtenidos para las respectivas soluciones de Q_o. Presentaron un espesor significativamente similar y uniforme entre ellos, 29,7 ± 0,82 y 29,8 ± 0,41 μm (*t-student*; p≤0,05; n=6) respectivamente, lo que se logró porque los *films* se

prepararon en placas de iguales dimensiones, se agregó siempre la misma cantidad de Q_0 en ellas y fueron puestas en una estufa con soportes completamente nivelados. Los *films* Q_0R-LA y Q_0S-LA formaban precipitados en forma de geles cuando se ponen en contacto con agua. El tratamiento de los *films* con NaOH los hizo insolubles en agua debido a la neutralización del grupo amino protonado del Q_0 , formando la base libre de Q_0 insoluble y la sal sódica de lactato. La reacción química que ocurre entre el Q_0 – Lactato y el NaOH se describe en la figura 5.1 [RITTHIDEJ ET AL., 2002].



Los *films* tratados con NaOH, Q_0R-OH y Q_0S-OH , mantuvieron las características de transparencia pero se volvieron rugosos y sus pH aumentaron hasta alcanzar valores cercanos a 5,8. Además, presentaron espesores menos uniformes y en promedio un 35% mayor al de los *films* de Q_0S-LA y Q_0R-LA . Sin embargo, y para objeto de comparaciones, se seleccionaron sólo aquellos *films* de Q_0S-OH y Q_0R-OH que tuvieran una variación en su espesor menor al 5%, medido a través de sus respectivos CV. Como resultado, los espesores de estos *films* fueron significativamente similares (*t-student*; $p \leq 0,05$; $n=6$).

5.2.2. *Films* de Alginato

Los *films* de Alg3500 y Alg14000 eran compactos, transparentes e incoloros, con superficies suaves y brillantes y sin poros ni fracturas. Los pH de los *films* de Alg fueron significativamente similares entre ellos, ambos cercanos a 6,5. Los *films* de Alg3500 tuvieron un espesor promedio de $24,2 \pm 0,98 \mu\text{m}$ y los de Alg14000 $26,3 \pm 1,37 \mu\text{m}$, significativamente distintos (*t-student*; $p \leq 0,05$; $n=6$).

5.2.3. Films de CPEQA

Los *films* de CPEQA obtenidos con Q_o de las distintas fuentes y con Alg3500 eran heterogéneos y con superficies rugosas y opacas. Sus pH son de $5,46 \pm 0,03$ y $5,66 \pm 0,04$, los que son significativamente diferentes (*t-student*; $p \leq 0,05$, $n=3$) y mayores a los de los *films* de Q_o y menores a los de los *films* de Alg.

Por otra parte, tuvieron espesores mayores a los de los *films* de sus polímeros de origen, menos uniformes y significativamente diferentes; los *films* de CPEQA de Q_oR- Alg3500 tuvieron espesores de $127,2 \pm 5,12 \mu\text{m}$ y los de Q_oS- Alg3500 de $69,8 \pm 3,25 \mu\text{m}$ (*t-student*; $p \leq 0,05$; $n=6$).

5.2.4. Films de Poliuretano (Tegaderm[®])

Los *films* de Tegaderm[®] presentaron espesores de $41,5 \pm 0,55 \mu\text{m}$ ($n=6$) y un pH de 5,68 que es semejante al presentado por los *films* de Q_oR-OH y Q_oS-OH. Estos pH son similares a los de la piel humana, por lo que al ser puestos en contacto con ella no causarían irritación. Sólo se pudo aumentar el pH del Q_o una vez que los *films* estuvieron fabricados, esto debido a que el Q_o es soluble sólo en soluciones con pH menores a 6, los que son necesarios para la formación de los *films*.

TABLA 5.1. pH y Espesor de los Films		
Muestra	pH	Espesor (μm)
Q _o R-LA	$3,36 \pm 0,01$	$29,7 \pm 0,82$
Q _o S-LA	$2,96 \pm 0,01$	$29,8 \pm 0,41$
Q _o R-OH	$5,86 \pm 0,02$	$39,8 \pm 1,47$
Q _o S-OH	$5,75 \pm 0,02$	$40,0 \pm 1,67$
Alg3500	$6,47 \pm 0,01$	$24,2 \pm 0,98$
Alg14000	$6,45 \pm 0,01$	$26,3 \pm 1,37$
CPE Q _o R – Alg3500	$5,46 \pm 0,03$	$127,2 \pm 5,12$
CPE Q _o S – Alg3500	$5,66 \pm 0,04$	$69,8 \pm 3,25$
Tegaderm [®]	$5,68 \pm 0,01$	$41,5 \pm 0,55$

5.2.5. Microestructuras

En el anexo 8.6 se muestran las microestructuras superficiales y transversales de los *films* de Q_oS-LA, Q_oR-LA, Q_oS-OH y Q_oR-OH, obtenidas a través de microscopía electrónica de barrido con un aumento de 7000x.

En ellas se puede apreciar la estructura fibrosa de los *films* de Q_oR-LA, mientras que los de Q_oS-LA muestran una estructura más densa y compacta. En ambos *films* se

observa una estructura homogénea sin poros o canales y tampoco se observan cristales, lo que indica que el proceso de purificación a través de filtración fue efectivo. Los *films* de Q_oS-OH y Q_oR-OH muestran una superficie compacta, homogénea, sin poros ni canales. En ambos casos se observan cristales de lactato, lo que indica que el proceso de lavado de los *films* luego de su tratamiento con NaOH fue insuficiente.

5.3. Propiedades Mecánicas

Al ser ensayados en el analizador de textura, todos los *films* presentaron un comportamiento mecánico similar al descrito por la figura 4.3. Inicialmente, los *films* tuvieron un comportamiento gobernado por la ley de *Hooke*, es decir, presentaron una zona de deformación reversible o elástica (zona lineal de la curva Carga vs. Alargamiento), seguida por una zona de alargamiento del *film* en que la carga se mantiene constante, que es la zona de deformación irreversible o plástica, luego de la cual el *film* sufre la ruptura [BEGIN & VAN CALSTEREN, 1999].

La elección de la velocidad y condiciones de almacenamiento de los *films* para determinar las propiedades mecánicas se hicieron basándose en los datos obtenidos de múltiples ensayos, los que se encuentran resumidos en el anexo 8.7. Con una velocidad de 20 mm/min y los *films* almacenados a 23°C y 50% HR se obtuvieron resultados de mayor magnitud y más precisos (menor CV).

5.3.1. Alargamiento Porcentual, A%

En la figura 5.2 se grafican los resultados del Alargamiento Porcentual en el Corte (A%) donde se puede apreciar que los *films* de Q_oS-LA resultaron ser significativamente más elásticos que los *films* de Q_oR-LA, registrando valores de A% de $48,3 \pm 3,7\%$ y $37,2 \pm 2,5\%$ respectivamente (*t-student*; $p \leq 0,05$, $n=10$).

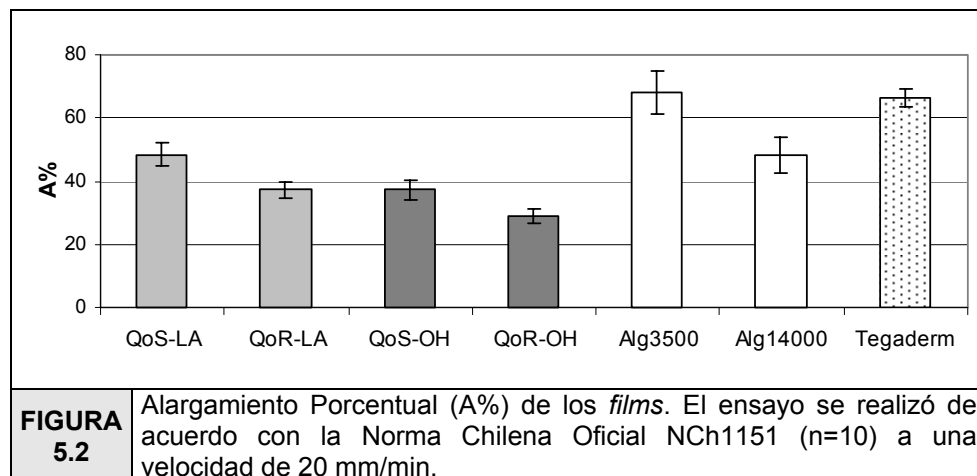
Los *films* tratados con NaOH, Q_oS-OH y Q_oR-OH, también presentaron diferencias significativas, con A% de $37,2 \pm 3,1\%$ y $28,8 \pm 2,3\%$ respectivamente (*t-student*; $p \leq 0,05$, $n=10$). Estos resultados indican que los *films* neutralizados son menos elásticos que sus contrapartes no tratados con NaOH. Ha sido descrito que el ácido láctico puede ser usado como agente plastificante [KHAN ET AL., 2000], por lo que la disminución de la elasticidad se debería al desplazamiento del ión lactato.

En la figura 5.2 también se puede apreciar que tanto para los *films* tratados como los no tratados con NaOH se verificó que los *films* de Q_o de cangrejo (Q_oS-OH) son más elásticos que los de camarón (Q_oR-OH).

Los *films* de Alg3500 tuvieron un A% de 68,1 ± 6,6% (n=10), el más alto registrado en nuestros estudios, mientras que los *films* de Alg14000 tuvieron un A% de 48,3 ± 5,6% (n=10), resultado similar al presentado por los *films* de Q_oS-LA, observándose diferencias significativas entre ellos (*t-student*; p≤0,05, n=10).

Debido a su rigidez, los *films* de CPEQA no fueron sometidos a estos estudios porque no pudieron ser incorporados a las mordazas sin provocar antes su fractura.

Los *films* de poliuretano (Tegaderm[®]) presentaron un A% de 66,3 ± 2,9% (n=10).



5.3.2. Esfuerzo de Tracción en el Corte, ETC

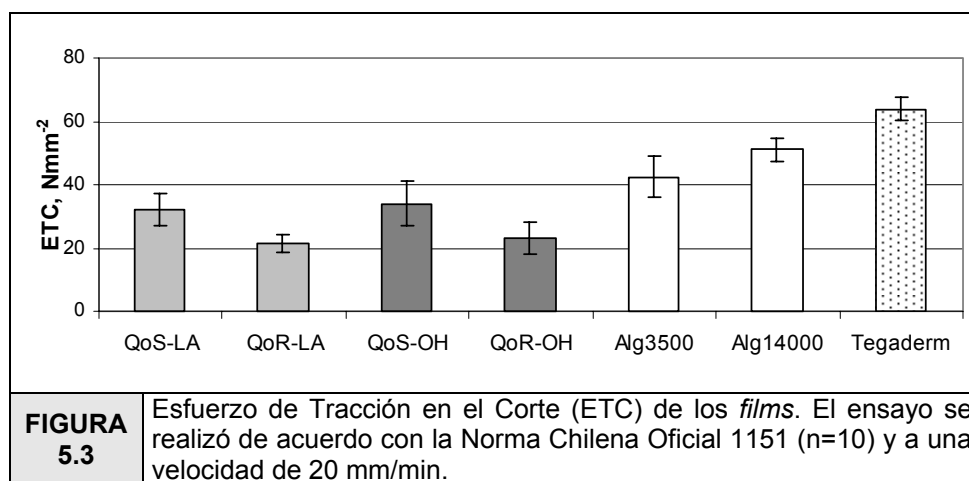
En la figura 5.3 se grafican los resultados del Esfuerzo de Tracción en el Corte (ETC) en la que se puede apreciar que los *films* de Q_oS-LA resultaron ser más resistentes que los *films* de Q_oR-LA, registrando valores de ETC de 32,0 ± 5,2 Nmm⁻² y 21,4 ± 2,9 Nmm⁻² respectivamente (*t-student*; p≤0,05, n=10).

Los *films* tratados con NaOH, Q_oS-OH y Q_oR-OH, mostraron ETC de 33,9 ± 7,0 Nmm⁻² (n=10) y 23,1 ± 4,8 Nmm⁻² (n=10) respectivamente. Estos resultados muestran que los *films* de Q_oS-OH son más resistentes que sus contrapartes no tratados con NaOH, sin embargo, no hay diferencias significativas entre los *films* de Q_oR-OH y Q_oR-LA (*t-student*; p≤0,05, n=10).

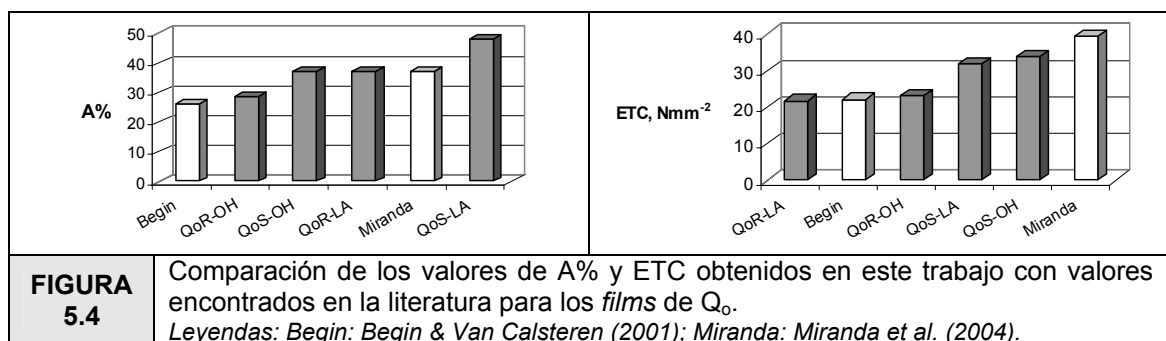
Los *films* de Alg3500 tuvieron un ETC de $42,5 \pm 6,3 \text{ Nmm}^{-2}$, mientras que los *films* de Alg14000 tuvieron un ETC de $51,0 \pm 6,3 \text{ Nmm}^{-2}$, siendo significativamente más resistentes que los de Alg3500 (*t-student*; $p \leq 0,05$, $n=10$), lo que es razonable debido a que para los polímeros en general se da que a mayor grado de polimerización hay mayor resistencia mecánica a la ruptura [MARTIN, 1993]. Ambos *films* de Alg mostraron mayor resistencia que los *films* de Q_o. La microscopía de fuerza atómica (resultados no publicados) muestra que las fibras de Alg son significativamente mayores que las fibras de Q_o, lo que explicaría su mayor resistencia mecánica.

Los *films* de poliuretano (Tegaderm[®]) presentaron un ETC de $63,8 \pm 3,6 \text{ Nmm}^{-2}$ ($n=10$), que dan cuenta de la mayor resistencia de este material comparada a los *films* fabricados a partir de los polímeros naturales ensayados en este estudio.

Nuevamente, los *films* de CPEQA no fueron sometidos a estos estudios porque debido a su rigidez no pudieron ser incorporados a las mordazas sin provocar antes su fractura. En un estudio realizado por Wang et al. (2001) obtuvieron un A% de 1,7; 2,6 y 2,66% y ETC de 9; 16 y 17 Nmm^{-2} para *films* de CPEQA fabricados con concentraciones de 0,05, 0,06 y 0,07% p/v de CaCl_2 respectivamente y de manera similar a los fabricados en nuestro trabajo. Estos resultados indican que los CPEQA son rígidos y de baja resistencia mecánica, lo que concuerda con las observaciones encontradas en nuestro trabajo.



En la literatura existe una abundante información sobre las propiedades mecánicas de *films* de Q₀, sin embargo, se encuentran diferencias considerables no sólo debido a las propiedades del Q₀ como son su peso molecular o grado de desacetilación, sino que también debido al proceso de fabricación de los *films*, la velocidad y condiciones ambientales de las pruebas mecánicas. Para poder comparar los resultados obtenidos en este trabajo se seleccionaron aquellos datos de la literatura que estuvieran cercanos a la metodología y tipo de Q₀ utilizado en nuestro trabajo (figura 5.4).



Begin & Van Calsteren (2001) fabricaron *films* de Q₀ al 1% en ácido láctico al 2% con un espesor de 45 µm y utilizaron una velocidad de prueba 5 mm/min, obteniendo un A% de 26,2 y un ETC de 22,2 Nmm⁻². Miranda et al. (2004) fabricaron *films* en ácido acético, los almacenaron a 23°C y 50% HR y realizaron la prueba con *films* de 25 µm a 120 mm/min, obteniendo un A% de 37,4 Nmm⁻² y un ETC de 39, 5 Nmm⁻². Todos estos datos concuerdan bien con los encontrados para los *films* de Q₀ fabricados en nuestro laboratorio.

5.4. Propiedades de Bioadhesión

Las propiedades de bioadhesión están determinadas por las propiedades intrínsecas del polímero y por el ambiente en el cual es colocado. Las propiedades intrínsecas importantes son el peso molecular (PM), la concentración del polímero, la flexibilidad de las cadenas poliméricas y los grupos químicos que puedan formar uniones electrostáticas o secundarias como son los puentes de hidrógeno y las fuerzas de *Van der Waals*. En relación con los factores ambientales, el pH, el tiempo de contacto y el

grado de hinchamiento afectan significativamente las propiedades de bioadhesión de los polímeros [LEE ET AL., 2000].

La HR de la piel de cerdo utilizada para las mediciones tuvo un valor de $64 \pm 0,79\%$ ($n=12$). Se consideró que para un estudio de bioadhesión *in vitro* adecuado era necesario realizarlo utilizando un tejido modelo que fuera similar a la piel humana. Se eligió piel de cerdo para probar la bioadhesión de los *films* de Q_o debido a la gran similitud anatómica y fisiológica que tiene con la piel humana y además debido a la gran cantidad de piel que se puede obtener del mismo animal, fue posible reducir la variabilidad en los resultados [SULLIVAN ET AL., 2001].

La elección de la velocidad y condiciones de almacenamiento de los *films* para determinar las propiedades de bioadhesión se hicieron basándose en los datos obtenidos de múltiples ensayos, los que se encuentran resumidos en el anexo 8.8. Con una velocidad de 5 mm/min y un almacenamiento de 23°C y 50% HR se obtuvieron resultados más precisos (menor CV) y de mayor magnitud.

En la figura 5.5 se grafican los resultados de los ensayos de bioadhesión realizados, en la que se puede apreciar la buena correlación entre los resultados de $F_{m\acute{a}x}$ y T_{des} .

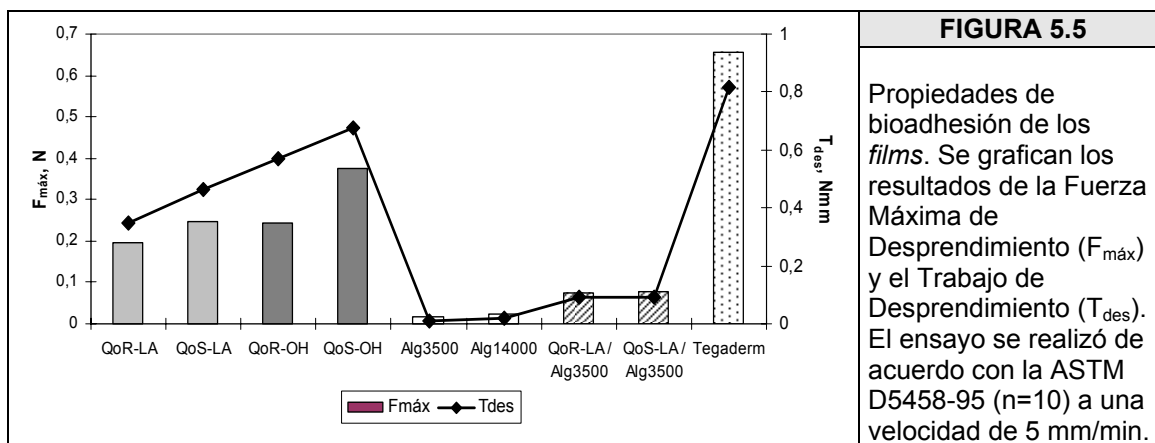


FIGURA 5.5
Propiedades de bioadhesión de los *films*. Se grafican los resultados de la Fuerza Máxima de Desprendimiento ($F_{m\acute{a}x}$) y el Trabajo de Desprendimiento (T_{des}). El ensayo se realizó de acuerdo con la ASTM D5458-95 ($n=10$) a una velocidad de 5 mm/min.

De acuerdo a los resultados obtenidos, los *films* de Q_oS-LA tienen mejores propiedades de bioadhesión que los *films* de Q_oR-LA, presentando $F_{m\acute{a}x}$ de $0,25 \pm 0,01$ N y un T_{des} de $0,47 \pm 0,07$ Nmm contra un $F_{m\acute{a}x}$ de $0,20 \pm 0,01$ N y un T_{des} de $0,34 \pm 0,06$ Nmm (*t-student*; $p \leq 0,05$, $n=10$). En este estudio, tanto el peso molecular como la concentración de los polímeros son semejantes entre Q_oS y Q_oR por lo que no constituirían

explicaciones de las diferencias encontradas. Sin embargo, la flexibilidad de las cadenas es crítica para la interpenetración y el enganchamiento del polímero a la superficie de prueba. En este trabajo se demostró que el Q_oS es más flexible que el Q_oR, por lo tanto, sería razonable adjudicar a este hecho la mayor F_{máx} y T_{des} presentado por este Q_o.

Los *films* de Q_o tratados con NaOH presentan las mejores propiedades de bioadhesión que sus contrapartes no tratados con NaOH. Los *films* de Q_oS-OH presentaron una F_{máx} de $0,37 \pm 0,025$ N (n=10) y un T_{des} de $0,68 \pm 0,11$ Nmm (n=10); mientras que los de Q_oR-OH presentaron una F_{máx} de $0,24 \pm 0,02$ N (n=10) y un T_{des} de $0,57 \pm 0,091$ Nmm (n=10). Los Q_oR-LA y Q_oS-LA tienen grupos catiónicos que podían interactuar con la superficie de la piel de cerdo cargada negativamente, lo que les entrega características bioadhesivas, sin embargo, el Q_oR-OH y Q_oS-OH no estarían ionizados por lo que su bioadhesión mayor se podría explicar debido a su mayor rugosidad y el consecuente aumento de la superficie de contacto con la piel de cerdo [SONG ET AL., 2005].

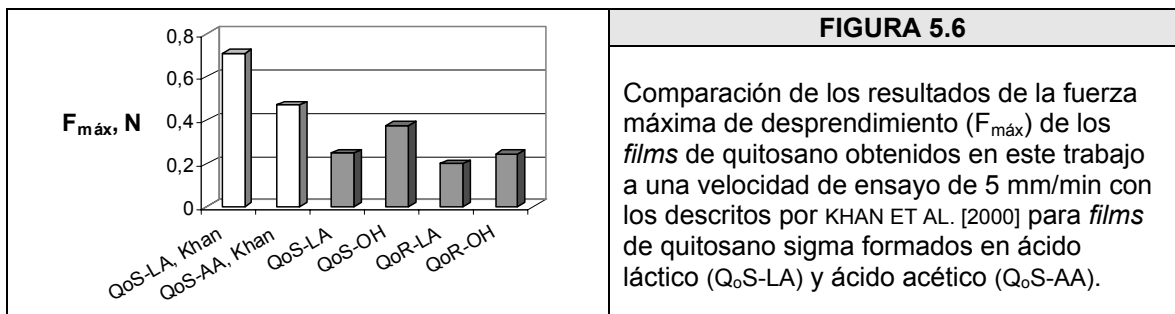
Los Alg presentaron las propiedades de bioadhesión más pobres y con alta variabilidad en comparación con los de Q_o. Los *films* de Alg3500 presentaron una F_{máx} de $0,016 \pm 0,0032$ N (n=10) y un T_{des} de $0,008 \pm 0,007$ Nmm (n=10); mientras que los de Alg14000 presentaron una F_{máx} de $0,024 \pm 0,01$ N (n=10) y un T_{des} de $0,018 \pm 0,01$ Nmm (n=10). Este resultado es razonable debido a que el Alg tiene un grupo aniónico carboxílico de igual carga que las proteínas de la piel, por lo que no se producirían interacciones electrostáticas y probablemente sólo habría unión a la piel de cerdo a través de puentes de hidrógenos u otras uniones más débiles y en este caso, el PM es un factor importante para la bioadhesión, a mayor PM, mayor polimerización y por lo tanto mayor posibilidad de formar puentes de hidrógeno y entonces se obtendría una mayor bioadhesión, resultado que se observa [LEE ET AL., 2000].

Las propiedades de bioadhesión de los complejos presentan valores intermedios entre los de sus respectivos polielectrolitos. Esto indica que la adición de Q_o a Alg mejora sus propiedades bioadhesivas. Los *films* de CPEQA de Q_oS-Alg3500 mostraron una F_{máx} de $0,078 \pm 0,035$ N (n=6) y un T_{des} de $0,094 \pm 0,091$ Nmm (n=6); los *films* de Q_oR-Alg3500 $0,075 \pm 0,025$ N (n=6) y un T_{des} de $0,092 \pm 0,077$ Nmm (n=6). Si la interacción Q_o-Alg en los *films* de CPEQA fuera total, no habría interacción electrostática por lo que

la unión sería sólo a través de puentes de hidrógeno con lo que debieran observarse resultados semejantes a los presentados por los *films* de Alg. El resultado intermedio indica entonces que quedan grupos amino protonados en la molécula de Q_o.

Los *films* de Tegaderm[®] presentan una F_{máx} y un T_{des} superior a los *films* ensayados, lo que podría indicar mayor dificultad al momento de removerlos de los tejidos (F_{máx} = 0,66 ± 0,01 N (n=10); T_{des} = 0,82 ± 0,049 Nmm (n=10)).

Los resultados obtenidos en este trabajo fueron comparados con los publicados por Khan et al. (2000). En la figura 5.6 se describen las propiedades de bioadhesión de *films* de Q_oS disueltos en ácido láctico y ácido acético (1,4% Q_o en 1% de ácido láctico ó 2% de ácido acético). El peso molecular del Q_o y los métodos de producción de los *films* fueron similares a los utilizados en este trabajo, sin embargo, los métodos de medición de la bioadhesión y las condiciones ambientales de prueba (60% HR) fueron distintos.



El objetivo de la curación es la cicatrización de las heridas, sin embargo, el control del dolor en los pacientes es un factor importante que contribuye al éxito del tratamiento de las quemaduras. Los pacientes identifican los cambios de apósitos como el momento más doloroso de las curaciones, lo que resulta particularmente problemático cuando el apósito se adhiere fuertemente a la herida, arranca el epitelio recientemente formado y daña la piel cercana a la herida, retrasando el proceso de curación y aumentando el riesgo de la formación de cicatrices [DYKES, 2001]. La menor bioadhesión de nuestros *films* sugiere que podrían ser retirados de la piel con poco o ningún trauma para el paciente [MINGHETTI ET AL., 2003]. Además, como existe una bioadhesión suficiente para los *films* de Q_o, no sería necesario la utilización de adhesivos adicionales como el

cianocrilato para adherir los *films* a la piel, que frecuentemente es tóxico para los tejidos y puede producir carcinogenicidad dosis-dependiente [NINAN ET AL., 2003].

5.5. Grado de Transmisión de Vapor de Agua, TVA.

La cinética de evaporación de vapor de agua de los *films* ensayados se muestra en la figura 5.7, en la que se puede apreciar el comportamiento lineal de los *films* de Alg y de CPEQA y el comportamiento no lineal de los *films* de Qo, el que es concordante con los resultados publicados en la literatura [WILES ET AL., 2000]. El punto final de estas curvas (día 21) indica la cantidad total de agua evaporada a través de los *films*; los *films* de Qo permitieron una mayor evaporación de agua (≈ 60 g), seguido por los *films* de Alg (≈ 35 g) y finalmente los de CPEQA, lo que permitieron la evaporación de 28 g aproximadamente (tabla 5.2).

Del análisis de la figura 5.7 se encontró que el periodo de seis días que mejor se ajustó a una línea recta para todos los *films* ensayados está entre los días 7 y 12 y que representa el periodo donde se mantiene un TVA relativamente constante. Los coeficientes de regresión (r^2) de las pendientes elegidas para el cálculo del TVA tenían valores de 0,99 o mayores. Los valores obtenidos de TVA se muestran en la tabla 5.2. Para el cálculo del TVA se tomó en consideración el valor promedio de las 6 copas ensayadas para cada material y las rectas que se construyeron constan de 6 puntos cada una.

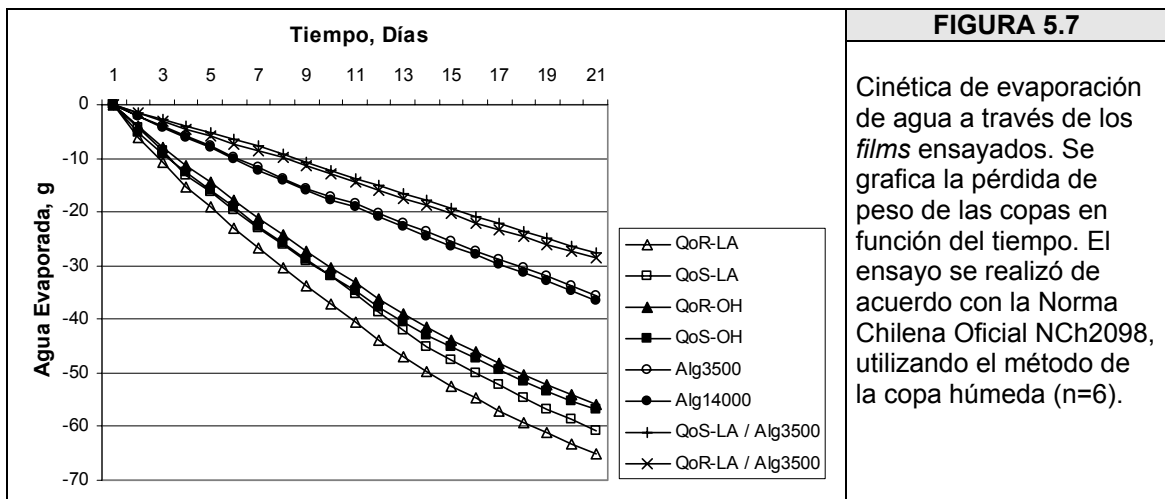


FIGURA 5.7

Cinética de evaporación de agua a través de los *films* ensayados. Se grafica la pérdida de peso de las copas en función del tiempo. El ensayo se realizó de acuerdo con la Norma Chilena Oficial NCh2098, utilizando el método de la copa húmeda (n=6).

Los datos de TVA indican que los *films* de Q_oR-LA son significativamente más permeables al vapor de agua que los *films* de Q_oS-LA, con valores de TVA de 28,24 ± 0,44 y 25,92 ± 0,98 gm⁻²h⁻¹ respectivamente (*t-student*; p≤0,05; n=6).

Los *films* de Q_o tratados con NaOH, Q_oR-OH y Q_oS-OH presentan TVA significativamente similares entre si, de 24,95 ± 1,50 y 25,09 ± 1,39 gm⁻²h⁻¹ (*t-student*; p≤0,05; n=6) respectivamente. Ambos valores son significativamente menores que sus contrapartes no lavados con NaOH (*t-student*; p≤0,05; n=6).

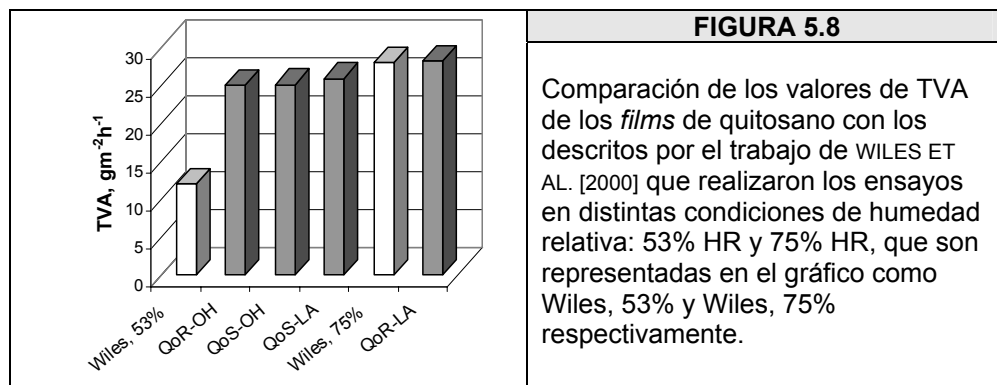
Por otra parte, los *films* de Alg tienen TVA menores a los de los *films* de Q_o; los *films* de Alg3500 tuvieron un TVA de 13,86 ± 0,29 y los de Alg14000 14,17 ± 0,70 gm⁻²h⁻¹, los que son significativamente similares entre ellos (*t-student*; p≤0,05; n=6).

Los *films* de CPEQA de Q_oS y Q_oR con Alg3500 presentaron menores TVA que sus componentes individuales, de 12,40 ± 0,50 y 12,41 ± 0,36 gm⁻²h⁻¹ respectivamente, los que son significativamente similares (*t-student*; p≤0,05; n=6).

El TVA ϵ entrega información acerca de la influencia de los espesores de los *films* en la transferencia de vapor de agua entre sus caras. Los resultados indican que no existirían diferencias significativas (*t-student*; p≤0,05; n=6) entre los *films* de Q_oS y Q_oR tanto tratados como no tratados con NaOH, lo que sugiere que el aumento en el espesor promedio de los *films* tratados con NaOH aumentó la resistencia a la transferencia de masa a través de ellos [MIRANDA ET AL., 2004] por lo que presentaron TVA menores. La misma situación ocurre con los *films* de Alg. Con los *films* de CPE de Q_oS-LA / Alg3500, podemos observar que la corrección por el espesor promedio de los *films* informa sobre una permeabilidad similar a la presentada por el Q_oS. En el caso de los *films* de CPE de Q_oR-LA / Alg3500 tenemos que su TVA ϵ es de 1,57 ± 0,06 mm gm⁻²h⁻¹, lo que indicaría una permeabilidad mayor a la de sus componentes individuales.

TABLA 5.2. Propiedades de Permeabilidad de los <i>Films</i> Ensayados			
<i>Film</i>	Agua Total Evaporada (g)	TVA (gm ⁻² h ⁻¹)	TVA ϵ (mm gm ⁻² h ⁻¹)
Q _o R-LA	65,00 ± 0,89	28,24 ± 0,44*	0,85 ± 0,01
Q _o S-LA	60,81 ± 2,01	25,92 ± 0,98*	0,79 ± 0,03
Q _o R-OH	55,79 ± 2,16	24,95 ± 1,50	1,00 ± ,06
Q _o S-OH	56,79 ± 2,51	25,09 ± 1,39	1,00 ± 0,06
Alg3500	35,67 ± 0,94	13,86 ± 0,29	0,33 ± 0,01
Alg14000	36,54 ± 1,26	14,17 ± 0,70	0,37 ± 0,02
CPE Q _o S-LA / Alg3500	27,56 ± 1,27	12,40 ± 0,50	0,87 ± 0,03
CPE Q _o R-LA / Alg3500	28,60 ± 0,95	12,31 ± 0,46	1,57 ± 0,06

Al comparar los valores de TVA obtenidos en este trabajo con los encontrados en la literatura se pudo establecer una concordancia con los valores publicados. Un trabajo realizado por Wiles et al. (2000) utilizó *films* de Q_o formados con un 2% de Q_o en una solución de ácido acético al 1% que tuvieron un espesor promedio de 39,6 μm. El estudio se realizó en variadas condiciones ambientales. Las condiciones que se utilizaron para la comparación son 25°C y 53% HR y 25°C y 75% HR (figura 5.8).



Por otra parte, un estudio realizado por Wang et al. (2001) con *films* de CPEQA fabricados de manera similar a los de nuestro estudio, con espesores cercanos a 26 μm, señala que la adición de CaCl₂ afecta significativamente su permeabilidad. En ese estudio probaron la adición de CaCl₂ en concentraciones crecientes, obteniendo un TVA de $27,4 \pm 0,32 \text{ gm}^{-2}\text{h}^{-1}$ (n=3) con CaCl₂ 0,05% p/v y de $23,6 \pm 0,99 \text{ gm}^{-2}\text{h}^{-1}$ (n=3) con CaCl₂ al 0,07%. Si se calculan los TVAε a partir de los resultados de TVA de Wang et al. (2001) se concluye que estos son cercanos a los de Q_oS-LA / Alg3500 (valores de TVAε de 0,71 y 0,61 mm gm⁻²h⁻¹ respectivamente). Sin embargo, la permeabilidad de los CPEQA aumenta con concentraciones mayores de CaCl₂; el mecanismo que explicaría este comportamiento sería que los iones Ca²⁺ desplazan los enlaces Q_o – Alg, aumentando la permeabilidad. Esta hipótesis se plantea como complemento del análisis de TVAε y reafirma que los *films* de CPEQA tendrían permeabilidades similares o mayores que sus respectivos polímeros constituyentes. Esta hipótesis es coherente con el análisis visual de los *films* de CPEQA que poseen una porosidad mayor a la de los *films* formados por sus polímeros constituyentes.

Uno de los objetivos de un apósito es el de acelerar la curación de heridas mediante la prevención de la pérdida de fluidos para mantener un ambiente fisiológico, pero como la superficie de una quemadura contiene más agua y exudados, es necesario evaporarlos a través del apósito para que éste se adhiera a la superficie de la herida y para que el exudado no se acumule entre la herida y el apósito, lo que constituye un medio de cultivo excelente para patógenos y contribuye a la maceración de los tejidos, retrasando el proceso de curación. Esto significa que un apósito ideal debería controlar la pérdida evaporativa de agua de la superficie de una herida. El TVA de la piel normal es de $8 - 21 \text{ gm}^{-2}\text{h}^{-1}$. Si el TVA de un material es menor al de la piel normal, el tejido bajo él se macera y el exudado depositado entre el apósito y la herida se acumula e infecta. Por estas razones, los materiales adecuados para la fabricación de apósitos deben tener TVA parecidos o mayores al de la piel normal [LEE ET AL., 2000]. Todos los *films* de Q_0 ensayados en este trabajo exhibieron valores de TVA significativamente mayores a los de la piel, lo que se debería a su hidrofiliidad que permite que las moléculas de agua interactúan con la matriz polimérica [AYDINLI ET AL., 2004]. Con estos TVA, los *films* tendrían la suficiente capacidad para prevenir la acumulación de fluidos en heridas con exudados medios a altos, asegurando que la deshidratación de la herida no ocurra [LOKE ET AL., 2000]. Los *films* de Alg y de CPEQA presentan TVA en el rango de los presentados por la piel, por lo que deberían ser utilizados solo en heridas con exudado bajos a medios. Sin embargo, todos los *films* aseguran la creación y mantención de un ambiente húmedo alrededor de la herida.

En la tabla 5.3 se describen algunos valores de TVA de apósitos comerciales modernos comúnmente utilizados en el tratamiento de quemaduras, medidos con el método de la copa húmeda. Se puede apreciar que los *films* de Q_0 presentaron permeabilidades cercanas a los de los apósitos de poliuretano y que los de Alg y CPEQA cercanos a los de hidrocoloides.

Apósito	Fabricantes*	Material*	TVA ($\text{gm}^{-2}\text{h}^{-1}$)	Referencia
Comfeel® Plus	Coloplast	Hidrocoloide	14	FABRICANTES
Opsite®	Smith & Nephew	Poliuretano	33	SIBBALD ET AL., 2000
Tegaderm®	3M Health Care	Poliuretano	35	SIBBALD ET AL., 2000

5.6. Ensayo de Irritación Primaria Dérmica

Este ensayo fue realizado con el fin de evaluar el nivel de irritación que causan los *films* al ponerse en contacto con piel de conejo con y sin abrasiones. La tabla 5.4 muestra los valores del PII Promedio para los *films* ensayados en este estudio.

El Q₀S mostró ser medianamente irritante (PII = $2,17 \pm 0,5$; n=6), mientras que los restantes *films* mostraron ser no irritantes. Sin embargo, cabe destacar que el PII Promedio considera en un solo valor la suma de los promedios de la formación de eritema y edema. En el estudio realizado se observó una clara formación de eritema para la mayoría de los *films*, sin embargo, la formación de edema estuvo casi ausente. Las reacciones presentadas fueron violentas y de aumento progresivo en el tiempo. Por la ausencia de edema, entonces, habría una subestimación de los resultados.

Tabla 5.4. Puntajes para la Formación de Eritema y Edema de los <i>Films</i>, n=6				
	Eritema	Edema	PII Promedio	Interpretación
Q ₀ R	$1,89 \pm 0,64$	0	$1,89 \pm 0,64$	No irritante
Q ₀ S	$1,97 \pm 0,32$	$0,19 \pm 0,34$	$2,17 \pm 0,48$	Medianamente irritante
Alg3500	$1,22 \pm 0,61$	0	$1,22 \pm 0,61$	No irritante
Alg14000	$1,67 \pm 0,88$	0	$1,67 \pm 0,88$	No irritante
CPE Q ₀ R / Alg3500	$1,31 \pm 0,77$	0	$1,31 \pm 0,77$	No irritante
CPE Q ₀ S / Alg3500	$1,75 \pm 0,74$	0	$1,75 \pm 0,74$	No irritante
Control (Agua Destilada)	0	0	0	No irritante

Las causas posibles de este comportamiento son múltiples y con este ensayo fue imposible precisar si la capacidad irritante de los *films* es intrínseca a las moléculas implicadas en el estudio o bien existe contaminación de las materias primas en sus procesos de fabricación, almacenamiento o transporte. No obstante, de este ensayo se consideró la potencial irritabilidad que causaría el bajo pH de los *films* de Q₀, razón por la que se decidió someterlos al tratamiento con NaOH con el fin de aumentar su pH hasta obtener valores similares a los que presenta la piel humana. Esta hipótesis se sustentó en el hecho que los CPEQA tenían menores reacciones que los respectivos Q₀, lo que se debería en parte a su aumento de pH al mezclarlo con las soluciones de Alg. Sin embargo, no se realizarán nuevos estudios para probar esta hipótesis hasta que todas las presuntas causas estén cabalmente estudiadas.

Los *films* ensayados poseen propiedades irritantes que hacen imposible su uso en voluntarios humanos para los ensayos de renovación celular de la piel propuesto en el

anteproyecto de esta memoria. Se propone realizar ensayos microbiológicos a la materia prima y revisar los procesos de obtención de los *films* para subsanar esta situación.

Un estudio realizado por Khan et al. (2000) determinó que *films* de Q_o adquirido en la compañía Sigma-Aldrich (Q_oS) fabricados en ácido láctico tienen un PII Promedio cercano a 0,4, el que es 5 veces menor al encontrado por nuestro trabajo. Esta diferencia reafirma la hipótesis que indica que habría contaminación en las materias primas y con mayor probabilidad en los procesos de fabricación, debido a la similitud presentada en los valores de formación de eritema en todas las muestras ensayadas y que por lo tanto, el potencial de irritación que presentaron los *films* ensayados no sería intrínseco a sus respectivas moléculas.

5.7. Ensayo Intracutáneo

De los *films* ensayados, sólo el Alg3500 y el CPE Q_oS - Alg3500 y el control no presentaron reacciones positivas al ensayo intracutáneo, los *films* restantes produjeron reacciones de baja a mediana magnitud, como es el caso del Q_oS-LA. En este caso, los resultados fueron positivos tanto para la formación de edema como de eritema (tabla 5.5).

Los *films* de Q_oR-LA se clasificaron como no irritantes (Puntaje de Irritación Promedio = $0,33 \pm 0,47$; n=2), resultado que es menor al obtenido por el Q_oS-LA (Puntaje = $2,50 \pm 1,65$; n=2), que se clasificaría entonces como medianamente irritante.

Los *films* de Alg14000 presentaron un Puntaje de $1,00 \pm 1,41$ (n=2), mientras que los de Alg3500 no presentaron reacciones de irritación (Puntaje = 0; n=2).

Por otra parte, los extractos de CPE Q_oS-LA/Alg3500 no presentaron reacciones de irritación mientras que los de CPE Q_oR-LA/Alg3500 presentaron un Puntaje de $0,17 \pm 0,24$ (n=2).

Las posibles causas de estos resultados podrían ser múltiples y con este ensayo es imposible precisar si la capacidad irritante de los *films* es intrínseca a la molécula de Q_o, a las materias primas o si bien existe contaminación en el proceso de elaboración, almacenamiento o transporte.

Si correlacionamos los valores obtenidos en este ensayo con los obtenidos en el ensayo de irritación primaria dérmica, observamos que el Q_oS produce gran irritación

en ambos ensayos, al igual que el Alg14000 y sus respectivos CPE. Por otra parte, el Alg3500 y sus respectivos CPE mostraron bajo potencial de irritación, similares a los del control.

Tabla 5.5. Puntajes de Irritación Promedio de los <i>Films</i> , n=2				
Extractos	Eritema	Edema	Puntaje de Irritación	Interpretación
Q ₀ R-LA	0,17 ± 0,24	0,17 ± 0,24	0,33 ± 0,47	No irritante
Q ₀ S-LA	1,17 ± 0,71	1,33 ± 0,94	2,50 ± 1,65	Medianamente irritante
Alg3500	0	0	0	No irritante
Alg14000	0,67 ± 0,94	0,33 ± 0,47	1,00 ± 1,41	No irritante
Q ₀ R-LA / Alg3500	0,17 ± 0,24	0	0,17 ± 0,24	No irritante
Q ₀ S-LA / Alg3500	0	0	0	No irritante
Control (Suero Salino 0,9%)	0	0	0	No irritante

Cabe destacar que luego del proceso de esterilización al que fueron sometidos los *films* (70°C durante 48 horas), las reacciones de irritación fueron menores que las obtenidas en el ensayo de irritación primaria, lo que reafirmaría la hipótesis de la existencia de contaminación en las materias primas o en los procesos de fabricación de los *films*.

Los *films* ensayados poseen propiedades irritantes que imposibilitan su uso en voluntarios humanos para los ensayos destinados a la evaluación de la renovación celular de la piel propuesto en el anteproyecto de esta memoria de título. Se propone realizar pruebas de la calidad de la materia prima y revisión de los procesos de fabricación y almacenamiento.

Khan et al. (2000) realizaron un ensayo intracutáneo de manera similar al realizado en nuestro estudio y con Q₀ obtenido de la compañía Sigma – Aldrich, en el que encontraron que el Puntaje de Irritación Promedio del Q₀S en ácido láctico era de 0,5, el que es similar al obtenido para Q₀R-LA pero mucho menor al Q₀S-LA ensayado en nuestro trabajo.

5.8. Protocolo de Evaluación de la Tasa de Descamación del Estrato Córneo

Como se mencionó en las secciones 5.6 y 5.7, los *films* estudiados tuvieron potenciales irritantes que hacen incompatible su uso en humanos, por lo tanto fue imposible desarrollar la evaluación de la tasa de descamación del estrato córneo. Sin embargo,

se propuso un protocolo para la posterior realización del ensayo, el que se justificará en los siguientes párrafos.

Este ensayo se realizaría con un panel de voluntarios sanos y consistiría en aplicar una solución de dihidroxiacetona (DHA) en la zona del antebrazo de los voluntarios. Este compuesto es un colorante epidérmico que desaparece luego del recambio total del estrato córneo, capa superficial de la epidermis [PUCCETTI & LEBLANC, 2000].

En individuos jóvenes, la renovación del estrato córneo tarda alrededor de 20 días y en adultos mayores, más de 30 días, lo cual es un índice de la velocidad de proliferación de las células epidérmicas. Debido a que el número de capas de corneocitos no cambia con la edad, estos datos indican que el aumento del tiempo de recambio del estrato córneo es un reflejo de la disminución de la proliferación celular epidérmica. Análisis adicionales indican que la disminución del recambio celular epidérmico puede no ocurrir a una tasa constante durante la vida adulta, pero sí se mantiene relativamente constante en jóvenes y comienza a caer dramáticamente luego de los 50 años [GROVE & KLIGMAN, 1989].

La técnica del cloruro de dansilo aplicada a la medición de descamación del estrato córneo propuesta por Jansen et al. (1974) corresponde a la técnica estándar para este tipo de mediciones. Se piensa que el cloruro de dansilo se une irreversiblemente y covalentemente a los corneocitos del estrato córneo, sin embargo, persiste la duda si es que el decaimiento de la fluorescencia observada mide la remoción del cloruro de dansilo desde los corneocitos en vez de la eliminación de los corneocitos marcados. En adición, el nivel de fluorescencia es frecuentemente difícil de evaluar porque desaparece de forma dispar, es persistente en los folículos pilosos y existe dificultad en la evaluación visual. Desde el lado clínico, la dermatitis de contacto e incluso reacciones sistémicas han sido reportadas en la literatura, como resultado a la exposición de cloruro de dansilo [COWEN ET AL., 2001].

Por estas razones, se han propuesto la técnica de la DHA. Este compuesto es utilizado en autobronceantes debido a que cambia a café el tono de la piel, reacción que surge de la interacción del DHA con los aminoácidos de la piel. Datos publicados indican que el DHA penetra a través del estrato córneo, posiblemente alcanzando capas del estrato granuloso y se une a la piel formando un complejo DHA – piel. Debido a que este complejo es parte integral de la superficie de la piel, su sustentividad está sólo limitada

por su descamación natural o por remoción física de los corneocitos. Adicionalmente, el DHA se considera no tóxico porque no alcanza las células viables donde reacciones sistémicas y de sensibilización pueden ocurrir. Sin embargo, la formación y decaimiento del color visible de la tinción con DHA son dependientes de los detalles de preparación del DHA, su aplicación, el sujeto y la condición de la piel [FOREST ET AL., 2003].

El ensayo propuesto entonces utilizaría una modificación a la técnica clásica de Jansen, utilizando DHA en vez de cloruro de dansilo. Por otra parte, se realizaría una segunda modificación que aparece en un estudio realizado por Ridge et al. (1988), donde demostró la necesidad de 'activar' previamente la zona de estudio con el material a ensayar. Para su estudio, utilizó un agente hipomitótico (acetónida de triamcinolona) y un agente hipermitótico (propionato de retinilo), en el que se investigó la relación entre la actividad mitótica epidérmica y el tiempo de recambio del estrato córneo de piel tratada usando la técnica de tinción con cloruro de dansilo. El tratamiento con la crema base resultó en una reducción del tiempo de recambio comparado con un sitio control no tratado. El incremento predicho en el tiempo de recambio con el agente hipomitótico y la reducción con el agente hipermitótico fue sólo observado cuando se comenzó el tratamiento dos semanas antes y se continuó luego de la tinción con cloruro de dansilo y no cuando el tratamiento comenzó luego de la tinción. Estos resultados indican que para usar métodos de recambio para demostrar cambios en la actividad mitótica debidos a tratamientos tópicos, es necesario pre – tratar la piel con el material a ensayar para establecer un equilibrio epidérmico completo al cambio del estado mitótico antes de marcar con el colorante.

6. CONCLUSIONES

Los Q_0 estudiados presentaron diferencias significativas en sus comportamientos. De este trabajo se puede concluir que los *films* de Q_0 provenientes de cangrejo (Q_0R) son más resistentes, flexibles y bioadhesivos que los de Q_0 de camarón (Q_0R). Sin embargo, estos últimos son más permeables y menos irritantes que los de Q_0S . Las diferencias encontradas se deberían a que los sitios de desacetilación serían distintos y a las diferencias en la estructura microscópica. Es necesario el tratamiento de los *films* con hidróxido de sodio para conferirles un pH compatible con la piel humana. El tratamiento con hidróxido de sodio los hace insolubles en agua y les confiere una estructura microscópica más densa y compacta que los hace más resistentes y menos flexibles.

Los *films* de Alg de distintos pesos moleculares también exhibieron comportamientos distintos. Los de menor peso molecular, Alg3500 son más flexibles pero menos resistentes, bioadhesivos, permeables e irritantes que los de mayor peso molecular (Alg14000).

Los *films* de complejo CPEQA formados por Q_0R y Q_0S con Alg3500 preparados mediante coagulación líquida, no presentan adecuada resistencia mecánica. Si bien el Q_0 y el Alg tienen una microestructura fibrosa similar, el CPEQA formado por la interacción electrostática entre el residuo de glucosamina del Q_0 y el grupo carboxilato del Alg produciría una estructura altamente compacta que aumentaría la rigidez en relación con el Q_0 y Alg solos. Además, los *films* de CPEQA presentan menores propiedades de bioadhesión en comparación con el Q_0 sólo lo que se debió a la neutralización de las cargas positivas del Q_0 por parte del Alg.

Tanto el Q_0 como el CPEQA provocan irritación dérmica primaria e intracutánea baja a mediana. Se hace necesario establecer si el potencial irritativo es intrínseco a la molécula de Q_0 o bien existió contaminación en las materias primas en el proceso de fabricación o almacenamiento. No es posible evaluar la capacidad de regeneración del estrato córneo hasta no disminuir el potencial irritativo de los *films*.

Los *films* de Q_0 , Alg y de CPEQA presentaron propiedades fisicoquímicas y biológicas diferentes, sin embargo, todos presentaron una adecuada permeabilidad para ser utilizados como apósitos debido a que garantizan la mantención de un ambiente

húmedo. Los *films* de Q_o y Alg mostraron buenas propiedades mecánicas, necesarias para la producción de apósitos, sin embargo, los de CPEQA no las presentaron, por lo que habría que estudiar nuevos métodos de manufactura, como por ejemplo, el método de dos láminas, para la combinación de estos polímeros, puesto que su unión resultaría ventajosa.

7. BIBLIOGRAFÍA

ANDRADES, P., SEPÚLVEDA, S., GONZÁLEZ, J. Curación avanzada de heridas. Rev Chilena de Cirugía, 56(4):396-403, 2004.

ASTM D 5458-95. Standard test method for peel cling of stretch wrap film. American Society for Testing and Materials, Estados Unidos. 8 pp, 2001.

ASTM F 719-81. Standard practice for testing biomaterials in rabbits for primary skin irritation. American Society for Testing and Materials, Estados Unidos. 178-179 pp, 1998.

ASTM F 2103-01. Standard guide for characterization and testing of chitosan salts as starting materials intended for use in biomedical and tissue-engineered medical product applications. American Society for Testing and Materials, Estados Unidos. 8pp. 2001.

AYDINLI, M., TUTAS, M., BOZDEMIR, A. Mechanical and light transmittance properties of locust bean gum based edible films. Turk J Chem, 28:163-171, 2004.

BECKER, T., KIPKE, D., BRANDON, T. Calcium alginate gel: a biocompatible and mechanically estable polymer for endovascular embolization. J Biomed Mater Res, 54(1):76-86, 2001.

BEGIN, A., VAN CALSTEREN, M. Antimicrobial films produced from chitosan. Int J Biol Macromol, 26(1):63-67, 1999.

BERGER, J., REIST, M., MAYER, J., FELT, O., PEPPAS, N., GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. Eur J Pharm Biopharm, 57(1):19-34, 2004.

BOWLER, P., DUERDEN, B., ARMSTRONG, D. Wound microbiology and associated approaches to wound management. Clin Microbiol Rev, 14(2):244-269, 2001.

CERVERA, M., HEINAMAKI, J., KROGARS, K., JORGENSEN, A., KARJALAINEN, M., COLARTE, A., YLIRUUSI, J. Solid-State and mechanical properties of aqueous chitosan – amylose starch films plasticized with polyols. AAPS PharmSciTech, 5(1):E15, 2004.

COWEN, J., IMHOF, R., XIAO, P. Opto-thermal measurement of stratum corneum renewal time. Analytical Sciences, 17(s4):s353-s356, 2001.

CHATELET, C., DAMOUR, O., DOMARD, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. Biomaterials, 22(3):261-268, 2001.

CHENITE, A., CHAPUT, C., WANG, D., COMBES, C., BUSCHMANN, M., HOEMANN, C., LEROUX, J., ATKINSON, B., BINETTE, F., SELMANI, A. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. Biomaterials, 21(21):2155-2161, 2000.

CHERIT, M., ÓRDENES, L., VÁSQUEZ, M. Plan de negocios para la implementación de una planta de extracción de alginato en la IV región. Seminario de título ingeniero comercial, mención administración. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Económicas y Administrativas, 2005.

DHANIKULA, A., PANCHAGNULA, R. Development and characterization of biodegradable chitosan films for local delivery of paclitaxel. AAPS J, 6(3):E27, 2004.

DOYLE, J., ROTH, T., SMITH, R., LI, Y., DUNN, R. Effects of calcium alginate on cellular wound healing processes modeled in vitro. J Biomed Mater Res, 32(4):561-568, 1996.

DYKES, P., HEGGIE, R. The link between the peel force of adhesive dressings and subjective discomfort in volunteer subjects. J Wound Care, 12(7):260-262, 2003.

DYKES, P., HEGGIE, R., HILL, S. Effects of adhesive dressings on the stratum corneum of the skin. J Wound Care, 10(2):7-10, 2001.

FERRADA, R. Lesiones Térmicas. En su: Trauma. Sociedad Panamericana de Trauma. Feriva, Cali, 1997.

FLOREZ, JESÚS. Farmacología Humana. 3ra Edición. Masson Editores, Barcelona, España, 2001.

FOREST, S., GROTHAUS, J., ERTEL, K., RADER, C., PLANTE, J. Fluorescence spectral imaging of dihydroxyacetone on skin in vivo. Photochem Photobiol, 77(5):524-530, 2003.

GILCHRIST, T., MARTIN, A. Wound treatment with sorban, an alginate fibre dressing. Biomaterials, 4(4):317-320, 1983.

GOMBOTZ, W., WEE, S. Protein release from alginate matrices. Adv Drug Del Rev, 31(3):267-285, 1998.

GROVE, G., KLIGMAN, A. Age-associated changes in human epidermal cell renewal. J Gerontol, 38(2):137-42, 1983.

HU, Y., TOPOLKARAEV, V., HILTNER, A., BAER, E. Measurement of water vapor transmission rate in highly permeable films. J Appl Polym Sci, 81(7):1624-1633, 2001.

ISHIHARA, M. Photocrosslinkable chitosan hydrogel as a wound dressing and biological adhesive. Trends Glycosci Glycotechnol, 14(80):331-341, 2002.

JAGUR-GRODZINSKI, J. Biomedical application of functional polymers. React Funct Polym, 39(2):99-138, 1999.

JANSEN, L., HOJYO-TOMOKO, M., KLIGMAN, A. Improved fluorescence staining technique for estimating turnover of the human stratum corneum. Br J Dermatol, 90(1):9-12, 1974.

KHAN, T., PEH, K., CH'NG, H. Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. J Pharm Pharmaceut Sci, 3(3):303-311, 2000.

KOJIMA, K., OKAMOTO, Y., KOJIMA, K., MIYATAKE, K., FUJISE, H., SHIGEMASA, Y., MINAMI, S. Effects of chitin and chitosan on collagen synthesis in wound healing. J Vet Med Sci, 66(12):1595-1598, 2004.

KRISTIANSEN, A., VARUM, K., GRASDALEN, H. The interactions between highly de-N-acetylated chitosans and lysozyme from chicken egg white studied by ¹H-NMR spectroscopy. Eur J Biochem, 251(1-2):335-342, 1998.

KUMAR, T., PAUL, W., SHARMA, C., KURIACHAN, M. Bioadhesive, pH responsive micromatrix for oral delivery of insulin. Trends Biomater Artif Organs, 18(2):198-202, 2005.

LEE, J., PARK, J., ROBINSON, J. Bioadhesive-based dosage forms: the next generation. J Pharm Sci, 89(7):850-866, 2000.

LOKE, W., LAU, S., YONG, L., KHOR, E., SUM, C. Wound dressing with sustained anti-microbial capability. J Biomed Mater Res, 53(1):8-17, 2000.

LLOYD, L., KENNEDY, J., METHACANON, P., PATERSON, M., KNILL, C. Carbohydrate polymers as wound management aids. Carbohydr Polym, 37(3):315-322, 1998.

MAJETI, N.V., KUMAR, R. A review of chitin and chitosan applications. Reactive & Functional Polymers, 46(1):1-27, 2000.

MARTIN, Alfred. Physical pharmacy: Physical chemical principles in the pharmaceutical sciences. Cuarta Edición. Estados Unidos de Norteamérica, Lippincott Williams & Wilkins, 1993. 623pp.

MIDDELKOOP, E., BOGAERDT, A., LAMME, E., HOEKSTRA M., BRANDSMA, K., ULRICH, M. Porcine wound models for skin substitution and burn treatment. Biomaterials, 25(9):1559-1567, 2003.

MINGHETTI, P., CILURZO, F., TOSI, L., CASIRAGHI, A., MONTANARI, L. Design of a new water-soluble pressure-sensitive adhesive for patch preparation. AAPS PharmSciTech, 4(1):E8, 2003.

- MIRANDA, P., GARNICA, O., LARA-SAGAHON, V., CARDENAS, G. Water vapor permeability and mechanical properties of chitosan composite films. J Chil Chem Soc, 49(2):173-178, 2004.
- MOTTA, G. Calcium alginate topical wound dressing: a new dimension in the cost-effective treatment for exudating dermal wounds and pressure sores. Ostomy Wound Manage, 25:52-56, 1989.
- MORI, T., MURAKAMI, M., OKUMURA, M., KADOSAWA, T., UEDE, T., FUJINAGA, T. Mechanism of macrophage activation by chitin derivatives. J Vet Med Sci, 67(1):51-56, 2005.
- MORIMOTO, M., HIROYUKI, S., SHIGEMASA, Y. Control of functions of chitin and chitosan by chemical modification. Trends Glycosci Glycotechnol, 14(78):205-222, 2002.
- MUZZARELLI, R., TARSI, R., FILIPPINI, O., GIOVANETTI, E., BIAGINI, G., VARALDO, P. Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitosan. Antimicrob Agents Chemother, 34(10):2019-2023, 1990.
- NINAN, L., MONAHAN, J., STROSHINE, R., WILKER, J., SHI, R. Adhesive strength of marine mussel extracts on porcine skin. Biomaterials, 24(22):4091-4099, 2003.
- NORMA CHILENA OFICIAL NCh2098.Of2000. Películas de recubrimiento orgánico – Determinación de la transmisión de vapor de agua. pp. 13, 2000.
- NORMA CHILENA OFICIAL NCh1151.Of76. Láminas y películas plásticas – Determinación de las propiedades de tracción. pp. 13, 1999.
- ODELL, E., OADES, P., LOMBARDI, T. Symptomatic foreign body reaction to haemostatic alginate. Br J Oral Maxillofac Surg, 32(2):178-179, 1994.
- PAUL, W., SHARMA, C. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. Trends Biomater Artif Organs, 18(1):18-23, 2004.
- PILLAY, V., FASSIHI, R. In vitro release modulation from crosslinked pellets for site-specific drug delivery to the gastrointestinal tract. II. Physicochemical characterization of calcium-alginate, calcium-pectinate and calcium-alginate-pectinate pellets. J Control Release, 59(2):243-256, 1999.
- PUC CETTI, G., LEBLANC, R. A Sunscreen–Tanning Compromise: 3D Visualization of the Actions of Titanium Dioxide Particles and Dihydroxyacetone on Human Epidermis. Photochem Photobiol, 71(4):426–430, 2000.
- PUSATERI, A., McCARTHY, S., GREGORY, K., HARRIS, R., CARDENAS, L., McMANUS, A., GOODWIN, C. Effect of a chitosan-based hemostatic dressing on blood loss and survival in a model of severe venous hemorrhage and hepatic injury in swine. J Trauma, 54(1):177-182, 2003.

RIDGE, B., BATT, M., PALMER, H., JARRETT, A. The dansyl chloride technique for stratum corneum renewal as an indicator of changes in epidermal mitotic activity following topical treatment. Br J Dermatol, 118(2):167-174, 1988.

RINAUDO, M., MILAS, M., LE DUNG, P. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. Int J Macromol, 15(5):281-285, 1993.

RITTHIDEJ, G., PHAECHAMUD, T., KOIZUMI, T. Moist heat treatment on physicochemical change of chitosan salt films. Int J of Pharm, 232(1-2):11-22, 2002.

RODRÍGUEZ, I., CEREZO, A., SALEM, I. Sistemas de liberación bioadhesivos. Ars Pharmaceutica, 41(1):115-128, 2000.

SCHATZ, C., LUCAS, J., VITON, C., DOMARD, A., PICHOT, C., DELAIR. Formation and properties of positively charged colloid based on polyelectrolyte complexes of biopolymers. Langmuir, 20(18):7766-7778, 2004.

SEGAL, H., HUNT, B., GILDING, K. The effects of alginate and non-alginate wound dressings on blood coagulation and platelet activation. J Biomater Appl, 12(3):249-257, 1998.

SHEPHERD, R., READER, S., FALSHAW, A. Chitosan functional properties. Glycoconj J, 14(4):535-542, 1997.

SIBBALD, G., WILLIAMSON, D., ORSTED, H., CAMPBELL, K., KEAST, D., KRASNER, D., SIBBALD, D. Preparing the wound bed – debridement, bacterial balance, and moisture balance. Ostomy Wound Manage, 46(11):14-35, 2000.

SKOOG, D., LEARY, J. Análisis instrumental. Cuarta edición. Estados Unidos de Norteamérica, McGraw-Hill, 1994, 935 pp.

SONG, R., CHIANG, M., CROSBY, A., KARIM, A., AMIS, E., EIDELMAN, N. Combinatorial peel tests for the characterization of adhesion behavior of polymeric films. Polymers, 46:1643-1652, 2005.

STASHAK, T., FARSTVEDT, E., OTHIC, A. Update on wound dressings: indications and best use. Clin Tech Equine Pract, 3(2):148-163, 2004.

SULLIVAN, T., EAGLSTEIN, W., DAVIS, S., MERTZ, P. The pig as a model for human wound healing. Wound Repair Regen, 9(2):66-76, 2001.

THOMAS, A., HARDING, K., MOORE, K. Alginates from wound dressing activate human macrophages to secrete tumour necrosis factor-alpha. Biomaterials, 21(17):1797-1802, 2000.

UENO, H., MORI, T., FUJINAGA, T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. Adv Drug Deliv Rev, 52(2):105-115, 2001.

UNITED STATES PHARMACOPEIA XXIV, USP XXIV. The United States Pharmacopoeial Convention, Estados Unidos, pp. 1834 – 1835, 2000.

URIBE Muñoz, Nelson Orlando. Preparación y caracterización de films de quitosano útiles como apósitos en el tratamiento de quemaduras. Memoria para optar al título de químico farmacéutico. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2003. 37 h.

WALTERS, K. Dermatological and Transdermal Formulations. Estados Unidos, 2002.

WANG, L., KHOR, E., LIM, L. Chitosan-alginate-CaCl₂ system for membrane coat application. J Pharm Sci, 90(8):1134-1142, 2001.

WANG, L., KHOR, E., WEE, A., LIM, L. Chitosan-alginate PEC membrane as a wound dressing: Assessment of incisional wound healing. J Biomed Mater Res, 63(5):610-618, 2002.

WANG, L., SHELTON, R., COOPER, P., LAWSON, M., TRIFFITT, J., BARRALET, J. Evaluation of sodium alginate for bone marrow cell tissue engineering. Biomaterials, 24(20):3475-3481, 2003.

WILES, J., VERGANO, P., BARRON, F., BUNN, J., TESTIN, R. Water vapor transmission rates and sorption behavior of chitosan films. J Food Sci, 65(7):1175-1179, 2000.

YAN, X., KHOR, E., Lim L. Chitosan-alginate films prepared with chitosans of different molecular weights. J Biomed Mater Res, 58(4):358-65, 2001.

7.1. RECURSOS EN LÍNEA

3M HEALTH CARE. Apósitos Tegaderm® Estándar
<<http://www.3m.com/>> [consulta: 17 de Octubre de 2005]

COANIQUEM. Corporación de Ayuda al Niño Quemado
<<http://www.coaniquem.cl/>> [Consulta: 1 de junio de 2005]

COLOPLAST. Apósitos Comfeel® Plus
<<http://www.coloplast.com/>> [consulta: 17 de octubre de 2005]

FDA, U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Homepage.
<<http://www.fda.gov/>> [Consulta: 25 de julio de 2004]

GOBIERNO DE CHILE. Ministerio de Salud
<<http://www.minsal.cl/>> [Consulta: 16 de junio de 2005]

GOBIERNO DE CHILE. Servicio Nacional de Pesca
<<http://www.sernapesca.cl/>> [Consulta: 25 de junio de 2005]

GOBIERNO DE CHILE. Subsecretaria de Pesca
<<http://www.subpesca.cl/>> [Consulta: 25 de junio de 2005]

LLOYD INSTRUMENTS. Analizador de Texturas.
<<http://www.lloyd-instruments.com/>> [Consulta: 13 de mayo de 2005]

NIH. National Institute of Health of USA
<<http://www.nih.gov/>> [Consulta: 30 de julio de 2005]

RYMAR LTD. Rymar Homepage
<<http://www.rymar.cl/>> [Consulta: 10 de junio de 2005]

SIGMA-ALDRICH CO. Sigma-Aldrich Homepage
<http://www.sigmaaldrich.com/Local/SA_Splash.html> [Consulta: 1 de junio de 2005]

SMITH & NEPHEW. Apósitos Opsite® y Opsite® IV3000
<<http://wound.smith-nephew.com/us/Home.asp>> [consulta: 17 de Octubre de 2005]

8. ANEXOS

ANEXO 8.1: CLASIFICACIÓN DE APÓSITOS SEGÚN LA FDA*

Gasa/esponja no reabsorbible para uso externo: es un dispositivo estéril o no estéril destinado para propósitos médicos, tales como ser colocado directamente en la herida de un paciente con el fin de absorber el exudado. Consiste de una tira, pieza, o almohadilla hecho de una malla de algodón de celulosa tejido o no tejido o un derivado químico simple de la celulosa. Esta clasificación no incluye a los apósitos de Gasa/Esponja no reabsorbibles para uso externo que contengan drogas agregadas, por ejemplo agentes antimicrobianos, agentes biológicos agregados, por ejemplo factores de crecimiento, o que sus materiales constituyentes sean derivados de fuentes animales.

Apósito Hidrofílico: es un dispositivo estéril o no estéril destinado a cubrir una herida y absorber el exudado. Consiste de materiales no reabsorbibles con propiedades hidrofílicas que son capaces de absorber el exudado (por ejemplo, algodón, derivados del algodón, alginatos, dextrano y rayón). Esta clasificación no incluye a los apósitos hidrofílicos que contengan drogas agregadas, por ejemplo agentes antimicrobianos, agentes biológicos agregados, por ejemplo factores de crecimiento, o que sus materiales constituyentes sean derivados de fuentes animales.

Apósito Oclusivo: es un dispositivo no reabsorbible, estéril o no estéril destinado para cubrir una herida, proveer o soportar un ambiente húmedo de la herida, y permitir el intercambio de gases como el oxígeno y el vapor de agua a través del dispositivo. Consiste de una pieza de material polimérico sintético, como el poliuretano, con o sin adhesivos. Esta clasificación no incluye a los apósitos oclusivos que contengan drogas agregadas como agentes antimicrobianos, agentes biológicos agregados como factores de crecimiento, o que sus materiales constituyentes sean derivados de fuentes animales.

Apósito de Hidrogel y para Quemaduras: es un dispositivo estéril o no estéril destinado para cubrir una herida, absorber el exudado, controlar la pérdida de sangre o fluidos y proteger contra la abrasión, fricción, desecación y contaminación. Consiste de una matriz no reabsorbible hecha de polímeros hidrofílicos o de otros materiales en combinación con agua (al menos un 50%) y capaz de absorber el exudado. Esta clasificación no incluye a los apósitos de hidrogeles que contengan drogas agregadas como agentes antimicrobianos, agentes biológicos agregados como factores de crecimiento, o que sus materiales constituyentes sean derivados de fuentes animales.

***Fuente:** *Food and Drug Administration (FDA), Department of Health and Human Services, EE.UU.*

21 CFR Part 878, 1999

General and Plastic Surgery Devices

Classification of the Nonresorbable Gauze / sponge for External Use, the Hydrophilic wound Dressing, the Occlusive Wound Dressing, and the Hydrogel Wound Dressing.

ANEXO 8.2. SITUACIÓN NACIONAL DE ACCIDENTES POR QUEMADURAS EN LA POBLACIÓN INFANTIL

En Chile, cada año se ven afectas alrededor de 250.000 personas por quemaduras que requieren algún grado de atención médica, de estos, el 40% corresponde a niños menores de 15 años, constituyendo así el segmento de la población más afectado por estos accidentes. Más del 80% de los niños quemados tienen menos de 6 años y los accidentes en el 90% de los casos ocurren en el hogar, en presencia de un adulto y producto de derrames de líquidos calientes como principal causa. De los niños afectados por quemaduras, 10.000 requieren de rehabilitación, procesos largos (promedian 5 años) y costosos [COANIQUEM, CHILE, 2005]. En la tabla 8.1 se entregan las características de los accidentes por quemaduras en niños en Chile.

TABLA 8.1. Características de los Accidentes por Quemaduras en Niños		
Características	Parámetros	Porcentaje
Edad (años)	0 – 2	37
	2 – 6	46
	7 y más	17
Sexo	Masculino	52,4
	Femenino	47,6
Agente Causal	Líquidos Calientes	60
	Objetos Calientes	28
	Fuego – Brasas	6
	Electricidad	3
	Otros	3
Localización	Múltiples	33
	Extremidades Superiores	37
	Extremidades Inferiores	7
	Tórax – Abdomen	6
	Cara – Cuello – Cabeza	5
	Glúteos – Genitales	2
Lugar de Ocurrencia	Hogar	90
	Otros	10
Horas más Frecuentes	12:00 – 13:00	
	18:00 – 19:00	
Cantidad de Niños Quemados al Año	100.000	100
Casos que Requieren de Rehabilitación	10.000	10

ANEXO 8.3: SITUACIÓN DEL SECTOR PESQUERO Y QUITOSANO EN CHILE

En la tabla 8.2 se muestra el desembarque total y de crustáceos en Chile durante el periodo comprendido entre el año 2000 y el 2003 de acuerdo con las cifras entregadas por el Servicio Nacional de Pesca, organismo dependiente del Gobierno de Chile.

TABLA 8.2. Desembarque Total y de Crustáceos en Chile durante el Periodo 2000 – 2003 (en toneladas)

DESEMBARQUE	2000	2001	2002	2003
Total País	4972263	4663433	5132741	4528503
Total Crustáceos	37311	26109	23812	19096
% Crustáceos	0,75	0,56	0,46	0,42

A nivel mundial, los desembarques del sector pesquero nacional tienen un sitio destacado. Ellos, según FAO alcanzaron su máximo histórico en 1994, donde se registraron 8,02 millones de toneladas desembarcadas (4° a nivel mundial), para luego ir disminuyendo a un mínimo durante la década con 3,8 millones de toneladas en 1998. Con posterioridad, la tendencia ha sido hacia la recuperación, llegando a 4,5 millones de toneladas el año 2003, situándonos en el 7° lugar a nivel mundial, como ha venido ocurriendo en los últimos 3 años y lo que significa adicionalmente el 3,1% del total mundial desembarcado. En lo relativo al comercio y más particularmente las exportaciones, Chile también mantiene una posición privilegiada en el escenario mundial, valorando sus exportaciones durante el año 2003 en US\$ 2.194 millones, lo que representa el 3,3% del total mundial. Pese a la tendencia a la baja presentada por los desembarques, la valoración de las exportaciones ha sabido mantenerse a través de los años, llegando a su máximo en el año 2004 por US\$ 2.579 millones, lo que corresponde a un máximo histórico para el sector [SUBSECRETARIA DE PESCA, GOBIERNO DE CHILE, 2005].

En Chile existen una gran cantidad de crustáceos que pueden ser utilizados como fuentes potenciales para la obtención de quitosano. Estas especies, junto con su nombre común se encuentran en la tabla 8.3 [servicio nacional de pesca, gobierno de chile, 2005].

TABLA 8.3. Especies de Crustáceos en Chile

Nombre Común	Nombre Científico	Nombre Común	Nombre Científico
Camarón nailon	<i>Heterocarpus reedi</i>	Jaiba panchote	<i>Taliepus dentatus</i>
Camarón navaja	<i>Campylonotus semistriatus</i>	Jaiba patuda	<i>Taliepus marginatus</i>
Camarón de río del norte	<i>Cryphiops caementarius</i>	Jaiba peluda	<i>Cancer setosus</i>
Camarón ecuatoriano	<i>Penaeus vannamei</i>	Jaiba reina	<i>Cancer coronatus</i>
Cangrejo dorado de J. Fernández	<i>Chaceon chilensis</i>	Jaiba remadora	<i>Ovalipes Trimaculatus</i>
Centolla	<i>Lithodes santolla</i>	Krill	<i>Euphausia superba</i>
Centolla del norte	<i>Lithodes spp.</i>	Langosta de I. Pascua	<i>Panulirus pascuensis</i>
Centollón	<i>Paralomis granulosa</i>	Langosta de J. Fernández	<i>Jasus frontalis</i>
Centollón del norte	<i>Paralomis spp.</i>	Langosta australiana	<i>Cherax tenuimanus</i>
Gamba	<i>Haliporoides diomedea</i>	Langosta enana	<i>Projasus bahamondei</i>
Jaiba	<i>Cancer spp.</i>	Langostino amarillo	<i>Cervimunida johni</i>
Jaiba limón	<i>Cancer porteri</i>	Langostino enano	<i>Pleuroncodes sp.</i>
Jaiba marmola	<i>Cancer edwardsi</i>	Langostino colorado	<i>Pleuroncodes monodon</i>
Jaiba mora	<i>Homalaspis plana</i>	Picoroco	<i>Austromegabalanus psittacus</i>

ANEXO 8.4. INDUSTRIA DEL ALGINATO EN CHILE*

Los principales polisacáridos recuperados de las algas son los alginatos, agares y carragenanos. Las algas usadas para la extracción de alginatos son diferentes en cada región. En las costas de Chile podemos encontrar tres géneros de algas pardas que poseen alginato en sus paredes, estas son: *Lessonia*, *Durvillea* y *Macrocystis* (tabla 8.4).

A nivel mundial la industria del alginato produce 36.000 toneladas aproximadamente alrededor de todo el mundo, en los lugares que sin duda se produce mas es en Europa y el sector Asia-Pacífico. Hay 8 grandes productores, cuatro productores principales en Europa y Estados Unidos; dos en Japón, unos más pequeños en Chile e Indonesia y probablemente otros 20 productores menos importantes, muchos de ellos ubicados en China.

Basándose en los datos de Prochile se vio que el flujo de compra y venta de Chile del Alginato en todos sus estados es de 701.867 Kg, esto se calculó sumando los datos de importación y exportación del año 2003. A nivel mundial la tasa total de crecimiento del alginato esta entre un 2% y un 3% anual. Los usos farmacéuticos y medicinales son aproximadamente el 20% del mercado y han estado al alza con un 2% a un 4% anual en su tasa de crecimiento, conducido por los continuados descubrimientos en realizaciones tecnológicas controladas y el uso de los alginatos en aplicaciones para el cuidado de heridas. Como se puede ver estas cifras son bastantes alentadoras para entrar a la industria e indican que el alginato es un producto muy utilizado a nivel mundial y Chile, al ser un país en vías de desarrollo, también lo irá introduciendo en sus procesos.

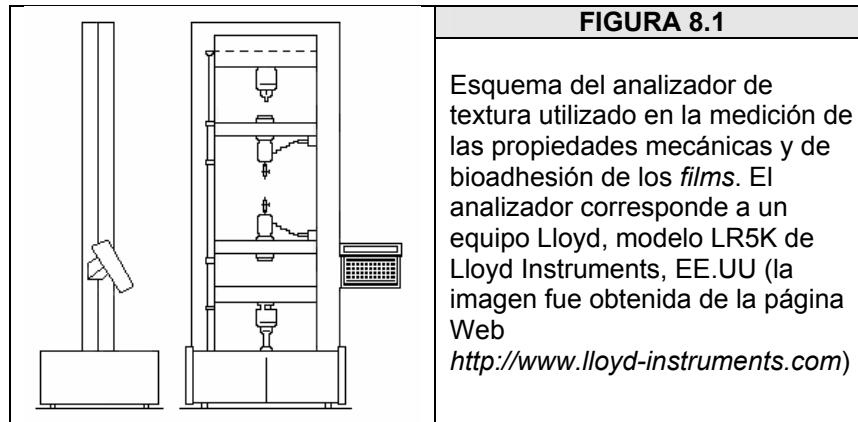
La situación actual del país es favorable debido a que Chile se está industrializando cada día más, además tiene una economía estable y positivos índices de crecimiento, sin dejar de nombrar los últimos tratados de libre comercio que se ha hecho con las potencias más grandes. A nivel nacional el único gran productor de Alginato es Kimitzu, esta empresa en un comienzo tenia sus plantas ubicadas en Japón e importaban las algas desde Chile para la extracción del alginato, después de un tiempo se instalaron con una planta en Paine con el fin de estar mas cerca de sus clientes a nivel Sudamericano y al mismo tiempo mas cerca del insumo principal para ahorrarse el costo en tiempo y de transporte. Ahora Kimitzu Chile se dedica solo a la exportación de algas y de alginato en sus distintos estados.

TABLA 8.4. Especies productoras de Alginato en Chile			
NOMBRE		NOMBRE	
COMÚN	CIENTÍFICO	COMÚN	CIENTÍFICO
Cochayuyo	<i>Durvillea antarctica</i>	Huiro	<i>Macrocystis spp.</i>
Chascón o huiro negro	<i>Lessonia nigrescens</i>	Huiro palo	<i>Lessonia trabeculata</i>

*FUENTE: - Mario Guevara Cherit. - Lorena Ordenes Beltrán. - Maria Ignacia Vásquez Núñez. "Plan de Negocios para la Implementación de una Planta de Extracción de Alginato en la IV Región". Ver bibliografía.

ANEXO 8.5. ESPECIFICACIONES DEL ANALIZADOR DE TEXTURA

En la figura 8.1 se diagrama el analizador de textura empleado para la medición de las propiedades mecánicas y de bioadhesión de los *films* poliméricos ensayados en nuestro estudio.



Las especificaciones de funcionamiento del analizador de texturas Lloyd, modelo LR5K se ingresaron en el software DAPMAT versión 3.0 que además de controlar el funcionamiento del analizador, se encarga del análisis de los datos obtenidos. En la tabla 8.5 se indican los parámetros que se deben ingresar y las opciones que se eligieron en cada caso.

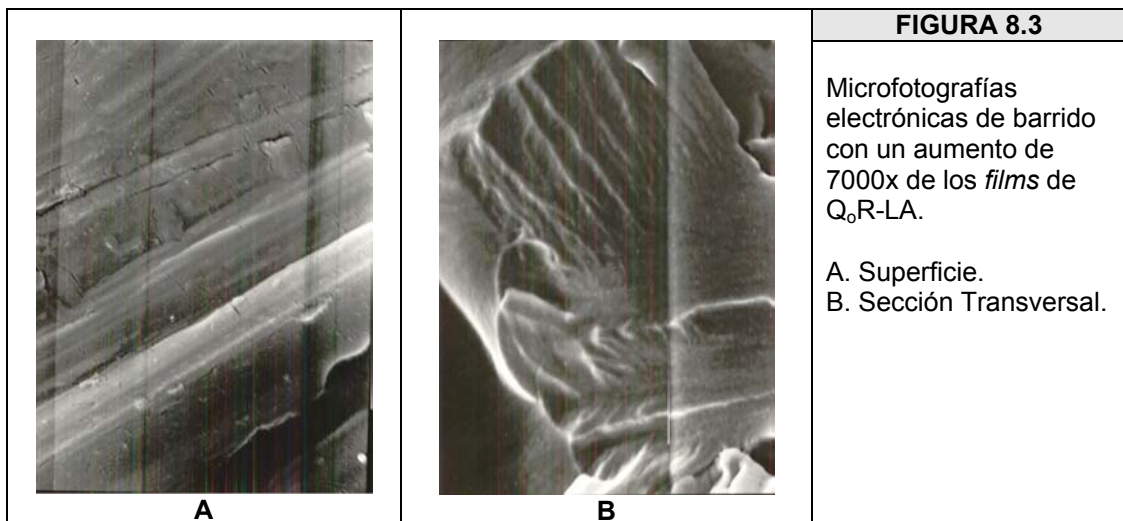
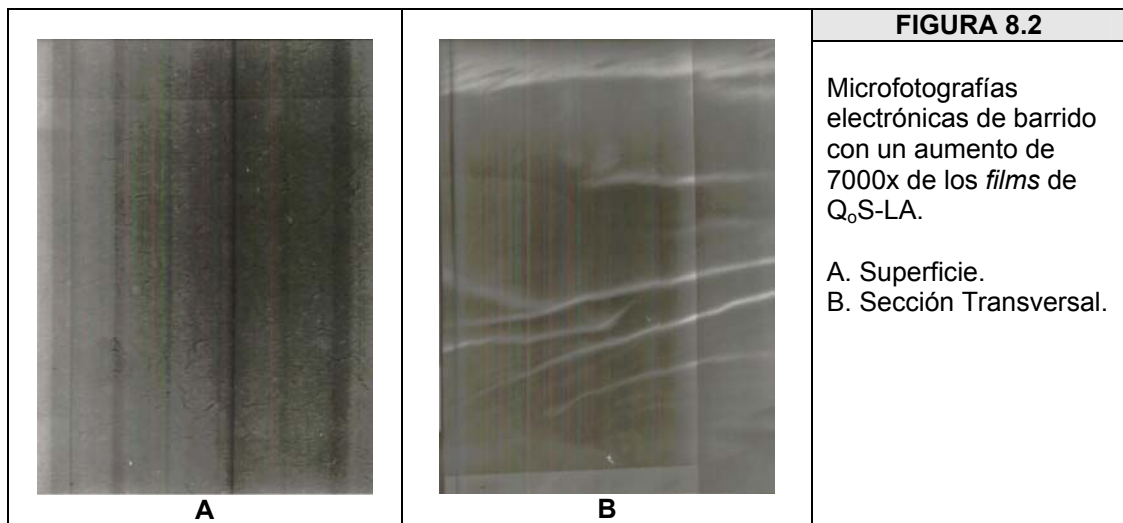
TABLA 8.5. Especificaciones del Software DAPMAT 3.0			
Parámetro	Opción Elegida	Parámetro	Opción Elegida
<i>Tension / Compression</i>	Tension	<i>Load Cell</i>	5 kN
<i>Load Axis</i>	50 N	<i>Cell Class</i>	0.5
<i>Extensión Axis</i>	30 mm	<i>Statistics</i>	No
<i>Exit Limit 1</i>	0,0000 mm	<i>Parameters</i>	No
<i>Exit Limit 2</i>	30 mm	<i>Remarks</i>	No
<i>Gauge Length 1</i>	25 mm	<i>Auto Zero</i>	Off
<i>Break Detector</i>	Automatic	<i>Auto Return</i>	On
<i>Extensometer</i>	Internal	<i>Toe-In</i>	Off
<i>Test Speed</i>	20 mm/min ^a	<i>Stiffness Comp</i>	Off
<i>Jog Speed</i>	100 mm/min	<i>Simple Type</i>	Strip (tear) ^b
<i>No Samples</i>	10	<i>Dimension Type</i>	Area
<i>Lower Head Limit</i>	200 mm		

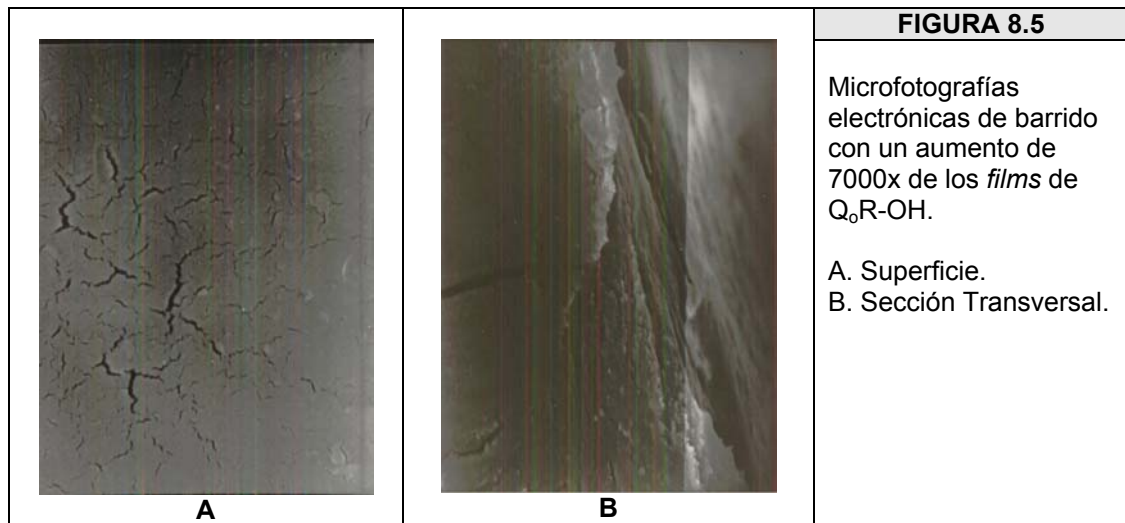
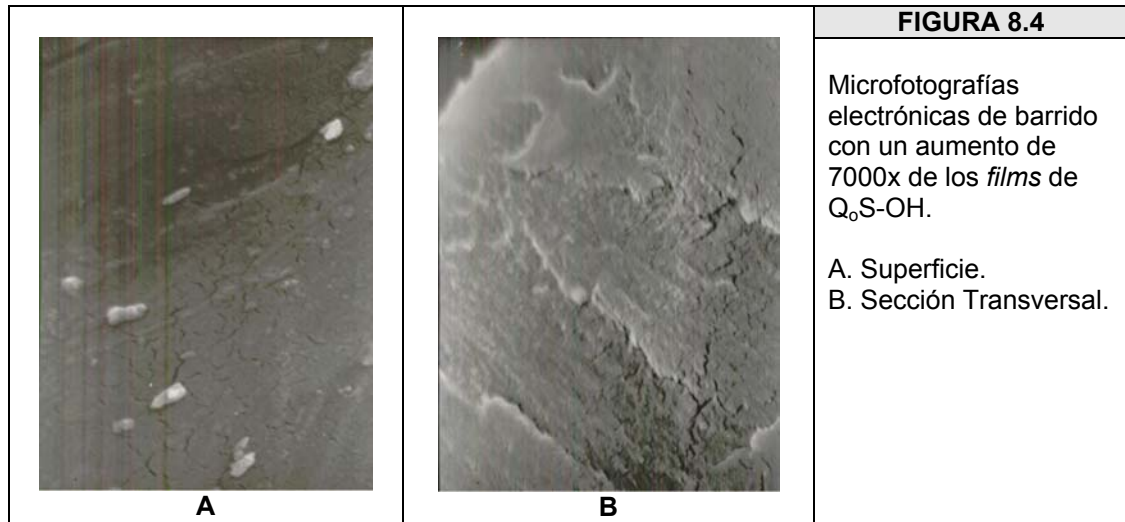
^a En los estudios de bioadhesión realizados se utilizó una velocidad de 5 mm/min.

^b En las pruebas de bioadhesión se utilizó la opción PEEL en lugar de STRIP.

ANEXO 8.6. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Las microfotografías que se muestran en las figuras 8.2, 8.3, 8.4 y 8.5 corresponden a las superficies y secciones transversales de los *films* de Q_o en ácido láctico, Q_oS-LA y Q_oR-LA y de los *films* tratados con NaOH, Q_oS-OH y Q_oR-OH respectivamente. Las microfotografías fueron tomadas con un microscopio electrónico de barrido [JEOL, MODELO JSM-25-SII, JAPÓN] con un aumento de 7000x.





En la figura 8.5 A se observan estrías en la superficie del *film* de Q₀R-OH, las que se produjeron debido a que el calor generado durante el funcionamiento del microscopio electrónico de barrido evaporó el agua del *film* provocando su ruptura en forma de quiebres o estrías. Entonces, este defecto aparente no guarda relación con la estructura real del *film*. Sin embargo, aun con las estriaciones es posible observar la estructura homogénea y compacta de la superficie del *film* de Q₀R-OH.

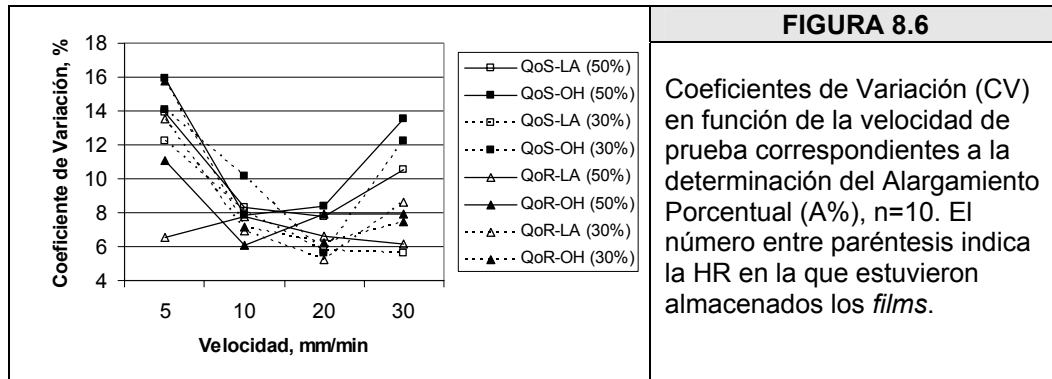
ANEXO 8.7. PROPIEDADES MECÁNICAS

La velocidad de ensayo de las pruebas mecánicas es un parámetro importante influencia de gran manera los resultados obtenidos. La NCh1151.Of76 especifica un rango de velocidades en los que se puede realizar el estudio pero no descarta la elección de otras velocidades de acuerdo al material a ensayar. En nuestro trabajo se probaron las velocidades típicas encontradas en ensayos mecánicos de *films* como los de Q_0 que son 5, 10, 20 y 30 mm/min. Del análisis de los datos obtenidos, se llegó a la conclusión que 20 mm/min era la mejor velocidad de prueba, debido a los mejores y mas precisos resultados, analizados desde el punto de vista del CV (ecuación 4.6).

En la tabla 8.6 se describen, como ejemplo, los promedios de los resultados del Alargamiento Porcentual (A%) de los *films* de Q_0 ensayados. Cada prueba se realizo con 10 *films* con medidas de 1 cm de ancho por 5 cm de largo y con un largo efectivo de prueba de 3 cm (los *films* se pusieron entre las pinzas con 1 cm de margen en cada una de ellas).

TABLA 8.6. Alargamiento Porcentual (A%) de los <i>Films</i> Promedio \pm Desviación Estándar (CV)				
Material Ensayado (n=10)	Velocidad, mm/min			
	5	10	20	30
Almacenamiento: 23°C y 30% HR				
Q_0 S-LA	11,15 \pm 1,36 (12,2)	26,34 \pm 2,12 (8,1)	39,37 \pm 2,28 (5,8)	36,65 \pm 2,06 (5,6)
Q_0 S-OH	8,76 \pm 1,23 (14,1)	17,75 \pm 1,81 (10,2)	31,46 \pm 1,76 (5,6)	32,39 \pm 3,97 (12,3)
Q_0 R-LA	7,49 \pm 1,02 (13,6)	12,57 \pm 0,87 (6,9)	23,76 \pm 1,24 (5,2)	26,85 \pm 2,32 (8,6)
Q_0 R-OH	3,58 \pm 0,57 (15,8)	8,53 \pm 0,61 (7,1)	15,55 \pm 0,97 (6,2)	13,73 \pm 1,02 (7,5)
Almacenamiento: 23°C y 50% HR				
Q_0 S-LA	32,76 \pm 4,57 (13,9)	43,34 \pm 3,61 (8,3)	48,29 \pm 3,73 (7,7)	48,21 \pm 5,08 (10,5)
Q_0 S-OH	25,88 \pm 4,13 (15,9)	28,02 \pm 2,21 (7,9)	37,21 \pm 3,13 (8,4)	31,69 \pm 4,30 (13,5)
Q_0 R-LA	25,57 \pm 1,68 (6,6)	29,21 \pm 2,26 (7,8)	37,24 \pm 5,08 (6,6)	33,78 \pm 2,07 (6,1)
Q_0 R-OH	10,31 \pm 1,14 (11,0)	16,24 \pm 0,99 (6,1)	28,78 \pm 2,29 (7,9)	22,47 \pm 1,78 (7,9)

En la figura 8.6 se puede apreciar que los CV de la determinación del Alargamiento Porcentual (A%) obtenidos a una velocidad de prueba de 20 mm/min son menores a aquellos obtenidos a otras velocidades.



Por otra parte, un estudio realizado por Wiles et al. (2000) demostró que los *films* de Q₀, fuertemente hidrofílicos, absorben humedad en cantidades significativamente distintas de acuerdo con las condiciones de HR de almacenamiento: *films* almacenados a 53% HR absorben un 60% más de agua que los *films* almacenados a 33% HR. Este vapor de agua actúa como plastificante al interior de la matriz de los *films* de Q₀ aumentando su flexibilidad. Por esta razón era importante establecer las condiciones de almacenamiento. Se analizó entonces el comportamiento de los *films* de Q₀ almacenados a 30% HR (desecador con sílica gel) y de los almacenados a 50% de HR (sala con humedad controlada por acondicionador de aire). El análisis de los resultados indicó que los *films* de Q₀ almacenados a 50% HR tuvieron siempre mayores A%, y por lo tanto flexibilidad, que sus contrapartes almacenadas a 30% HR. Por esta razón se eligió la condición de almacenamiento de 23°C y 50% de HR para todos los *films* a ensayar, pensando también que los *films* están destinados al uso como apósito en el tratamiento de las quemaduras, las que frecuentemente presentan exudados y por lo tanto, creando un ambiente de mayor humedad. Esta hipótesis se vio reafirmada en el hecho que los *films* almacenados a menor humedad (30% HR) presentaron siempre espesores promedio menores a los almacenados a 50% HR (tabla 8.7).

TABLA 8.7. Espesor de los *Films* de Quitosano Almacenados a 30 y 50% HR

Muestra de Q ₀	Espesor, μm (23°C; 30% HR)	Espesor, μm (23°C; 50% HR)
Q ₀ R-LA	24,9 ± 0,67	29,5 ± 0,76
Q ₀ R-OH	34,1 ± 1,62	39,8 ± 1,24
Q ₀ S-LA	25,1 ± 0,79	30,0 ± 0,79
Q ₀ S-OH	33,4 ± 1,39	40,1 ± 1,39

ANEXO 8.8. PROPIEDADES DE BIOADHESIÓN

De forma similar a las razones expuestas en el anexo 8.7, la elección de la velocidad de prueba para los ensayos de bioadhesión se hizo basándose en el análisis del CV de los resultados obtenidos a varias velocidades de ensayo. Al igual que en los ensayos mecánicos, la ASTM D 5458-95 no entrega valores específicos de la velocidad. Por otra parte, en la literatura se menciona que el tiempo de contacto entre el bioadhesivo y la superficie biológica es un factor ambiental importante debido a que determina el grado de hinchamiento y de interpenetración de las cadenas poliméricas [LEE ET AL., 2000]. En el presente estudio, las velocidades menores de prueba aumentaron el tiempo de contacto entre el Q_0 y la piel de cerdo lo que aumento el hinchamiento y la interpenetración de las cadenas poliméricas aumentando las fuerzas bioadhesivas, lo que se vio reflejado en el aumento significativo de la $F_{m\acute{a}x}$ y el T_{des} . Por estas razones se eligió la velocidad de 5 mm/min para realizar todas las pruebas de bioadhesión,

En este caso, las condiciones de almacenamiento son importantes porque el grado de hinchamiento de las cadenas poliméricas esta relacionado con la bioadhesión intrínseca y su medio ambiente. El hinchamiento depende de la presencia de agua entre otros factores y la máxima bioadhesión *in vitro* ocurre con un contenido óptimo de esta [LEE ET AL., 2000]. En este trabajo se encontró que ocurre un aumento del espesor de los *films* de Q_0 (tabla 8.7) en condiciones de mayor humedad (50% HR), lo que se debería a un hinchamiento de la matriz polimérica por una mayor absorción de agua. Este hinchamiento habría producido que los *films* tuvieran mayores propiedades de bioadhesión, lo que también se debería en parte a la mayor flexibilidad de las cadenas bajo estas condiciones. Por las razones antes mencionadas se eligió entonces la humedad de almacenamiento de 50% HR como estándar para todas las pruebas de bioadhesión realizadas.

En la tabla 8.8 y como ejemplo, se describen los promedios de los resultados de la Fuerza Máxima de Desprendimiento ($F_{m\acute{a}x}$) en N de los *films* de Q_0 ensayados. Cada prueba se realizó con 10 *films* de cada material con medidas de 1 cm de ancho por 4 cm de largo y con un largo efectivo de prueba de 3 cm (los *films* se pusieron en las pinzas con 1 cm de margen en ella).

TABLA 8.8. Fuerza Máxima de Desprendimiento ($F_{m\acute{a}x}$) de los <i>Films</i> , en N				
Promedio \pm Desviación Estándar (CV, %)				
Material Ensayado (n=10)	Velocidad, mm/min			
	5	10	20	30
Almacenamiento: 23°C y 30% HR				
Q_0 S-LA	0,205 \pm 0,02 (9,4)	0,176 \pm 0,02 (11,8)	0,170 \pm 0,02 (10,6)	0,154 \pm 0,02 (12,8)
Q_0 S-OH	0,326 \pm 0,02 (6,7)	0,268 \pm 0,03 (10,9)	0,248 \pm 0,03 (12,3)	0,222 \pm 0,02 (8,6)
Q_0 R-LA	0,196 \pm 0,02 (8,5)	0,158 \pm 0,02 (13,7)	0,149 \pm 0,02 (15,5)	0,142 \pm 0,02 (16,8)
Q_0 R-OH	0,238 \pm 0,02 (9,7)	0,199 \pm 0,02 (12,0)	0,194 \pm 0,03 (14,4)	0,168 \pm 0,03 (14,7)
Almacenamiento: 23°C y 50% HR				
Q_0 S-LA	0,246 \pm 0,01 (5,2)	0,209 \pm 0,02 (8,4)	0,199 \pm 0,02 (9,2)	0,157 \pm 0,02 (11,2)
Q_0 S-OH	0,375 \pm 0,03 (6,8)	0,289 \pm 0,02 (7,8)	0,255 \pm 0,03 (10,29)	0,180 \pm 0,02 (13,3)
Q_0 R-LA	0,198 \pm 0,01 (5,9)	0,134 \pm 0,01 (5,9)	0,109 \pm 0,01 (12,3)	0,093 \pm 0,02 (17,8)
Q_0 R-OH	0,242 \pm 0,02 (8,0)	0,204 \pm 0,02 (9,7)	0,199 \pm 0,02 (11,2)	0,163 \pm 0,02 (14,9)