

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DEL PERÚ

**ESTUDIO DE LIBERACIÓN DE SULFADIAZINA DE PLATA
DESDE MATRICES DE QUITOSANOS PARA SU USO COMO
APÓSITOS EN QUEMADURAS**

Tesis para optar el Título de Licenciada en Química, que presenta la Bachiller:

Jessica Vanessa García García

ASESORA: Ana Pastor de Abram

FEBRERO 2013

RESUMEN

Las quemaduras en los seres vivos son lesiones a los tejidos orgánicos ocasionadas por un agente que produce una variación térmica local. Existen diversos grados de quemaduras dependiendo de la extensión y la profundidad de la lesión. En el caso de las quemaduras de mayor gravedad se realizan tratamientos largos y dolorosos que se basan en el reemplazo de la piel dañada por un homoinjerto o heteroinjerto, complementado con el uso de diversos fármacos para evitar el rechazo y las infecciones que puedan producirse por la exposición de los tejidos al ambiente.

Se conoce la biocompatibilidad del quitosano y su uso como matriz de liberación de fármacos, por lo que se estudió su obtención a partir de quitina proveniente de la concha caliza (pluma) del calamar gigante *Dosidicus gigas*. Dado que la sulfadiazina de plata es un fármaco usado exitosamente en el tratamiento de quemaduras, se prepararon películas de quitosano cargadas con este fármaco, comprobándose la viabilidad del uso de este biopolímero para tal fin. Luego se procedió a estudiar la cinética de liberación de la sulfadiazina de plata de películas de quitosanos.

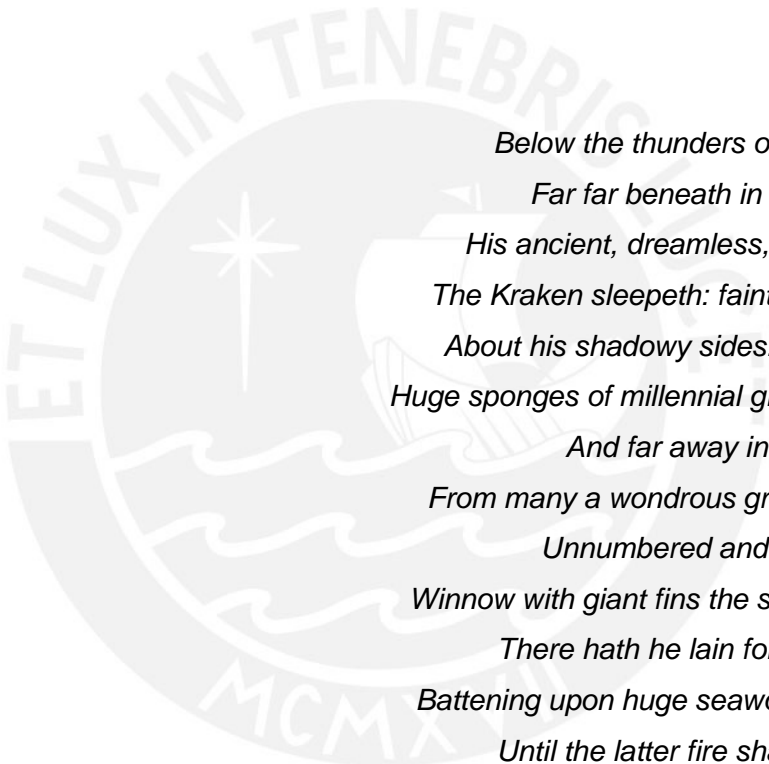
En la presente investigación se estudió la cinética de liberación de sulfadiazina de plata en tres diferentes tipos de quitosanos: uno de uso comercial y dos preparados en nuestros laboratorios. Se determinaron sus características fisicoquímicas como grado de desacetilación y peso molecular, obteniéndose quitosanos de pesos moleculares entre 170 – 490 kDa y grado de desacetilación entre 85 – 90%. Las películas desarrolladas fueron cargadas con dos diferentes concentraciones del fármaco y liberados a un medio buffer fosfato de pH 9 que simula el ambiente de una quemadura. Se determinó que la liberación del fármaco comienza con una etapa de equilibrio con el medio, seguida de una liberación controlada.

Todas las películas mostraron un comportamiento similar; sin embargo, la película preparada con el quitosano de peso molecular de 486,2 kDa y grado de desacetilación de 89,55% fue la que liberó el fármaco de forma sostenida por tiempo más prolongado y a una mayor concentración en comparación con las otras.

Las películas preparadas con los polielectrolitos quitosano-alginato no fueron homogéneas, observándose que el fármaco no fue cargado de manera efectiva.

Esto se comprueba en el perfil de liberación, siendo este de concentraciones mucho menores que las halladas con películas de quitosano solo y por debajo del rango de calibración. Sin embargo, se obtienen mejores resultados con la película hecha de quitosano Q12 y alginato con una concentración máxima de 0,035 mg/L a la media hora de liberación y reduciendo su liberación hasta 0,00024 mg/L a las 23 horas, mientras que con quitosano Q13 se obtuvo a las 23 horas una liberación fuera del rango. Esta diferencia viene dada por la mayor interacción del quitosano Q12 de menor peso molecular con el alginato, dando una interacción mayor con el fármaco.

Además, para poder comparar la efectividad de las películas, se realizó la liberación del fármaco desde una crema comercial de sulfadiazina al 1%. Se observó que, si bien la crema comercial libera el fármaco de forma sostenida, la concentración es mucho mayor, llegando a niveles de 0,089 mg/L a las 23 horas de liberación, mientras que las películas de quitosano pueden liberar 0,031 mg/L en el mismo tiempo. En consecuencia, existe la posibilidad de envenenamiento por grandes concentraciones de iones plata en sangre y tejidos, lo que puede ser evitado con el uso de los apósitos de quitosano.



*Below the thunders of the upper deep,
Far far beneath in the abysmal sea,
His ancient, dreamless, uninvaded sleep
The Kraken sleepeth: faintest sunlights flee
About his shadowy sides: above him swell
Huge sponges of millennial growth and height;
And far away into the sickly light,
From many a wondrous grot and secret cell
Unnumbered and enormous polypi
Winnow with giant fins the slumbering green.
There hath he lain for ages and will lie
Battening upon huge seaworms in his sleep,
Until the latter fire shall heat the deep;
Then once by men and angels to be seen,
In roaring he shall rise and on the surface die.*

“The Kraken”, Lord Alfred Tennyson



*A mi familia, Juan, Delia, Ursula, Shakira y Matusalén,
porque cada uno es un regalo de Dios.*

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, Juan, Delia y Ursula por el apoyo incondicional. A Matusalén y Shakira por recibirme siempre con alegría.

A mi asesora Ana Pastor, por todo el tiempo dedicado, el cariño, los consejos y lecciones que me brindó como profesora y como amiga. Por creer siempre en mi y darme la seguridad para alcanzar mis objetivos.

A mis amigos de toda la vida, Omar, Piero, Pamela, Sergio y Rommel, porque cada uno representa una gran parte de mi y con los que compartí alegrías, penas y lo bueno y lo malo de crecer. A Andrea, mi pequeña sobrina que llegó a desordenarnos alegremente y que me hace recordar lo simple que puede ser la vida. A José, por llegar a tiempo.

A Mariela, Kathia, Sandra, Rosmery y Heri, por todos los chocolates calientes, los triples y la amistad que me brindan. A Alex, por la paciencia y el buen humor.

A Lina Fuentes y Vanessa Estrada, por su apoyo y contribución a esta investigación. A Karina por el apoyo logístico y las bromas brindadas.

A la Dirección de Gestión de la Investigación (DGI) por el apoyo económico brindado.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ABREVIATURAS	v
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La piel	1
1.2. Quemaduras	2
1.2.1. Efectos de las quemaduras	4
1.2.2. Tratamiento de las lesiones	5
1.3. Sulfadiazina de plata	7
1.3.1. Propiedades	7
1.3.2. Efectos adversos	8
1.4. Matrices poliméricas	9
1.5. Quitina y quitosano	10
1.5.1. Obtención	12
1.5.2. Propiedades y aplicaciones	13
1.5.3. Películas de quitosano	14
1.6. Alginato	15
1.7. Estudio de liberación de fármacos	16
2. PARTE EXPERIMENTAL	17
2.1. Equipos	17
2.2. Reactivos	17
2.3. Metodología	18
2.3.1. Obtención de quitosano	18
2.3.2. Desproteínización	18
2.3.3. Desacetilación	18
2.3.4. Purificación de quitosano	19
2.4. Caracterización de quitosanos	19
2.4.1. Grado de desacetilación	19
2.4.2. Determinación de cenizas	21
2.4.3. Densidad	21
2.4.4. Viscosidad y peso molecular	21
2.4.5. Contenido de nitrógeno	23

2.4.6. Contenido de humedad.....	23
2.5. Preparación de películas de quitosano	23
2.6. Preparación de películas de quitosano y alginato	24
2.7. Preparación de películas cargadas con sulfadiazina de plata	24
2.8. Evaluación de la cinética de liberación de sulfadiazina de plata <i>in vitro</i>	24
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
3.1. Obtención de quitosanos	26
3.2. Purificación y caracterización.....	26
3.2.1. Purificación de quitosano	26
3.2.2. Caracterización de quitosanos	27
3.2.2.1. Grado de desacetilación (GD).....	27
3.2.2.2. Densidad.....	28
3.2.2.3. Viscosidad y peso molecular	29
3.2.2.4. Contenido de nitrógeno, cenizas y humedad.....	31
3.3. Elaboración de películas	32
3.4. Preparación de películas cargadas con el fármaco	33
3.5. Estudio de liberación de sulfadiazina de plata (SDAg)	34
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	41
4.1. Conclusiones	41
4.2. Recomendaciones	42
5. BIBLIOGRAFÍA	44

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura de la piel	2
Figura 2. Características de la sulfadiazina de plata	7
Figura 3. Estructuras de quitina (a) y celulosa (b)	10
Figura 4. Estructura del quitosano	11
Figura 5. Grupos de alginato.....	15
Figura 6. Espectro ¹ H-RMN de quitosano.	20
Figura 7. Quitosanos a) sin purificar y b) purificado	26
Figura 8. Espectro ¹ H-RMN de Quitosano Q13 en RMN de 300 MHz con D ₂ O	27
Figura 9. Gráfica de n _e /C vs.C para el quitosano Q12.....	30
Figura 10. Gráfica de n _e /C vs.C para el quitosano Q13.....	30
Figura 11. Película de quitosano cortado	33
Figura 12. Espectro UV-Vis de sulfadiazina de plata.....	35
Figura 13. Curva de calibración de sulfadiazina de plata	35
Figura 14. Curvas de liberación de quitosano comercial	35
Figura 15. Curvas de liberación de quitosano Q12.....	37
Figura 16. Curvas de liberación de quitosano Q13.....	38
Figura 17. Curva de liberación de sulfadiazina a partir de crema comercial	38
Figura 18. Curva de liberación de sulfadiazina desde película de quitosano Q12 con alginato de sodio	40
Figura 19. Curva de liberación de sulfadiazina desde película de quitosano Q13 con alginato de sodio	40

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación de las quemaduras según la profundidad	3
Tabla 2. Condiciones empleadas para la obtención del quitosano	19
Tabla 3. Constantes viscosimétricas	22
Tabla 4. Grado de desacetilación de Q12 y Q13 a partir de los espectros de ¹ H- RMN	28
Tabla 5. Densidades de las muestras Q12 y Q13 a 18°C	28
Tabla 6. Datos para viscosidades de las muestras Q12 y Q13 a 30°C	29
Tabla 7. Variables viscosimétricas para quitosanos Q12 y Q13	31
Tabla 8. Humedad, cenizas y nitrógeno de quitosanos Q12 y Q13	31

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ASTM: American Society for Testing and Materials (Sociedad Americana para Ensayos de Materiales)

cc: Centímetros cúbicos

DA: Desacetilación

DC: Decoloración

DM: Desmineralización

DP: Desproteínización

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación)

GD: Grado de desacetilación

GRAS: Generally Recognized as Safe (Reconocido generalmente como exento de todo riesgo)

ISO: International Organization for Standardization (Organización Internacional de Estandarización)

MINSA: Ministerio de Salud de Perú

PM: Peso Molecular

Qno: Quitosano

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

SCQ: Superficie Corporal Quemada

SDAg: Sulfadiazina de plata

US-FDA: United States Food and Drug Administration (Administración de alimentos y Medicamentos de Estados Unidos)

USP: United States Pharmacopeia (Farmacopeia de Estados Unidos)

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La piel

La piel viene a ser la primera barrera de protección y de enlace con el medio ambiente para los seres vivos. Es también, una de las formas de expresión de sensaciones y enfermedades porque posee íntima relación con los órganos internos, de tal manera que las enfermedades de estos pueden manifestarse a través de la piel como úlceras y quemaduras.

Es el órgano de mayor tamaño con una extensión de aproximadamente 2 m² y un peso de 4 a 5 kg en una persona adulta promedio y su grosor varía de acuerdo a los órganos que cubre. Además de su función protectora ante cambios de temperatura, microorganismos y radiación, ayuda a equilibrar el contenido de agua, electrolitos y temperatura.

Se encuentra conformada por tres capas [1]: epidermis, dermis y subcutis o hipodermis.

La epidermis es la capa más externa de la piel, formada en su mayoría por queratinocitos, proteínas de alta resistencia ante cambios de pH y temperatura ubicados en la capa más externa de la epidermis denominada estrato córneo [2]; melanocitos, que producen la melanina que protege de los rayos ultravioleta y brinda pigmentación a la piel; células de Langerhans, que forman parte del sistema inmunológico del cuerpo y las células de Merkel que se enlazan con las terminaciones nerviosas y son responsables del sentido del tacto. La epidermis tiene una renovación permanente y es reemplazada cada tres semanas aproximadamente.

La dermis o capa intermedia es la que sirve de soporte y da elasticidad a la piel. Está conformada por fibroblastos que sirven para la síntesis de colágeno; macrófagos que realizan la fagocitosis; linfocitos responsables de las reacciones inmunes; mastocitos que están conformados por histamina, heparina y serotonina (compuestos responsables de los procesos inflamatorios) y células plasmáticas.

Tanto la epidermis como la dermis tienen una función en común en la regeneración y curación de heridas y de defensa mediante respuestas inflamatorias.

El subcutis o hipodermis es la capa de anclaje de la piel, fijando sus fibras a la dermis dándole soporte y movilidad a la piel; también se encuentra gran cantidad de terminaciones nerviosas. Está conformada por tejido adiposo que cumple las funciones de aislante, como reserva de energía y amortiguador de impactos.

Otros elementos importantes de la piel son: el pelo que cumple una función protectora; las glándulas sebáceas que ayudan a lubricar la piel y a preservar su cubierta hidrolipídica; y las glándulas sudoríparas que ayudan a equilibrar la temperatura corporal [3].

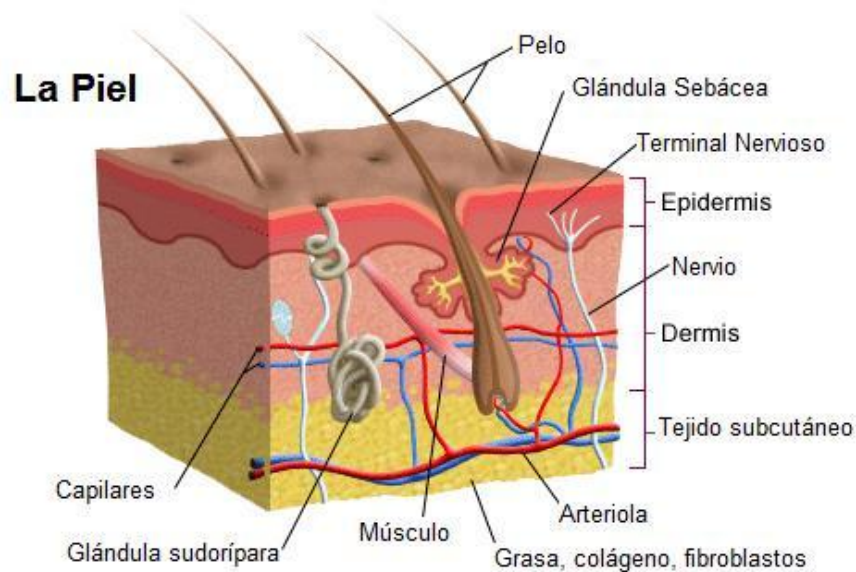


Figura 1. Estructura de la piel [4]

Las laceraciones por enfermedades y las heridas por quemaduras resultan difíciles de sanar porque implican pérdida de piel, exponiendo a los órganos internos a la pérdida de humedad y contaminación aeróbica que conducen a infecciones y sepsis.

1.2. Quemaduras

Las quemaduras son lesiones en los tejidos orgánicos ocasionados por un agente que produce una variación térmica local. Pueden ser distinguidas de acuerdo a su origen y mecanismo de producción como [5]:

- *Quemaduras Térmicas:* debido al contacto de fuego directo, escaldaduras, por líquidos o por frío extremo durante un largo periodo.

- *Quemaduras Químicas*: ocasionadas principalmente por el contacto con ácidos o álcalis.
- *Quemaduras Eléctricas*: por descargas eléctricas de alto y bajo voltaje de forma directa, por arco eléctrico o por efecto de rayos de tormentas.
- *Quemaduras por Radiación*: principalmente ocasionadas por radiación UV y otras radiaciones ionizantes.

Las quemaduras se clasifican de acuerdo a su profundidad y extensión [6]; es necesaria una identificación adecuada para poder realizar un tratamiento óptimo. La profundidad tiene una relación directa con el tiempo de curación y el desarrollo de algún tipo de secuela, sea física o psicológica.

- *Quemaduras de primer grado o superficiales*: afectan a la epidermis.
- *Quemaduras de segundo grado*: subdivididas en grosor parcial superficial que afectan la capa externa de la epidermis y grosor parcial profundo afectando la epidermis, pudiendo llegar hasta la dermis.
- *Quemaduras de tercer grado o de grosor total*: en donde la destrucción de la epidermis y la dermis es total, llegando a afectar las terminaciones nerviosas, músculos y huesos.

En la tabla 1 se lista la apariencia, síntomas y tiempo de curación para cada una de las diferentes tipos de quemaduras.

Tabla 1. Clasificación de las quemaduras según la profundidad [6].

Grado	Aspecto	Clínica	Evolución
Superficiales	Rojas, secas, blanquean a la presión.	Dolor.	Curación 3 - 6 días. Sin secuelas.
Grosor parcial superficial	Ampollas, rojas y exudativas, blanquean a la presión.	Dolor y sensibilidad a la temperatura.	Curación 7 - 20 días. Con cambios de pigmentación.
Grosor parcial profundo	Ampollas, húmedas o secas. Color variable. No blanquean.	Sensibilidad a la presión. No dolor.	Curación > 20 días. Cicatriz hipertrófica. Riesgo de contractura.

Grosor total	Blancas, c�reas o carbonáceas. Secas y con escara.	No sensibilidad.	No curan si > 2% SCQ*. Riesgo severo de contractura.
--------------	---	------------------	--

*SCQ: *Superficie Corporal Quemada*

En el Perú, no se tienen estudios sobre el número de personas afectadas por quemaduras. Los datos obtenidos se refieren a la cantidad de personas que por la gravedad de las quemaduras fueron hospitalizadas.

De acuerdo a las estadísticas brindadas por la Asociación de Ayuda al Niño Quemado (ANIQUEM), en el año 2008 se atendieron 36,420 pacientes en los hospitales y centros de atención del Ministerio de Salud (MINSA), de los cuales el 44% fueron niños menores de 9 años, 18% son jóvenes de 10 a 19 años, 31% son adultos de 20 a 59 años y 7% son adultos mayores de 60 años [7].

1.2.1. Efectos de las quemaduras

El efecto inmediato sobre la piel por el incremento brusco de temperatura es la desnaturalización de proteínas. Al destruirse la piel, la velocidad de pérdida de agua aumenta a 100 cc/m²/hora, siendo el volumen de pérdida normal de 15 a 21 cc/m²/hora. El alto calor específico de la piel y su baja conducción hacen que la pérdida de calor sea lenta, por lo que, a pesar de que se elimine el agente que causa la quemadura, el calor aún presente hace que el daño continúe.

Hay un aumento de catecolaminas que provoca un aumento en la actividad metabólica y el consumo de oxígeno aumenta. Al producirse la muerte de tejidos hay una reacción inmunológica general, que favorece la producción de radicales libres de oxígeno, radicales hidroxilo, peróxidos de hidrógeno producidos por los leucocitos, produciendo la inflamación general, daño en la matriz celular, inicio del metabolismo de ácido araquidónico e impidiendo la actividad fagocítica de los macrófagos [8].

Durante el desarrollo de la quemadura, las bacterias comúnmente situadas en los folículos pilosos y glándulas sebáceas pueden sobrevivir. Estas son en su mayoría del tipo gram positivo (*Staphylococcus aureus*, *Enterobacter spp*). A medida que pasa el tiempo y el organismo está expuesto al medio ambiente, las bacterias tipo gram negativo (*Pseudomona aureginosa*, *Klebsiella*, *S. Epidermidis*, *E. Coli*,

Proteus spp, *Citrobacter*) ingresan en la herida, pudiendo llegar a la piel sana o al torrente sanguíneo, siendo la más común y abundante la *Pseudomona aeruginosa*. Estas bacterias tienen un factor de virulencia mayor que las gram positivas, pues poseen endotoxinas y exotoxinas, enzimas proteolíticas, polisacáridos extracelulares, que les dan una capacidad de sobrevivencia dentro del huésped, además de poseer una resistencia a los antibióticos intrínseca y adquirida que puede producir efectos adversos en el paciente durante la aplicación de medicamentos [9].

La presencia de hongos también ha sido observada, preferentemente del tipo de cándidas (*Torulopsis*, *Aspergillus*, *Mucoraceae*, *Zigomicetos* *Criptococcus*)

Otra característica de las quemaduras es la variación del pH de la piel. En una piel sana, el pH suele ser 5,5 dándole una característica ligeramente ácida, pues la mayoría de las bacterias sobreviven a pH neutro. En cambio en una piel quemada, la pérdida de electrolitos, enzimas y la exposición al ambiente hacen que este pH varíe. Osti y col. realizaron un estudio de la variación del pH en piel quemada desde el inicio de la quemadura hasta la regeneración del epitelio utilizando diversos fármacos tópicos. Concluyeron que, en una etapa inicial, la piel tiene un pH alcalino entre 8 y 8,5 aumentando en el tiempo desde 9,5 a 10,5 hasta el cuarto día, sin importar el tipo de tratamiento que se diera, probablemente por la producción del organismo de sustancias de barrera. Luego durante el proceso de regeneración empieza a decrecer hasta que la piel es nuevamente regenerada y el pH se estabiliza en 5,5 [10].

1.2.2. Tratamiento de las lesiones

Cuando el paciente es estabilizado y se ha valorado la extensión de la quemadura, se procede a enfocar el tratamiento en la disminución de infecciones y limitar la formación de cicatrices. El tratamiento se inicia con una limpieza profunda de la quemadura para poder realizar el desbridamiento del tejido necrótico y ampollas. Para evitar la proliferación de bacterias y hongos se continúa con la quimioprolifaxis, que consiste en la aplicación de fármacos por vía tópica, los cuales poseen propiedades antibióticas y antiinflamatorias.

Entre los fármacos más utilizados se encuentra sulfadiazina de plata, nitrofurazona y plata nanocrystalina. Para que la curación sea exitosa, se debe aplicar estos

fármacos continuamente, de preferencia se utiliza además un vendaje para proteger la herida y absorber los exudados. En general, la sulfadiazina de plata en crema al 1% es bacteriostática, posee actividad contra bacterias gram negativas y gram positivas, a diferencia de la nitrofurazona que no es activa contra *Pseudomonas aeruginosa* y su uso es doloroso para el paciente. En el caso de la plata nanocristalina, el efecto es similar al de la sulfadiazina pero prolongado, además de ser un medicamento mucho más caro.

La aplicación tópica de fármacos ha sido utilizada frecuentemente como agentes de prevención de infecciones. Para poder utilizar estos fármacos de forma eficiente se requiere de un método que facilite la penetración del fármaco y permita que su aplicación sea más específica para evitar concentraciones elevadas que puedan ocasionar efectos tóxicos en el paciente [11].

Para quemaduras muy extensas o profundas, el tiempo de regeneración de la piel es largo, por lo que es necesario, en la mayoría de casos, un procedimiento quirúrgico y aplicación de injertos que favorecerán la disminución del dolor, control en la pérdida de líquidos y previenen infecciones. Estos injertos pueden ser homoinjertos o aloinjertos, que provienen del mismo paciente, de un donante o de tejidos cadavéricos y los del tipo de heteroinjertos provienen de piel cultivada artificialmente o son de piel de animales llamadas también xenoinjertos.

Entre los homoinjertos, el injerto generado por el mismo paciente es el ideal, ya que no hay riesgo a rechazo, lo que puede ocurrir con un injerto de donante o de tejido cadavérico; este último es más costoso y de menor vida media.

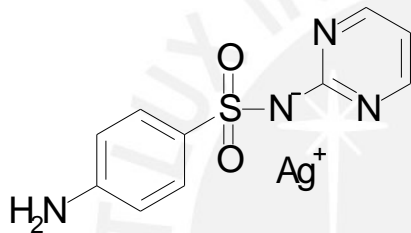
Los heteroinjertos pueden ser láminas transparentes o apósitos especiales que ayudan a la cicatrización y a proteger al organismo del medio ambiente. No obstante, pueden no ser tolerados en pacientes alérgicos a algunos polímeros, heridas infectadas o quemaduras de tercer grado [12].

Los xenoinjertos, por otro lado, son utilizados por ser más económicos; se pueden tener en cantidades suficientes para áreas grandes de quemaduras y tienen una adherencia similar a la de un homoinjerto. Lo más utilizado es la piel liofilizada de cerdo, que al ser tratada tiene mayor capacidad de compatibilidad con el paciente. Sin embargo, se prefiere utilizar como soporte de homoinjertos y en quemaduras de SCQ menores de 30% [13].

En todos los casos es necesaria la aplicación de vendajes para la protección de la nueva piel como soporte mecánico.

1.3. Sulfadiazina de plata

La sulfadiazina de plata (SDAg), 4-amino-N-2-pirimidilbencensulfonamida-monoargénica (Figura 2), es una sulfonamida producida al reaccionar sulfadiazina con nitrato de plata. Este fármaco es utilizado generalmente en el tratamiento de quemaduras por su fácil aplicación, amplio espectro de acción y bajo costo.



Sinónimo	Sulfadiazina de plata, Sulfadiazina argéntica
Fórmula Molecular	$C_{10}H_9AgN_4O_2S$
Peso Molecular	357,14 g/mol
Propiedades	Sólido blanco, insoluble en agua helada

Figura 2. Características de la sulfadiazina de plata [14].

1.3.1. Propiedades

La sulfadiazina de plata, a diferencia de otras sulfonamidas, posee dos mecanismos de acción, promovidos por el ión plata contenido en su estructura y por la sulfadiazina por acciones individuales o en forma sinérgica [15].

Nesbitt y Sandmann [16], sugieren que el ión plata se enlaza con el ADN bacteriano reemplazando los enlaces de hidrógeno de los átomos de nitrógeno adyacentes de purinas (adenina o guanina) y pirimidinas (timina y citosina). El enlace N-H es más débil que el enlace N-Ag, produciendo una falla en la replicación del ADN bacteriano. Por la concentración de iones plata en los medicamentos actuales, la selectividad por las bacterias es alta, aunque, si el tratamiento es largo, se deben realizar análisis de sangre continuos para monitorear la concentración en el paciente.

Asimismo, la sulfonamida asociada interviene en la síntesis de ácido fólico como inhibidor competitivo con el ácido p-aminobenzoico al poseer una estructura similar.

Inhibe además a la dihidroterato sintetasa, responsable del precursor del ácido fólico. Tiene una acción más selectiva que el ión plata, ya que las células eucarióticas no sintetizan el ácido fólico, sino que lo toman de los alimentos. Las bacterias, por el contrario, necesitan sintetizar el ácido fólico, por lo que son muy sensibles al ataque de la sulfonamida [17]. A diferencia de la plata, la sulfonamida es de rápida absorción y es desechada del organismo por medio de la orina.

La sulfadiazina de plata es bactericida de un amplio rango de bacterias gram positivas y gram negativas, incluyendo las *Pseudomonas aureginosa*, *S. aureus*, *A. Aerogenes* y *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. También sirve de fungicida para hongos tipo cándida como inhibidor de la actividad de la fosfomanosaisomerasa, responsable del desarrollo de la pared celular de la cándida. Aunque no posee selectividad entre células fúngicas o de mamíferos, se pueden introducir compuestos que pueden ser enlazados en la enzima y pueda dar la selectividad requerida [18]

Su aplicación más común es como antiséptico en quemaduras en el tratamiento de emergencia, durante el desbridamiento y también es aplicada en úlceras varicosas.

1.3.2. Efectos adversos

En bajas concentraciones no se presentan reacciones importantes, si bien la sulfadiazina de plata no ha sido reconocida como alérgeno, si se tiene evidencia que los excipientes que sirven como vehículo de la sulfadiazina han ocasionado hipersensibilidad, por lo que es importante encontrar una nueva matriz que pueda ser utilizada con el fármaco y no presente efectos adversos [19]

En quemaduras extensas (superficie corporal mayor al 20%) su aplicación puede provocar leucopenia transitoria, observándose una disminución de leucocitos, discrasias sanguíneas, reacciones alérgicas como erupciones cutáneas y prurito. Las altas concentraciones de iones plata debido al tratamiento pueden ocasionar argiria provocando una coloración gris azulada en la piel y otros órganos aunque es inusual [20].

Debe evitarse su aplicación durante el embarazo, en recién nacidos y en pacientes con alergias a las sulfas. [21]

1.4. Matrices poliméricas

Las matrices o soportes son compuestos de polímeros naturales o sintéticos, que proporcionan una herramienta apropiada para el desarrollo de formas más efectivas de aplicación de fármacos. La propiedad más importante de estas matrices es su coeficiente de difusión. De acuerdo a esta característica se pueden determinar concentraciones de fármacos apropiados, de manera sostenida y por un tiempo prolongado [22].

Además de su aplicación en el área médica como tabletas, implantes y como parches transdérmicos, se ha utilizado en la agricultura como matriz de liberación de agroquímicos, disminuyendo así el volumen de pesticidas y fertilizantes utilizados y aumentando el tiempo de eficacia del agente activo [23].

Dado que dentro de la epidermis, el estrato córneo es la mayor barrera de penetración de la piel, se estudiaron diversas drogas encontrando que varias de ellas eran permeables a él. En 1979 fue aprobado el primer parche transdérmico por la United States Food and Drug Administration (US-FDA) [24] y actualmente existen diversos fármacos que son administrados por este método, con múltiples ventajas, tales como:

- liberación controlada y estable,
- duración prolongada de contacto del fármaco con la herida,
- aumento del intervalo de aplicación de las siguientes dosis, disminuyendo la probabilidad de reacciones adversas,
- fácil aplicación y comodidad para el paciente.

Se debe tener en cuenta las características del fármaco que se desea administrar, siendo las principales: bajo peso molecular (< 500 kDa), liposolubles para que puedan atravesar la bicapa lipídica de la epidermis, ser efectivos en bajas concentraciones (miligramos) y no causar irritación a la piel [25].

La matriz utilizada para la liberación del fármaco también debe tener ciertas características tales como: ser flexible, hemostática, compatible con la piel, permeable, liberar en forma constante el fármaco y ser compatible con el mismo sin llegar a formar enlaces fuertes que impidan su liberación.

Asimismo, existen factores inherentes del paciente por los cuales el mecanismo de difusión puede verse alterado como: pH, temperatura y estado de hidratación [26].

1.5. Quitina y quitosano

La quitina, poli [β - (1 \rightarrow 4) - 2 - acetamida - 2 - desoxi - D - glucopiranosas] (Figura 3a) existe en la Tierra desde hace más de 570 millones de años, y se halla en los exoesqueletos de artrópodos fósiles como los trilobites [27]. La quitina, segundo biopolímero en abundancia luego de la celulosa, es un compuesto de alto peso molecular de color blanco, duro e inelástico; se encuentra en los exoesqueletos de insectos, crustáceos y arácnidos siendo la mayor fuente de obtención de este polímero a través de desechos de la actividad pesquera. Está constituido por unidades monoméricas de N-acetilglucosamina, estructuralmente similar a la celulosa (Figura 3b), con una modificación en la posición C-2 donde posee un grupo acetamido. Los enlaces glicosídicos son estables en un medio básico pero, en presencia de ácidos, la quitina es degradada en oligómeros y monómeros.

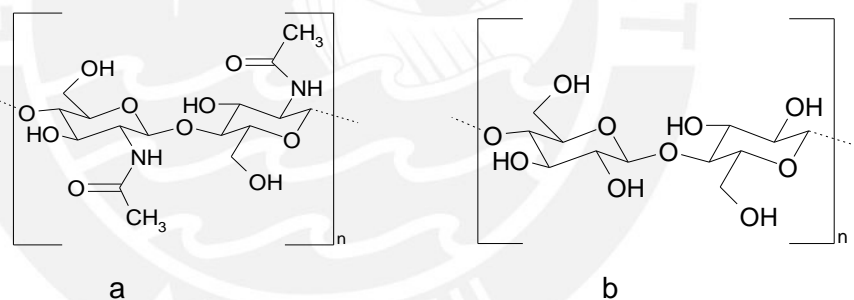


Figura 3. Estructuras de quitina (a) y celulosa (b).

El quitosano, es un polisacárido catiónico derivado de la quitina, posee dos subunidades [β -(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-amino-D-glucopiranosas] y [β -(1 \rightarrow 4)-2-desoxi-2-acetamido-D-glucopiranosas] [28]. Se encuentra de forma natural en algunos hongos del orden de los Mucorales géneros *Mucor*, *Absidia* y especies de *Rhizopus*, además de estar presente en el *Lentinula edodes* o shiitake [29], que es consumido en Japón, Corea, Taiwan y China. Los estípites del shiitake son descartados y es donde se encuentra el biopolímero. Actualmente se estudian intensamente las propiedades de esta fuente [30].

El quitosano se obtiene principalmente de la desacetilación parcial de la quitina [31] donde el grupo acetamido en el C-2 por desacetilación se convierte en un grupo amino. El quitosano es el único polisacárido natural de carácter catiónico; sus características y propiedades pueden variar dependiendo de la longitud de las cadenas y del grado de desacetilación.

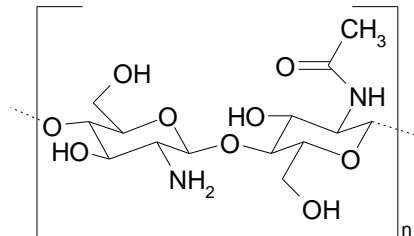


Figura 4. Estructura del quitosano

En el presente estudio se utilizó quitina proveniente del molusco *Dosidicus gigas*, llamado comúnmente calamar gigante o pota. Este molusco está distribuido en el océano Pacífico desde México hasta Chile, siendo la mayor área de concentración las costas de México y Perú. En el país, la pota se encuentra concentrada en el norte, en Tumbes, Talara y Paita. La extracción de esta especie se produce de forma artesanal y a nivel industrial.

En el año 2011 la pota fue la especie más aprovechada por la industria pesquera, realizando un desembarque aproximado de 396 mil toneladas, produciéndose un aumento del 11% con respecto al año 2010, aprovechado como congelado, enlatado, curado o fresco. Además, fue la especie con mayor demanda de exportación como congelado, con un 47% del mercado cuyos destinos fueron Estados Unidos, China, España, Francia, Corea del Sur y Japón [32]. Para el año 2012, el Ministerio de la Producción ha establecido como límite máximo la pesca de 500 mil toneladas de pota [33].

En el proceso de limpieza y corte de la pota, en la pesca artesanal, se desechan en altamar o de manera informal las partes quitinosas conocidas como pluma de pota; en el caso de la pesca industrial, lo disponen como residuo sólido sin un tratamiento previo.

1.5.1. Obtención

La quitina se encuentra en sus fuentes naturales asociada a proteínas, pigmentos y sales inorgánicas por lo que, para ser utilizada, deben ser separados estos compuestos. Se realizan los procesos de desmineralización, desproteínización, decoloración y desacetilación obteniéndose quitosano después de estos pasos.

La desproteínización se realiza en medio alcalino, comúnmente NaOH, a temperaturas entre 65 a 100 °C durante 1 hora a 24 horas. La quitina se observa entonces como un sólido de color blanco amarillento y la solución extractora posee un color anaranjado debido a la presencia de proteínas y colorantes extraídos. Las grasas y colorantes presentes en la solución pueden ser recuperados en medio neutro y procesados para utilizarlas en acuicultura como suplemento nutricional [34].

Luego de separar la quitina se procede a la desmineralización. Esta se realiza en medio ácido donde los minerales de la matriz quitinosa son separados de la quitina y finalmente por neutralización se obtiene la quitina libre.

Para la obtención de quitosano, nuevamente se hace reaccionar la quitina con NaOH en concentraciones muy altas, para promover la hidrólisis del grupo acetamida de la quitina a temperaturas de 80 °C a 120 °C [35].

En este último proceso, la desacetilación no se completa, por ello es que el quitosano posee dos diferentes subunidades, unas desacetiladas y otras no. El porcentaje de desacetilación puede variar dependiendo de la concentración de NaOH y de la duración del proceso, entre otros factores.

En el caso de la quitina proveniente de pota, posee muy baja cantidad de colorantes y proteínas, facilitando la obtención de quitosano que resulta más limpio que el obtenido de otras fuentes. El quitosano de pota prácticamente no posee proteínas reduciendo por esto la posibilidad alérgica, mostrando además excelente biocompatibilidad, que lo hace ideal para aplicaciones médicas [36].

1.5.2. Propiedades y aplicaciones

El quitosano al ser un biopolímero, posee alto peso molecular y su estructura lineal le confiere propiedades únicas, para poder ser utilizado como matriz o como copolímero en entrecruzamientos con polímeros aniónicos [37].

Es insoluble en pH alcalino y neutro, se disuelve en solventes ácidos. En este proceso se protona el grupo amino generándose por ello un polímero de tipo polielectrolito catiónico.

El quitosano puede ser utilizado como sólido, en solución, en forma de películas, esponjas, fibras y geles.

El grado de desacetilación define sus propiedades fisicoquímicas tales como viscosidad, solubilidad, biodegradabilidad, hinchamiento y biocompatibilidad. Otras propiedades importantes son: alta capacidad de adsorción, actividad hipocolesterolémica, hemostática, antibacterial y antiulcerante [38].

El estudio de las diversas propiedades de quitina y quitosano han hecho de estos, materiales promisorios en diversos campos, como la agricultura, alimentación, cosmética, control ambiental y medicina [39].

En el año 2001, el quitosano fue reconocido como sustancia GRAS (Generally Recognized as Safe) [40] en Corea, Japón y Estados Unidos. Es utilizado como mejorador de la textura de los alimentos, por sus propiedades emulsificantes, y gelificantes; como preservante de alimentos por ser antibacteriano y antifúngico, como clarificador de vinos y bebidas en general por su propiedad estabilizadora de color [41,42]. Es añadido en diversos alimentos, como los fideos y las galletas, por su propiedad hipocolesterolémica [43].

En la agricultura cumple funciones de recubrimiento de semillas para la protección ante agentes microbianos y mejoramiento de la germinación. El quitosano también es utilizado como preservante en verduras y frutas, retrasando la maduración y protegiéndolos del ataque de hongos y bacterias. Es también utilizado en agricultura como matriz de liberación de fertilizantes y pesticidas [44].

Para el tratamiento de aguas, como agente floculante y coagulante en la remoción de residuos orgánicos, surfactantes, entre otros. Su carácter catiónico le permite capturar compuestos aniónicos, también es un candidato ideal para la remoción de iones metálicos en efluentes mineros [45].

El quitosano es soluble en ácidos y compatible con la piel, puede ser utilizado en la formulación de cremas, lociones y en esmaltes para uñas, creando una barrera contra la radiación ultravioleta y la deshidratación de la piel [46].

Dentro de la industria farmacéutica es utilizado como polímero de recubrimiento y por su propiedad anticolesterolémica para la fabricación de productos dietéticos. Puede ser utilizado como matriz de liberación de fármacos, en forma de geles o en forma sólida para la administración por vía oral [47].

En el área biomédica, el quitosano posee características ideales para la elaboración de lentes de contacto: biocompatibilidad, estabilidad mecánica, permeabilidad y por permitir una corrección óptica conveniente [48].

Es utilizado como aditivo en pastas dentales y chicles por su efecto bactericida previniendo la presencia de *Streptococcus mutans* responsable del desarrollo de caries dentales [49].

Por su histocompatibilidad y permeabilidad es usado en vendajes [50], cremas para heridas y úlceras, hilos de sutura, implantes para regeneración de tejido conjuntivo y huesos, también en ortopedia [51].

1.5.3. Películas de quitosano

La propiedad filmogénica del quitosano permite a las películas de este material, funcionar en medicina como barreras entre las heridas y el ambiente por los factores siguientes: alta compatibilidad, gran estabilidad durante el tiempo de contacto, propiedades mecánicas adecuadas, biodegradabilidad y capacidad de permeabilidad. Las películas de quitosanos pueden ser cargadas con medicamentos que, al aplicarse sobre heridas, las protegerán contra los procesos de deshidratación, infección y favorecerán que la herida entre en contacto permanente con el medicamento que se liberará de forma controlada [52].

Otra de las propiedades que resulta de alto interés es la capacidad regenerativa de tejidos sobre las superficies en contacto con estas películas, teniendo además la ventaja de que la adherencia es leve y se permite el retiro del apósito y la conservación del nuevo epitelio sobre la herida [53,54].

1.6. Alginato

Es un polisacárido conformado por monómeros de ácido D-manurónico (grupo M) y L-gulurónico (grupo G) mediante un enlace 1→4 pudiendo observarse secuencias de un solo monómero o de ambos de forma intercalada como indica la Figura 5 [55]. Es un polímero natural que se encuentra en mayor cantidad en las algas pardas de la familia de las *Phaeophyceae*, como las *Macrocystis pyrifera* o sargazo que abundan en América del Norte, América del Sur (desde Lima hasta el Cabo de Hornos) [56], Sudáfrica y Nueva Zelanda; otras algas importantes son la *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata* y *Ascophyllum nodosum*.

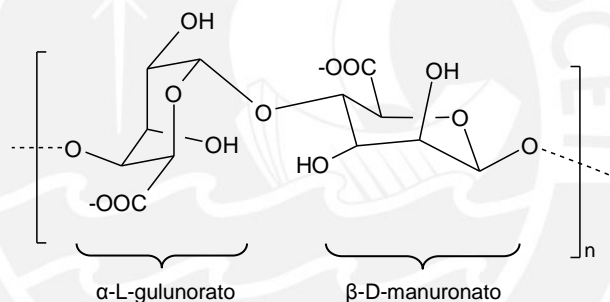


Figura 5. Grupos de alginato

La propiedad gelificante del alginato viene dada por la afinidad con diversos iones, relacionado con la cantidad de bloques compuestos por grupos G [57]. Este biopolímero es utilizado ampliamente, como fijador del color en las tintas para impresión [58] y en el área de alimentos y farmacia.

Se conoce que el alginato de sodio en grandes cantidades no tiene efectos adversos en la digestión [59]. Es utilizado como aditivo en salsas [60] y helados [61]. Actualmente, es utilizado de forma amplia en la gastronomía, y de forma particular en la llamada cocina molecular [62]. También es conocida su aplicación en farmacia, como excipiente en formulaciones de cremas gelificantes y como transportador de fármacos en liberación controlada [63, 64].

Las películas conformadas por quitosano y alginato son complejos polielectrolitos enlazados por interacciones iónicas producidas por la interacción de los grupos aminoprotonados del quitosano con un polímero aniónico como alginato que posee grupos carboxílicos, formando así un complejo polielectrolito con fuertes interacciones coulómbicas que ayudan al agregado de compuestos iónicos [65]. El quitosano por sus propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad y actividad antibacteriana y el alginato, un polisacárido utilizado como gelificante, estabilizante y recubrimiento en protección de heridas, conforman un complejo polielectrolito ideales para la aplicación farmacéutica como apósitos y como matriz polimérica de liberación controlada de fármacos [66].

1.7. Estudio de liberación de fármacos

En una matriz polimérica cargada, la velocidad de liberación del fármaco es importante para determinar la concentración que el paciente recibirá en un determinado período de tiempo; de ser esta mayor a la necesaria podría ocasionar una intoxicación; si fuese menor, el fármaco sería ineficaz [67].

Para formas tópicas como geles o cremas se puede utilizar un modelo simple de difusión, colocándolas directamente sobre el fluido donde se difunde. Para matrices poliméricas se emplean métodos de liberación de canastilla, determinados por la United States Pharmacopeia (USP) [68].

El modelo matemático más usado para matrices sólidas o semisólidas es el desarrollado por Higuchi teniendo como requisito que la solubilidad del fármaco en el medio haya sido comprobada. Este modelo está basado en la Ley de Fick, empleando la denominada Ecuación Simplificada de Higuchi [69]:

$$Q = K_H t^{\frac{1}{2}}$$

donde: Q: cantidad de fármaco liberado
 K_H : constante de disolución de Higuchi
 t : tiempo

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Equipos

Reactor piloto de 75 litros de acero inoxidable AISI 316L de 2mm de espesor con agitador tipo ancla de 5 kW de potencia.

Espectrofotómetro UV visible Perkin Elmer Lambda 2.

Espectrómetro RMN Bruker modelo ARX 300.

Equipo de filtración Sartorius modelo SM16249 con filtro 0.45µm.

Balanza analítica Sartorius 200 g ± 0,0001 g

Disolutor Tester VK 7020.

Liofilizador modelo LyphLock Labconco.

Estufa universal Memmert modelo GMBH.

Termostato Kotterman.

Elemento filtrante NMO 50 AGF, marca EATON, de 50 µm de tamaño de poro.

2.2. Reactivos

Ácido acético glacial grado p. a. (Merck, Alemania).

Hidróxido de sodio pa. (J.T. Baker).

Ácido clorhídrico p.a. (J.T. Baker).

Ácido láctico 88-90% (Scharlau Chemie, Alemania).

Sulfadiazina de plata al 98% (Sigma-Aldrich Inc.)

Alginato de sodio de viscosidad media, con proporción M/G de 1,56 y viscosidad \geq 2,0 cP (Sigma Aldrich Inc.)

Cloruro de sodio p.a. (J.T. Baker).

Cloruro de potasio p.a. (J.T. Baker).

Fosfato disódico p.a. (J.T. Baker).

Fosfato de potasio p.a.(J.T. Baker).

Agua deuterada 99,9% D (Sigma-Aldrich).

Crema de sulfadiazina de plata al 1% (Laboratorios MEDCO).

Quitosano comercial con 7,5% Humedad y GD de 80% (Merck)

2.3. Metodología

2.3.1. Obtención de quitosano

Como materia prima se utilizó plumas de *Dosidicus gigas* (Calamar Gigante o Pota) picadas y congeladas las cuales pasaron por los procesos de desproteínización (DP) y desacetilación (DA). Se obtuvieron dos diferentes tipos de quitosano de acuerdo a las variaciones que se realizaron en el proceso de desacetilación.

En el caso del quitosano comercial, se utilizó directamente, conociendo su grado de desacetilación.

2.3.2. Desproteínización

Después de descongelar los restos de pluma de pota trozada, se colocaron dentro del reactor piloto de 75 L de la PUCP y se adicionó una solución de NaOH al 10% w/v en relación 1:15 (kg pluma de pota: solución NaOH). La reacción procede durante un periodo de 90 minutos con temperaturas entre 50 °C a 70 °C con una velocidad de agitación de 125 rpm.

El sólido es filtrado y lavado con agua hasta alcanzar el pH del agua de lavado. La solución alcalina es colectada para ser utilizada en otros procesos.

2.3.3. Desacetilación

La quitina desproteínizada es nuevamente tratada con una solución de NaOH más concentrada (50 %) a 100 °C durante 1 a 6 horas. El quitosano fue filtrado y lavado hasta pH neutro y se secó a temperatura ambiente. Al variar el tiempo de reacción se obtienen quitosanos de diversos grados de desacetilación.

Los parámetros utilizados en los procesos anteriormente descritos se presentan en la tabla 2:

Tabla 2. Condiciones empleadas para la obtención del quitosano

Condiciones de Desproteínización				
Materia Prima	[NaOH] %	Tiempo (min)	Relación w/v	Temperatura
Pluma de pota	10	90	1:15	60 °C
Condiciones de Desacetilación				
Qno. obtenido	[NaOH] %	Tiempo (min)	Relación w/v	Temperatura
Muestra Q12	50	2 etapas de 180 min	1:15	100 °C
Muestra Q13	50	360	1:15	100 °C

2.3.4. Purificación de quitosano

El quitosano fue disuelto en una solución de ácido acético 1% v/v la cual se microfiltró (equipo de filtración 0,45 μ m Sartorius) para desechar las impurezas presentes y el quitosano fue precipitado con una solución de NaOH 1M hasta pH 9 observándose la aparición de un sólido blanco. El quitosano purificado fue percolado sobre mallas (elemento filtrante NMO 50 AGF), congelado y secado por liofilización.

2.4. Caracterización de quitosanos

Se evaluaron parámetros fisicoquímicos para identificar el quitosano resultante. En las muestras de quitosano purificadas se analizó el grado de desacetilación y se determinó el contenido de cenizas, humedad, densidad, viscosidad, peso molecular y contenido de nitrógeno.

2.4.1. Grado de desacetilación

El GD fue evaluado por ^1H -RMN de acuerdo al método descrito por Lavertu y col. [70]. Se utilizó 4 mg de quitosano disuelto en 1,5 mL de D_2O y dos gotas de HCl concentrado; la solución se evaluó en el espectrómetro Bruker AC300 de 300 MHz a 70 °C de temperatura calculando el GD de acuerdo a las intensidades de los diferentes picos obtenidos.

De acuerdo al GD se puede observar los picos característicos en diferentes intensidades. Por ello, dependiendo de la intensidad de los picos, la literatura proporciona ecuaciones donde intervienen los protones más característicos como se observa en la figura 6.

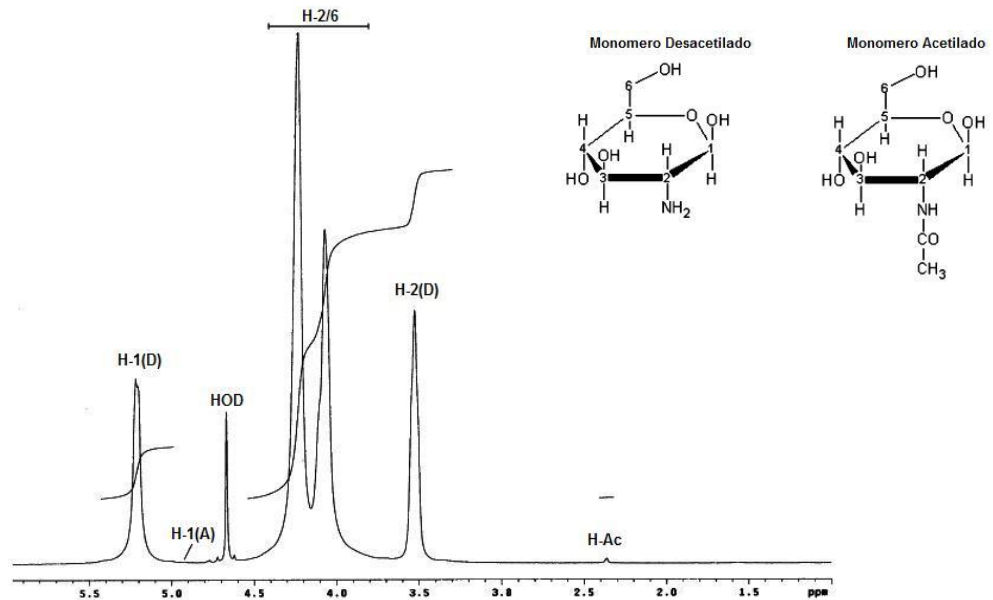


Figura 6. Espectro ^1H -RMN de quitosano [71].

Puede ser calculado por la integración del pico del protón H1 del monómero desacetilado (H1D) y el pico de los tres protones del grupo acetilo (HAc):

$$\text{GD}\% = \left(\frac{\text{H1D}}{\text{H1D} + \frac{\text{HAc}}{3}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Para quitosanos con GD menores a 90% también puede ser calculado el GD utilizando los picos del protón H1 tanto del monómero acetilado (H1A) como el desacetilado (H1D):

$$\text{GD}\% = \left(\frac{\text{H1D}}{\text{H1D} + \text{H1A}} \right) \times 100 \quad (2)$$

2.4.2. Determinación de cenizas

Se determinaron gravimétricamente; las muestras de quitosano previamente pesadas se sometieron a combustión en mufla a 800 °C durante 6 horas, luego se pesó el residuo determinándose el porcentaje de cenizas de acuerdo a la ecuación 3:

$$\%C = \frac{W_{\text{crisol+cenizas}} - W_{\text{crisolvacío}}}{W_{\text{muestra seca}}} \times 100 \quad (3)$$

donde: % C: porcentaje de cenizas
 W: peso

2.4.3. Densidad

La determinación de la densidad de los quitosanos se hizo en forma gravimétrica en comparación con la densidad del agua destilada y del buffer acetato. Se utilizó una fiola volumétrica de 5 mL, la cual fue enrasada con el líquido y pesada en la balanza analítica. Se realizó por cuadruplicado para todas las muestras. Se realizó el cálculo de acuerdo a la ecuación:

$$\text{Densidad} = \frac{M_{\text{liq}}}{V_{\text{fiola}}}$$

donde:

M_{liq} : peso del líquido (g)

V_{fiola} : volumen de líquido en la fiola enrasada (mL)

2.4.4. Viscosidad y peso molecular

Se obtuvo el peso molecular promedio a partir de la relación de la viscosidad intrínseca con el peso molecular de acuerdo a la ecuación de Mark-Houwink.

Para la obtención de la viscosidad intrínseca se utilizó el viscosímetro de Ostwald utilizando la ecuación 4:

$$\eta = B\rho t \quad (4)$$

donde: η : viscosidad de la solución acuosa ácida
 B: constante del viscosímetro
 ρ : densidad de la solución
 t: tiempo de flujo

Después de hallar la constante del viscosímetro y la viscosidad de la solución, se hallaron las diferentes constantes viscosimétricas presentadas en la tabla 3:

Tabla 3. Constantes viscosimétricas

SÍMBOLO	NOMBRE	UNIDADES
H	Viscosidad de solución	P (poises) Pa.s (Pascal por segundo)
η_s	Viscosidad del solvente	P o Pa.s
$\eta_r = \eta / \eta_s$	Viscosidad relativa	Adimensional
$\eta_e = \eta_r - 1$	Viscosidad específica	Adimensional
η_e / C	Viscosidad reducida	L/g
$[\eta]$	Viscosidad intrínseca	L/g

Luego se utilizó la Ecuación de Huggins para relacionar la viscosidad reducida con la concentración y hallar la viscosidad intrínseca ($[\eta]$)

$$\eta_e / C = [\eta] + K[\eta]^2 C \quad (5)$$

Finalmente, con la Ecuación de Mark Houwink cuyas constantes dependen del grado de desacetilación del quitosano se obtuvo el peso molecular promedio [71, 72]:

$$[\eta] = k (M_v)^\alpha \quad (6)$$

donde: $k = 1,64 \times 10^{-30}$ (%GD)
 $\alpha = 1,82 - 1,02 \times 10^{-2}(\%GD)$
 M_v : Peso molecular medido por viscosidad

2.4.5. Contenido de nitrógeno

Se usó el método Kjeldahl detallado de acuerdo a la norma ISO 5983-1997 en donde se relaciona la muestra problema de quitosano con una muestra estándar de sacarosa, de acuerdo a la ecuación 7 [73]:

$$\%N = 1,4 \times \left(\underbrace{\frac{M_{\text{HCl}} \times V_{\text{HCl}} - M_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}}}{W_{\text{secode muestra}}}}_{\text{Quitosano}} - \underbrace{\frac{M_{\text{HCl}} \times V_{\text{HCl}} - M_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}}}{W_{\text{secode muestra}}}}_{\text{Blanco}} \right) \quad (7)$$

donde: %N: porcentaje de nitrógeno

M: molaridad

V: volumen

W: peso

2.4.6. Contenido de humedad

Fue determinado por gravimetría de acuerdo a la norma ASTM F 2103-01 [74]. Se colocó una muestra de quitosano en la estufa a 105 °C durante 3 horas hasta que el peso fue constante. Se midió el porcentaje de humedad de acuerdo a la diferencia de peso entre la muestra inicial y la muestra seca, según la ecuación 8:

$$\%H_2O = \frac{W_{\text{inicial}} - W_{\text{final}}}{W_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (8)$$

donde: %H₂O: porcentaje de humedad

W_{inicial}: peso de muestra inicial (g)

W_{final}: peso de muestra final (g)

2.5. Preparación de películas de quitosano

Se prepararon con concentraciones de quitosano purificado entre 0.5% a 0.8% en ácido láctico al 1% y 2% w/v,. Las soluciones se depositaron en placas Petri, las

cuales se llevaron a refrigerar a 4 °C durante tres horas para eliminar burbujas y luego fueron secadas en estufa a temperaturas entre 40 °C y 70 °C durante 16 horas a 24 horas.

2.6. Preparación de películas de quitosano y alginato

El alginato fue disuelto del mismo modo que las películas de quitosano en ácido láctico al 1% y 2% w/v. Para realizar el entrecruzamiento se prepararon soluciones quitosano-alginato en diferentes relaciones (1:1, 1:2, 2:1 v/v) se colocó el polímero de mayor volumen en un vaso de precipitados y se añadió gota a gota el polímero en menor volumen, con agitación constante para lograr una mezcla turbia de los polímeros. Luego, se depositó la mezcla en placas petri, se eliminaron las burbujas con vibración, fue refrigerada a 4 °C y secada a 60 °C durante 16 horas.

2.7. Preparación de películas cargadas con sulfadiazina de plata

Se analizó la solubilidad del fármaco con pureza de 98% en diversos medios. Luego se disolvió el fármaco, en una solución de quitosano en ácido láctico, la mezcla se agitó y con ella se prepararon las películas siguiendo la metodología descrita anteriormente.

Del mismo modo, se disolvió el fármaco en la solución quitosano-alginato y se prepararon las películas de acuerdo al método anterior.

Se consideró como una muestra adicional para el estudio de liberación de fármaco una crema de sulfadiazina de plata al 1% (nombre comercial Silverdiazina, marca MEDCO), empleada en el tratamiento común de heridas por quemadura, insoluble en agua.

2.8. Evaluación de la cinética de liberación de sulfadiazina de plata in vitro

La sulfadiazina de plata presenta un grupo cromóforo con λ_{\max} sobre 240 nm. Este hecho permite hacer el estudio de la cinética de liberación de la droga evaluando la concentración de sulfadiazina en el medio por espectroscopia UV-Vis a diferentes tiempos del proceso de liberación [75].

Se preparó una curva de calibración del fármaco en el medio, obteniendo la ecuación lineal para determinar la concentración de fármaco liberada por las diferentes matrices.

Se evaluó la liberación de la droga a partir de la matriz polimérica, en el equipo Dissolution Tester VK 7020 por el método de la canastilla: se cortaron muestras de películas de quitosano cargadas con sulfadiazina de 1cm por 1cm, las cuales fueron depositadas en una canastilla de acero inoxidable y sumergidas en un buffer fosfato a pH 9,1 preparado con fosfato disódico de hidrógeno disuelto en agua y con ajuste de pH con hidróxido de sodio 1M a 37°C con agitación controlada de 50 rpm [76]. Iniciado el proceso, se tomaron alícuotas de 10 mL de la solución receptora de la sulfadiazina durante diferentes intervalos de tiempo haciendo uso de la cánula colectora de muestras. Se evaluó la concentración del fármaco liberado mediante control cuantitativo de su concentración por espectroscopía UV-Vis.

Las variables a estudiar en esta etapa fueron: concentración del fármaco y la matriz de liberación con diferentes pesos moleculares y grados de desacetilación.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Obtención de quitosanos

A partir de pluma de pota congelada y picada, se realizó la desproteínización de la muestra. El proceso de desacetilación se efectuó a diferentes tiempo de reacción obteniéndose dos muestras de quitosano de diferentes grados de desacetilación: en la primera muestra (Q12) se realizó la desacetilación en una sola etapa; en la segunda muestra (Q13) en dos etapas, esto para permitir un mayor GD. De una muestra de quitina de pota se obtuvo un rendimiento del 85,7% de quitosano.

3.2. Purificación y caracterización

3.2.1. Purificación de quitosano

El quitosano obtenido de la quitina de pota se muestra como gránulos de color blanco amarillento. Con estas características ya puede ser utilizado para otras aplicaciones, pero en nuestro caso, debe ser purificado para prevenir incompatibilidades con la piel. A partir de soluciones de quitosano al 0,3% p/v en ácido acético al 1% v/v se obtuvo mediante el proceso descrito en la parte experimental un polvo fino blanquecino e inodoro, insoluble en agua y soluble en soluciones ácidas. En el caso de la purificación, se obtuvo un rendimiento del 57%.



a) b)

Figura 7. Quitosanos a) sin purificar y b) purificado.

3.2.2. Caracterización de quitosanos

3.2.2.1. Grado de desacetilación (GD)

El quitosano purificado fue disuelto bajo agitación constante en D₂O acidificada, se observó inicialmente el hinchamiento del polímero y luego su perfecta disolución posterior.

Con esta solución se obtuvo el espectro de ¹H-RMN y en base a él se calcula el GD.

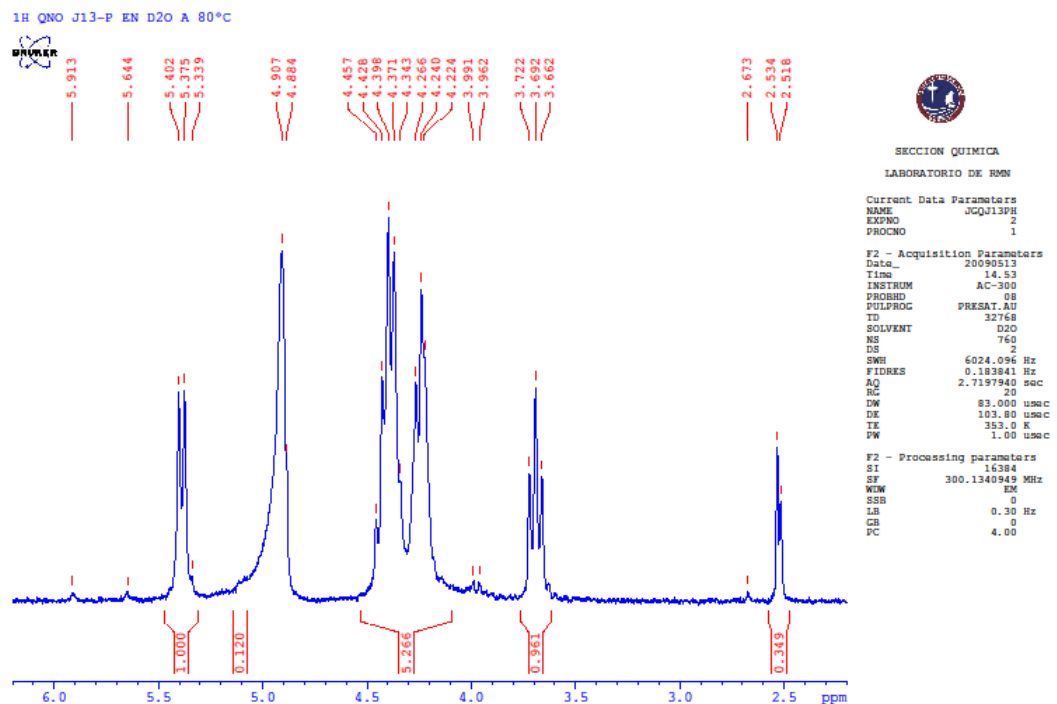


Figura 8. Espectro ¹H-RMN de Quitosano Q13 en RMN de 300 MHz con D₂O

La integración de los picos se hizo tomando como referencia la intensidad de la señal del hidrógeno del carboxilo del monómero desacetilado H1(D) que aparece entre 5 ppm a 5,5 ppm.

En la muestra Q13 el pico de la señal del H del grupo acetilo es intensa y es usada para la determinación del grado de desacetilación aplicando las fórmulas descritas en la parte experimental.

Los resultados se muestran a continuación:

Tabla 4. Grado de desacetilación de Q12 y Q13 a partir de los espectros de ^1H -RMN

	Protones					
	H1D	H1A	H2D	H-Ac	H2-6	GD (%)
Q12	1,0	0,16	0,62	4,55	3,99	86,21
Q13	1,0	-	0,96	0,35	5,27	89,55

Los quitosanos, al presentar grados de desacetilación mayores al 86%, son considerados como de alto GD. Como el porcentaje de grupos N-acetilo que quedan en el polímero es menor, aumenta la solubilidad del quitosano en soluciones ácidas. Esta característica permite que la hidratación de los polímeros produzca el hinchamiento de la película, se incorpore el líquido del medio al interior de la matriz y provoque la liberación del fármaco.

3.2.2.2. Densidad

La determinación de la densidad de los quitosanos se hizo en forma gravimétrica en comparación con la densidad del agua destilada y de la solución buffer 0,05M de acetato de sodio y 0,05M de ácido acético (Tabla 5).

Tabla 5. Densidad de las muestras Q12 y Q13 a 18 °C

Muestra	Dmuestra (g/cm ³)
H ₂ O	1,0046
Buffer	1,0009
Q12 – 1	1,0072
Q12 – 2	1,0031
Q12 – 3	1,0002
Q12 – 4	0,9980
Q12 – 5	0,9962
Promedio Q12	1,0009
Desv. Est. Q12	0,004

Muestra	Dmuestra (g/cm ³)
H ₂ O	1,00456
Buffer	1,01294
Q13 - 1	1,01088
Q13 - 2	1,00682
Q13 - 3	1,00292
Q13 - 4	1,00064
Q13 - 5	1,01676
Promedio Q13	1,0076
Desv. Est. Q13	0,006

3.2.2.3. Viscosidad y peso molecular

La viscosidad de las soluciones de quitosanos Q12 y Q13 fue evaluado para cuatro concentraciones diferentes por cuadruplicado en base al tiempo de evacuado del viscosímetro de Ostwald de acuerdo a la Tabla 6.

Tabla 6. Datos para viscosidades de las muestras Q12 y Q13 a 30°C

Muestra	Concentración (g/mL)	Tiempo promedio (s)	Desv. Est. Tiempo (s)	Viscosidad (Poise)
H ₂ O	-	33,3775	0,22	7,977
Buffer acetato	-	33,8175	0,23	8,151
Q12 - 1	0,00502	104,7875	0,29	25,618
Q12 - 2	0,00251	59,925	0,36	14,592
Q12 - 3	0,00126	43,7625	0,09	10,625
Q12 - 4	0,00063	37,4375	0,34	9,069

Muestra	Concentración (g/mL)	Tiempo promedio	Desv. Est. Tiempo (s)	Viscosidad (Poise)
H ₂ O	-	32,03	0,37	7,977
Buffer acetato	-	33,61	0,37	8,442
Q13 - 1	0,005	385,48	0,38	98,953
Q13 - 2	0,0025	125,24	0,36	31,896
Q13 - 3	0,00125	71,94	0,49	18,263
Q13 - 4	0,000625	50,55	0,25	12,795

La viscosidad reducida se determinó aplicando la ecuación lineal de η_r/C vs. C :
A continuación se muestran los resultados para los quitosanos Q12 y Q13:

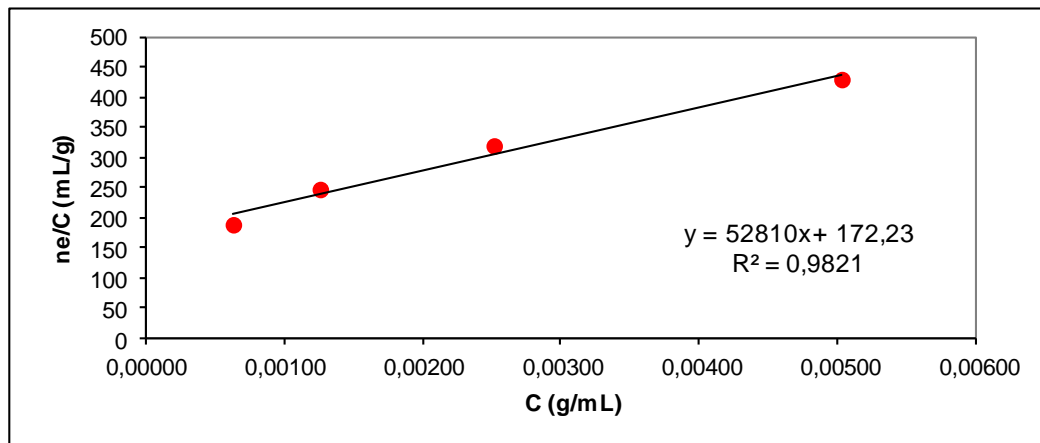


Figura 9. Gráfica de η_r/C vs. C para el quitosano Q12

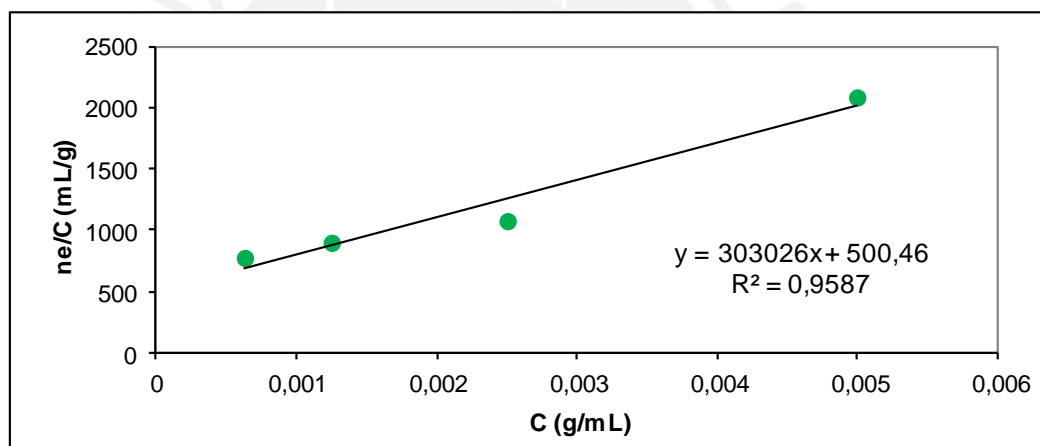


Figura 10. Gráfica de η_r/C vs. C para el quitosano Q13

Los resultados de densidades y viscosidades confirman que a medida que la concentración del quitosano disminuye, los tiempos promedio, la densidad y la viscosidad intrínseca también disminuyen.

La ecuación de Mark-Houwink, que considera valores propios de k y α en función al grado de desacetilación y conociendo la viscosidad intrínseca $[\eta]$ obtenida de las figuras 9 y 10 como el componente independiente de la recta, se emplea para calcular el peso molecular promedio de las muestras.

Tabla 7. Variables viscosimétricas para quitosanos Q12 y Q13

	Qno Q12 (Fig. 9)	Qno Q13 (Fig., 10)
[η]	172,23	536,34
k	0,0021	0,0035
α	0,9407	0,9066
Mv (kDa)	171,42	486,20

Como resultados se tiene que el quitosano Q12 de peso molecular promedio 171,42 kDa corresponde a un quitosano de bajo peso molecular, mientras que el quitosano Q13 corresponde a un quitosano de peso molecular medio de 486,20 kDa.

3.2.2.4. Contenido de nitrógeno, cenizas y humedad

La determinación del contenido de nitrógeno de acuerdo al método Kjeldahl, dio como contenido de nitrógeno un valor de 5,48% para el quitosano Q12 y 6,98% para Q13. El nitrógeno presente en las muestras corresponde al átomo de nitrógeno del grupo amino de su estructura. El porcentaje de cenizas y humedad se determinaron por métodos gravimétricos; los resultados se presentan a continuación en la tabla 8.

Tabla 8. Humedad, cenizas y nitrógeno de quitosanos Q12 y Q13

Muestra	Viscosidad	% GD	PM (kDa)	% Cenizas	% Nitrógeno	% Humedad
Q12	163,36	86,21	162,05	0,44	5,49	9,72
	163,36	86,21	162,05	0,43	5,45	9,35
	163,36	86,21	162,05	0,42	5,51	9,89
Promedio	163,36	86,21	162,05	0,43	5,48	9,65
Desv.	-	-	-	0,0001	0,031	0,003

Muestra	Viscosidad	% GD	PM (kDa)	% Cenizas	% Nitrógeno	% Humedad
Q13	536,34	89,55	524,79	0,44	6,97	8,11
	536,34	89,55	524,79	0,46	6,96	8,33
	536,34	89,55	524,79	0,46	7,01	8,75
Promedio	536,34	89,55	524,79	0,45	6,98	8,40
Desv.	-	-	-	0,0116	0,026	0,003

Los valores de contenido de cenizas en ambos quitosanos son de 0,43% y 0,45%. Esto indica que el proceso de desmineralización realizado en otro tipo de

quitosanos no es necesario en el quitosano de pota, debido a su bajo contenido. Los valores del contenido de humedad de 9,65% y 8,40% debido a la alta capacidad de absorción de agua del quitosano que, sumada al alto porcentaje de humedad presente en la ciudad de Lima (80 – 100%) promueve a que este valor sea alto.

En el caso del quitosano comercial, de acuerdo a los datos del fabricante, el porcentaje de humedad es de 7,5% y el grado de desacetilación es de 80%. Siendo menores que los hallados en los quitosanos elaborados.

3.3. Elaboración de películas

Las soluciones de quitosano con ácido láctico al 2% resultaron poco viscosas, dando películas muy elásticas aunque difíciles de desmoldar de la placa petri porque eran muy finas.

Se comprobó además que, a temperaturas mayores de 60 °C las películas podían presentar burbujas y en el caso de los quitosanos Q12 y Q13, se tornaban de color amarillo oscuro, deduciendo que, por la alta temperatura, empiezan a quemarse.

Un resultado óptimo se obtuvo con las soluciones con ácido láctico al 1%, elaborando con los quitosanos Q12 y Q13, películas transparentes y elásticas, fáciles de cortar y muy maleables, mientras que con el quitosano comercial formó películas más rígidas y de color amarillo.

En la preparación de la solución quitosano:alginato se observó que, cuando la relación era 1:2 y 1:1, al momento de añadir el alginato se formaba una solución lechosa similar a la clara de huevo, y durante la agitación iba formándose una masa gelatinosa dentro de la solución de quitosano. En cambio, con la relación 2:1 la solución se volvió blanquecina pero homogénea, aunque con el transcurso del tiempo se observó que se iban formando cintas blancas dentro de la solución.

Para las películas formadas a partir del entrecruzamiento de quitosano con alginato de sodio, se observó que eran blanquecinas, de color no uniforme y elásticas. A alta temperatura se tornaba amarillenta y quebradiza.

3.4. Preparación de películas cargadas con el fármaco.

Fueron agregadas diferentes concentraciones del fármaco a las soluciones de quitosano, observando que a concentraciones mayores al 0,4% w/v las soluciones de quitosano se saturaban y el fármaco precipitaba en la solución.

Se prepararon entonces películas de quitosano cargadas con sulfadiazina de plata en concentraciones de 0,12% y 0,06% w/v.

Las películas con concentración de 0,12% eran rígidas y quebradizas, ya que la saturación del quitosano era alta, haciendo que la elasticidad del polímero disminuyera.

En el caso de las películas con concentraciones de 0,06% eran menos transparentes que las de quitosano puro pero mantenían la elasticidad, pudiendo ser manipuladas y cortadas sin quebrarse.

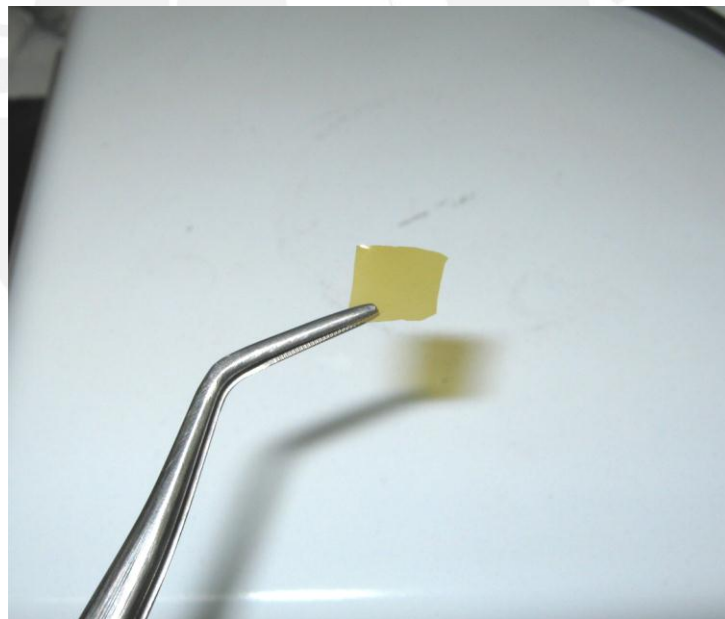


Figura 11. Película de quitosano cortada.

Con la solución de quitosano:alginate se elaboró una película cargada con sulfadiazina al 0,06%, pero la disolución del fármaco fue difícil y luego de preparada se obtuvo una película irregular, donde se observaba que la disolución del fármaco no fue óptima.

Además, las soluciones de quitosano y quitosano-alginato con sulfadiazina se oscurecen debido a la presencia de los iones plata del fármaco y su carácter fotosensible.

3.5. Estudio de liberación de sulfadiazina de plata (SDAg)

Para el estudio de liberación se prepararon películas de quitosano al 0,8% w/v con sulfadiazina de plata al 0,12% y 0,06% w/v en los dos tipos de quitosanos preparados en nuestro laboratorio y en el quitosano comercial, durante 24 horas.

En el caso de la crema de sulfadiazina de plata al 1% se colocó una cantidad determinada de crema en un soporte de teflón en contacto con la solución y se procedió a evaluar la liberación del fármaco bajo las mismas condiciones de las películas.

El espectro UV-Vis de una solución de sulfadiazina de plata en el buffer fosfato muestra un λ_{\max} de 240 nm (figura 12), en base a este dato se construyó la curva de calibración a partir de soluciones de sulfadiazina de diferentes concentraciones.

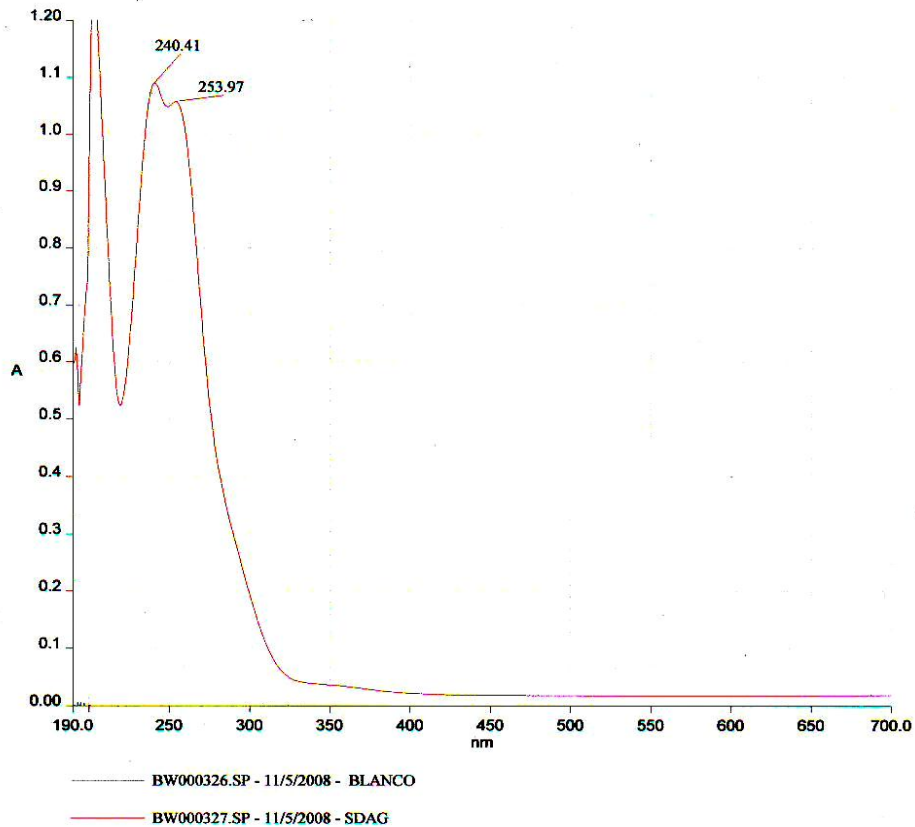


Figura 12. Espectro UV-Vis de sulfadiazina de plata

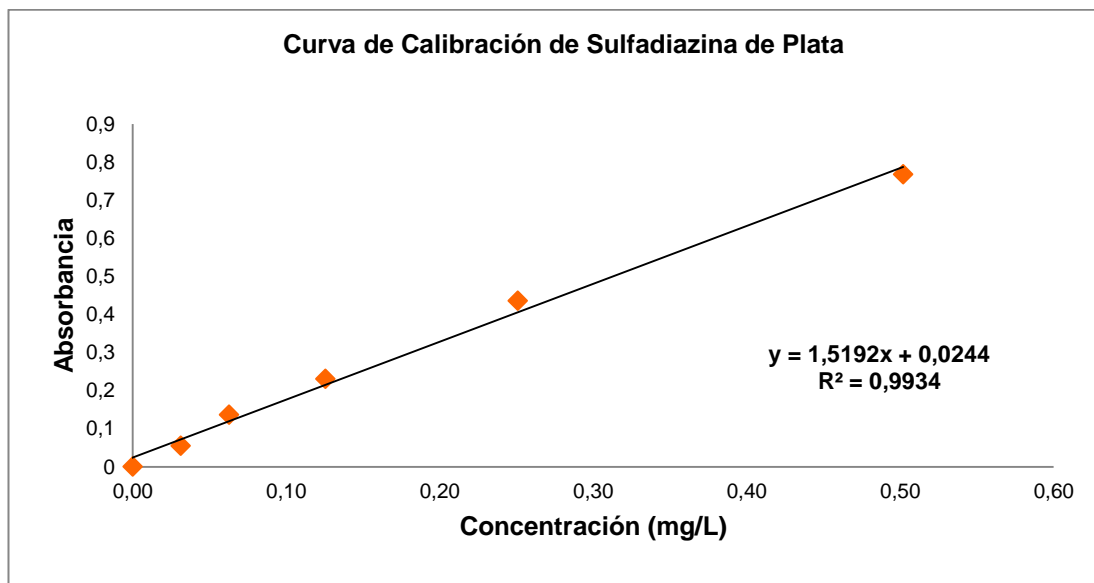


Figura 13. Curva de calibración de sulfadiazina de plata

Como se puede apreciar en la figura 13, la curva de calibración cumple con la ley de Lambert & Beer en el rango hasta 0,5 mg/L mostrando un alto índice de correlación, pudiendo con esto usarse para cuantificar concentraciones del fármaco en este rango.

Las películas de quitosano comercial cargadas con el fármaco, se estudiaron siguiendo el método descrito en la parte experimental. Se tomaron diez puntos a diferentes tiempos lográndose las curvas de liberación a partir de películas con concentraciones 0,06% y 0,12% de sulfadiazina.

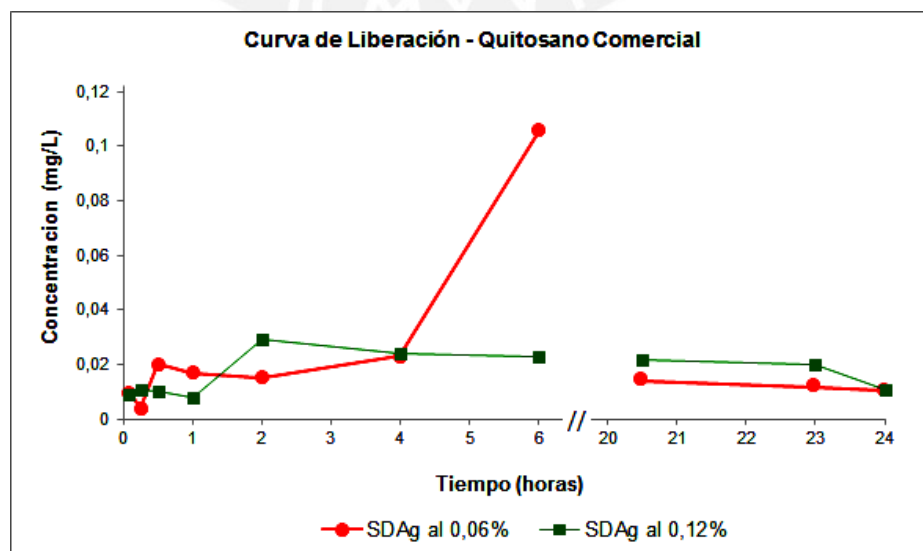


Figura 14. Curvas de liberación de sulfadiazina desde quitosano comercial

Se puede apreciar que con la película de quitosano comercial cargada con sulfadiazina al 0,06% la liberación alcanzó un proceso estable entre la hora 2 y la hora 4 en una muy baja intensidad. De la hora 4 a la hora 6 se presenta una liberación mayor, cayendo rápidamente hasta la hora 20 a partir de la cual se mantiene constante pero con un valor insignificante, mostrando un comportamiento no apto.

En el caso de la segunda película con concentración 0,12%, en las cuatro primeras horas se observa un comportamiento variable con máximos y mínimos, pero a partir de la hora 5 mantiene una liberación constante teniendo un valor similar en la hora 20. Es posible que con esta concentración de 0,12% se haya logrado mayor efectividad para los fines deseados.

El problema de las heridas por quemadura se centra en la necesidad de contar con una barrera que reduzca la pérdida de humedad y el ataque de microbios del medio ambiente. Las películas de quitosano poseen una excelente permeabilidad, permitiendo ser además de una barrera física un medio a través del cual la herida “respire”. El siguiente requisito es que la herida mantenga contacto permanente con el medicamento, esta cualidad no es posible con los apósitos tradicionales en base a gasas en los cuales se produce gran exudación, razón por la que deben ser removidos con mucha frecuencia. En este proceso el nuevo epitelio formado sobre la herida es removido causando períodos de curación muy largos y manteniendo el remedio en periodos cortos.

Las películas de quitosano han demostrado poseer cualidades como: permeabilidad al vapor de agua y bioadhesión adecuadas, además de su biocompatibilidad y excelentes propiedades mecánicas. Estas cualidades fueron comprobadas en una investigación previa en nuestro grupo de investigación [77].

Al analizar los resultados logrados con el material polimérico preparado en nuestro laboratorio, se observa que las películas de Q12 presentan una etapa inicial en las primeras 4 horas en las que el metabolito liberado entra en equilibrio con la película soporte. Después de ese tiempo, se inicia un proceso de liberación bastante sostenido que permitirá mantener concentraciones de sulfadiazina en el orden de 0,025 mg/L cuando la concentración dentro de la matriz era de 0,12 mg/L. Este proceso mantiene un perfil casi constante que se vuelve más adecuado en el caso de la concentración de 0,06 mg/L aunque la concentración liberada es menor.

Al comparar los resultados del proceso de liberación del fármaco en Q13, se observa que esta matriz presenta inicialmente el período de equilibrio, pero después de las 4 horas desarrolla una liberación con perfil de incremento de 0,016 hasta 0,032 mg/L, siendo óptimo el perfil de este tipo de película de quitosano cargada con concentración 0,12 mg/L para mantener un proceso de liberación controlada prácticamente las 24 horas.

La investigación ha permitido definir qué películas de quitosano con GD mayores de 86% y de peso molecular medio con concentraciones de 0,12% de fármaco presentan una eficaz liberación de sulfadiazina de plata por 24 horas.

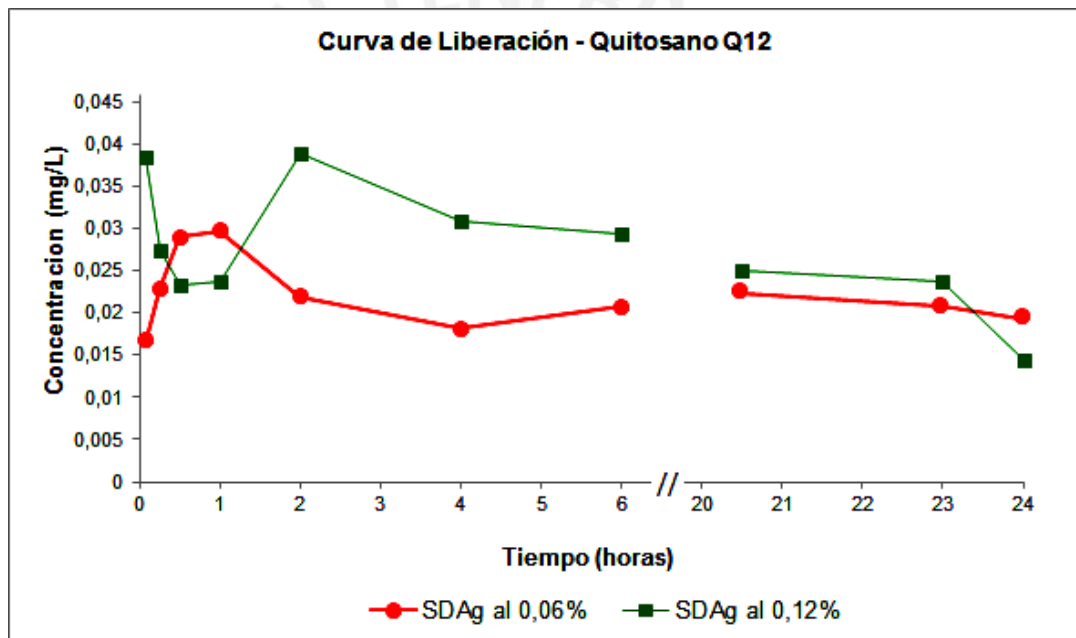


Figura 15. Curvas de liberación de quitosano Q12

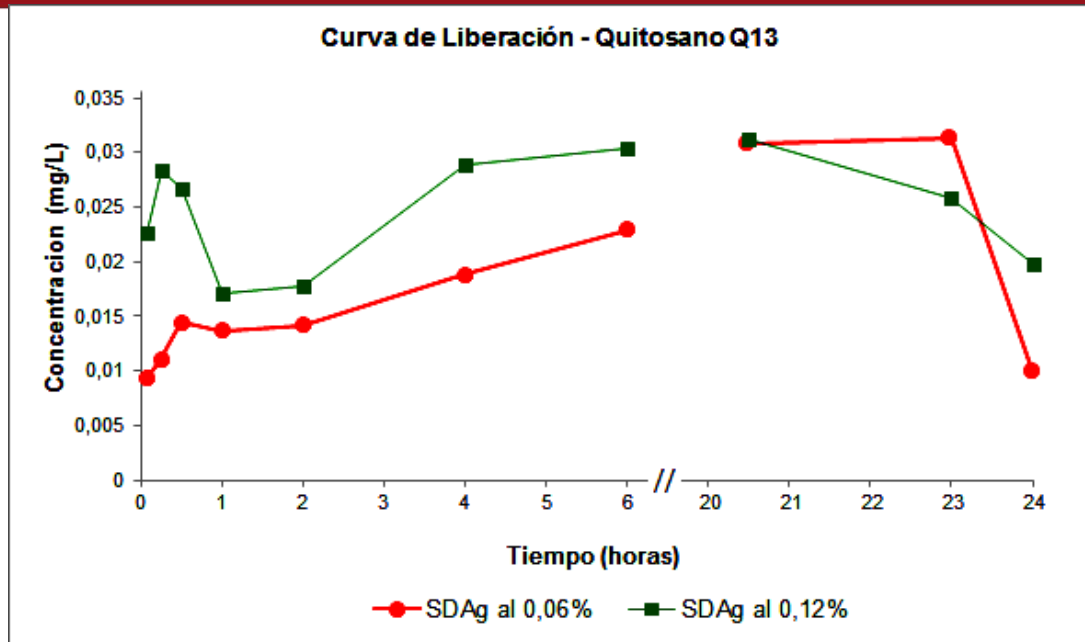


Figura 16. Curvas de liberación de quitosano Q13

En el caso de la crema con sulfadiazina al 1% se aprecia una liberación permanente hacia el medio, aunque la forma de aplicación exige que dicha crema sea soportada por gasas, las cuales deben ser removidas varias veces al día, perjudicando la formación del nuevo epitelio. Por otro lado, las altas concentraciones de sulfadiazina provocan reacciones alérgicas obligando a mantenerla en contacto con la herida por periodos cortos en contraste con las películas que se propone las cuales pueden permanecer mucho tiempo, permitiendo un constante contacto entre herida y fármaco a bajas concentraciones.

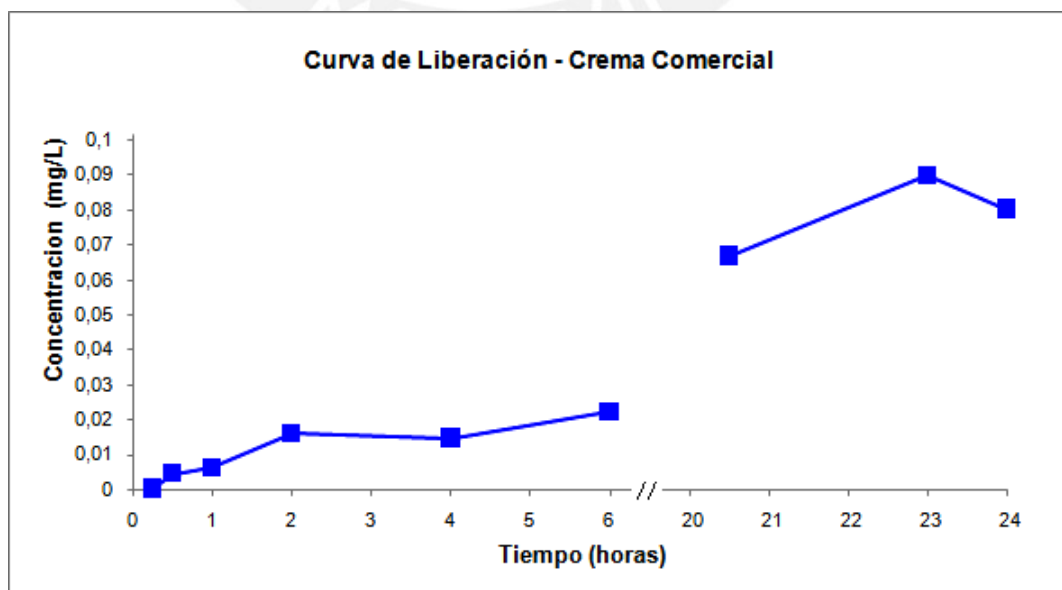


Figura 17. Curva de liberación de sulfadiazina a partir de crema comercial.

En la liberación del fármaco a partir de las películas de quitosano-alginato, la concentración liberada inicialmente al medio es mucho mayor que en los quitosanos solos, pero a medida que transcurre el tiempo la liberación baja hasta obtener absorbancias fuera del rango de la curva de calibración por lo que se observan valores negativos en las concentraciones. En las últimas horas de liberación, la concentración sigue disminuyendo por debajo del valor mínimo de la curva de calibración.

Este perfil de liberación confirma que la sulfadiazina no fue cargada en la película de forma adecuada; el fármaco pudo adherirse superficialmente y por ello la liberación inicial fue mayor. Luego de media hora, ya había sido removido de la película, quedando pequeñas cantidades que fueron liberándose en las horas posteriores; finalmente, entre la hora 21 y 24 aún había una liberación de fármaco mínima, que pudo deberse a pequeñas concentraciones de fármaco presentes en el polímero que si llegó a interactuar aunque en menor concentración que las películas de quitosano solo.

Entre los polímeros entrecruzados, el de quitosano Q12 con alginato tuvieron una mayor concentración de fármaco liberado. Además a partir de la hora 2 se observa que tiene una liberación más estable y durante las horas 21 y 24 mantiene una liberación constante pero muy baja.

La película entrecruzada con quitosano Q13 tiene una tendencia similar, aunque las concentraciones liberadas disminuyen rápidamente y son mucho menores que las de Q12.

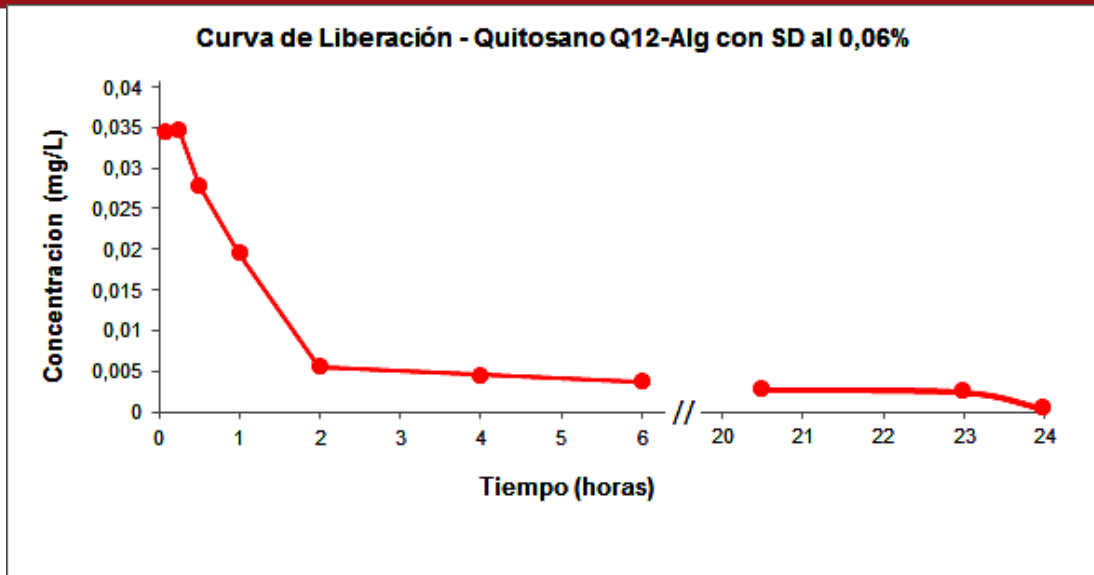


Figura 18. Curva de liberación de sulfadiazina desde película de quitosano Q12 con alginato de sodio.

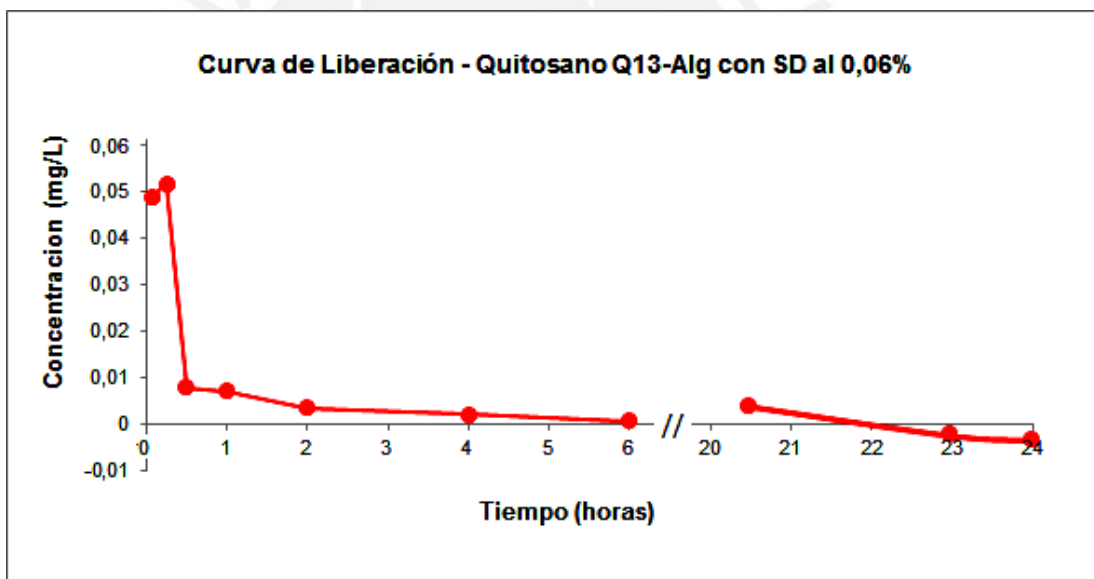


Figura 19. Curva de liberación de sulfadiazina desde película de quitosano Q13 con alginato de sodio.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se definieron las condiciones de obtención de quitosanos de pota y se caracterizó de acuerdo a parámetros de viscosidad, contenido de nitrógeno, densidad y peso molecular, seleccionando los denominados Quitosano 12 y Quitosano13. El grado de desacetilación GD, fue determinado por espectroscopía $^1\text{H-RMN}$ y el peso molecular mediante su relación con la viscosidad intrínseca obteniendo los valores promedio de GD de 86,21% y 89,55% para el Quitosano 12 y PM de 162,05 y 524,79 para el Quitosano 13.
- Los quitosanos producidos en el laboratorio fueron utilizados para la formación de películas y comparados con películas formadas a partir de un quitosano comercial con GD de 80% produciendo, en el caso de los quitosanos de laboratorio, películas transparentes y elásticas, mientras que en el quitosano comercial las películas formadas fueron más rígidas y amarillentas.
- La sulfadiazina de plata es soluble hasta una concentración de 0,4% p/v en una solución de quitosano en solución acuosa de ácido láctico al 1%. De acuerdo a esto, se prepararon películas con concentraciones de sulfadiazina de plata al 0,12% y 0,06% p/v en relación con la solución de quitosano utilizada, ya que a mayor concentración del fármaco aumenta la rigidez de la película y se observó que estas concentraciones proporcionaban todavía una maleabilidad adecuada.
- Se evaluó la liberación del fármaco sulfadiazina de plata mediante el método de la canastilla a pH 9,1 para simular el pH de una herida producida por quemadura durante las primeras 24 horas. Para todas las películas de quitosano se observó un perfil similar de liberación y aquellas películas con concentraciones de fármaco de 0,12% tuvieron liberaciones más altas que aquellas con concentraciones de 0,06%, dando resultados consistentes. La película de quitosano **Q13** con sulfadiazina de plata al 0,12% resultó ser la más adecuada ya que mantiene una liberación a altas concentraciones y con un perfil más parejo que las otras películas durante los intervalos de tiempo medidos.

- Se ensayaron las películas de quitosano-alginato y la liberación de la sulfadiazina de plata desde esta matriz, donde se comprobó que el fármaco no fue disuelto por completo y que esta mezcla de polielectrolitos no es adecuada para el uso como matriz de liberación de este fármaco. Al preparar las películas se observó que eran quebradizas, lo que impide que sean útiles como apósito por su rigidez; además la textura era gruesa, a diferencia de las películas de quitosano solo, y se podían observar que el fármaco no había sido disuelto totalmente. Esto se comprobó al observar que a la primera hora se tuvo una liberación alta de hasta 0,035 mg/L y que entre las 20 y 24 horas, las liberaciones eran mínimas y con concentraciones por debajo de la curva de calibración, lo que indica que la liberación fue rápida y debida al fármaco que quedó en la superficie de la película en forma de grumos y no por la interacción fármaco-matriz.
- Finalmente, comparando la liberación desde películas de quitosano con la liberación a partir de la crema comercial Silverdiazina®, se comprueba que esta última tiene una liberación lineal. Durante las primeras seis horas las concentraciones de liberación son menores que las observadas en el quitosano Q13, pero entre las 20 y 24 horas se hallaron concentraciones de hasta 0,1 mg/L, muy superior a las obtenidas en Q13 en ese intervalo (0,03 mg/L), lo que podría ocasionar reacciones adversas en el paciente si el tratamiento es prolongado, lo que se evitaría con el uso de quitosano como matriz de liberación del fármaco.

4.2. Recomendaciones

1. Para complementar los estudios de las películas se recomienda evaluar *in vitro* para demostrar si existe o no alguna reacción inflamatoria y comprobar la biocompatibilidad.
2. Se recomienda además evaluar *in vivo* mediante pruebas de irritación dérmica y de regeneración dérmica.
3. Se recomienda emplear el método de preparación de películas con otros fármacos.

4. Se sugiere preparar quitosanos de menor peso molecular para estudiar la efectividad del entrecruzamiento con alginato y su eficacia en la liberación de otros fármacos.



5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] PALOMINO, Manuel
2001 "Fisiología de la piel". *Revista Peruana de Dermatología*.
Lima. Volumen 11, número 2.
Consulta: 25 de setiembre de 2012.
<http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/dermatologia/v11_n2/fisio_piel.htm>
- [2] HACHEM, J.P., Crumrine, D., Fluhr, J., Brown, B.E., Feingold K.R., Elias, P.M.
2003 "pH directly regulates epidermal permeability barrier homeostasis and stratum corneum integrity/cohesion". *Journal of Investigative Dermatology*. Volumen 121, número 2, pp. 345 – 353.
- [3] MERINO, Jesús y María José NORIEGA
s/a "Fisiología General". *Open course ware*. España: Universidad de Cantabria.
Consulta: 29 de setiembre de 2012.
<<http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/fisiologia-general/materiales-de-clase-1/bloque-ii/Tema%2011-Bloque%20II-La%20Piel.%20Estructura%20y%20Funciones.pdf>>
- [4] CHILDREN'S HOSPITAL BOSTON
s/a "Skin anatomy and conditions". *Overview* [imagen].
Consulta: 31 de Julio de 2011.
<<http://www.childrenshospital.org/az/Site784/mainpageS784P0.html>. Revisado: 31/07/2011>
- [5] PIRIZ CAMPOS, Rosa., DE LA FUENTE RAMOS, M.
2009 "Quemaduras". *Enfermería Médico Quirúrgica Tomo III*. Madrid, Editorial DAE, pp. 1123- 1137.
- [6] FERNÁNDEZ JIMENEZ, I., DE DIEGO GARCÍA, E.M., SANDOVAL GONZALEZ, F.

- 2001 "Quemaduras en la infancia. Valoración y tratamiento". *Boletín de la Sociedad de Pediatría de Asturias, Cantabria, Castilla y León*. Volumen 41, pp. 99-105
- [7] ANIQUEM- Asociación de Ayuda al niño quemado
s/a "Estadísticas de las Quemaduras". *Asociación de Ayuda al niño quemado – ANIQUEM*.
Consulta: 26 de setiembre de 2012
<<http://www.aniquem.org/quemados-hospitalizados.html>>
- [8] ALFARO DÁVILA, Miguel
2003 "Quemaduras". *Hospital San Juan de Dios. San José, Costa Rica*.
Consulta: 15 de setiembre de 2012.
<<http://www.binasss.sa.cr/quemaduras.pdf>>
- [9] PRUITT, Basil.
1998 "Burn Wound infections: Current status". *World Journal of Surgery*. Volumen 22, pp. 135-145.
- [10] OSTI, Enzo
2008 "Skin pH variations from the acute phase to re-epithelialization in burn patients treated with new materials (burnshield, semipermeable adhesive film, dermasilk, and hyalomatrix) non-invasive preliminary experimental clinical trial". *Annals of Burns and Fire Disasters*. Volumen XXI, número 2.
- [11] ANDRADES, Patricio
2005 "Cirugía plástica esencial", *Chile: Editorial Universidad de Chile*. 1ra edición, pp. 101.
- [12] DE LOS SANTOS, Carlos
s/a "Tratamiento moderno del cierre de la herida". *Guía básica para el tratamiento del paciente quemado: Capítulo Nueve*.
Consulta: 23 de julio de 2012
<http://www.indexer.net/quemados/tratamiento_quirurgico_de_la_herida_quemadura.htm>

- [13] LORENTE, José Angel y Andrés ESTEBAN
1998 "Cuidados intensivos del paciente quemado". España:
Editorial Springer-Verlag Ibérica, pp. 161.
- [14] SIGMA ALDRICH
s/a "Silver (I) sulfadiazine 98%". *Sigma Aldrich*
Consulta: 28 de febrero de 2008
<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/481181?lang=en®ion=PE>>
- [15] McDONNELL, Gerald. RUSSELL, A.D.
1999 "Antiseptics and disinfectants: Activity, action and resistance".
Clinical Microbiology Reviews. Volumen 12, número 1, pp.
147 - 149.
- [16] NESBITT, R.U. y B. J. Sandmann
1977 "Solubility Studies of Silver Sulfadiazine". *Journal of
Pharmaceutical Sciences*. Volumen 66, número 4, pp. 519 –
522
- [17] VIVES, E.A., VENTRIGLIA, M.V., MEDVEDOVSKY, D., ROTHLIN, R.
s/a "Quimioterápicos inhibidores de la síntesis de ácido
tetrahidrofólico". *Tercera cátedra de farmacología. Facultad
de medicina U.B.A.*
Consulta: 30 de setiembre de 2012
<<http://farmacomedia.files.wordpress.com/2010/05/quimiotera-picos-inhibidores-de-la-sintesis-de-acido-tetrahidrofólico.pdf>>
- [18] WELLS, T.N.C., SCULLY, P., PARAVICINI, G., PROUDFOOT, A.E.,
PAYTON, M.A.
1995 "Mechanism of irreversible inactivation of phosphomannose
isomerase by silver ions and Flamazine". *Biochemistry*.
Volumen 34, pp. 7896-7903.
- [19] DEGREEF, H., DOOMS-GOOSSENS, A.

- 1985 "Patch testing with silver sulfadiazine cream". *Contact Dermatitis*. Volumen 12, número 1, pp. 33-37.
- [20] FULLER, FW.
2009 "The side effects of silver sulfadiazine". *Journal of Burn Care & Research*. Volumen 30, número 3, pp. 464-470.
- [21] GRUNENTHAL
2001 "Folleto de información al paciente Platsul-A crema".
Consulta: 31 de julio de 2011
<http://www.grunenthal.cl/cms/cda/_common/inc/display_file.jsp?fileID=79900306>
- [22] SÁEZ, V., HERNÁEZ, E., SANZ ANGULO, L.
2004 "Mecanismos de liberación de fármacos desde materiales polímeros". *Revista Iberoamericana de Polímeros*. Volumen 5, número 1, 55 – 70.
- [23] ISHIZAWA, C. y NAKAMATSU, J.
2002 "Matrices Poliméricas para liberación controlada de sustancias activas". *Revista de Química. Pontificia Universidad Católica del Perú*. Volumen 26, número 1, pp. 13 – 23.
- [24] PRAUSNITZ, M., MITRAGOTRI, S., LANGER, R.
2004 "Current status and future potencial of transdermal drug delivery". *Nature Reviews*. Volumen 3, pp. 115 – 124.
- [25] MITRAGOTRI, S.
2004 "Breaking the skin barrier". *Advanced Drug Delivery Reviews*. Volumen 56, pp.555 – 556.
- [26] LANGER, Roger
2004 "Transdermal drug delivery: past progress, current status, and future prospects". *Advanced Drug Delivery Reviews*. Volumen 56, pp. 557 – 558.

- [27] LAREZ VELÁSQUEZ, C.
2006 "Quitina y Quitosano: Materiales del pasado para el presente y futuro". *Avances en Química*. Volumen 1, número 2, pp.15-21.
- [28] PASTOR DE ABRAM, Ana
2004 "Quitina y Quitosano: Obtención, caracterización y aplicaciones. Resultado del Proyecto CYTED IV. 14: Obtención de quitina y quitosano a partir de desechos de crustáceos". *Fondo Editorial PUCP*.
- [29] PETER, M.G.
2005 "Chitin and Chitosan in Fungi". *Biopolymers Online*.
Consulta: 14 de abril de 2011
<http://www.wiley-vch.de/books/biopoly/pdf_v06/bpol6005_123_132.pdf>
- [30] MING-TSUNG, Yen. YU-HSIU, Tseng. RUEI-CHIAN, Li. JENG-LEUN, Mau.
2007 "Antioxidant properties of fungal chitosan from shiitake stipes". *LWT-Food Science and Technology*, volumen 40, pp. 255-261.
- [31] Aranaz, I., MENGÍBAR, M., HARRIS, R., PAÑOS, I., MIRALLES, B., ACOSTA, N., GALED, G., HERAS, A.
2009 "Functional Characterization of chitin and chitosan". *Current Chemical Biology*. Volumen 3, número 2, pp. 203-230
- [32] PROMPERÚ
2011 "Informe Anual 2011: Desarrollo del comercio exterior pesquero". *Coordinación de Pesca y Acuicultura de la Sub Dirección de Promoción Comercial*.
Consulta: 11 de junio del 2012.
<<http://media.peru.info/siicex/resources/sectoresproductivos/D ESENVOLVIMIENTO%20DEL%20COMERCIO%20EXTERIO R%20PESQUERO%202011%20SIICEX.pdf>>

- [33] PERU.COM
2012 "Cuota de captura de pota será de 500 mil toneladas el 2012".
Peru.com. Lima, 24 de enero de 2012. Consulta: 14 de agosto
de 2012.
<<http://peru.com/2012/01/24/actualidad/economia-y-finanzas/cuota-captura-pota-500-mil-toneladas-2012-noticia-39384>>
- [34] STEVENS, W., CHEYPRATUB, P., HAIQING, S., LERTSUTTHIWONG, P.,
CHUEN HOW, Ng., CHANDRKRACHANG, S.
s/a "Alternatives in Shrimp Biowaste Processing". Consulta: 21
de setiembre de 2012.
<<http://www.aseanbiotechnology.info/Abstract/23002903.pdf>>
- [35] HONG KYOON, N., YOUNG IN, Cho. HYEUNG, R., MEYERS, S.
2000 "Effective Deacetylation of Chitin under Conditions of 15
psi/121 °C". Journal of Agricultural and Food Chemistry.
Volumen 48, número 6, pp. 2625–2627.
- [36] JUNG, Jooyeoun y ZHAO, Yanyun
2011 "Characteristics of deacetylation and depolymerization of β -
chitin from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) pens". *Carbohydrate
Research*. Volumen 346, número 13, pp.1876-84.
- [37] AUZÉLY, Rachel y Marguerite RINAUDO
2003 "Controlled Chemical Modification of Chitosan.
Characterization and Investigation of Original Properties".
Macromolecular Bioscience. Volumen 3, número 10, pp. 562-
565.
- [38] YU HERNANDEZ, P.
2004 *Efecto de la mezcla de plastificantes en las propiedades
físicas, mecánicas y de transporte de películas de quitosano*.
Tesis para obtención del título de Licenciatura en Ingeniería
de Alimentos, Universidad de las Américas Puebla. Consulta:
5 de abril de 2011.

- <http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lia/ya_h_p_a/>
- [39] FAO
2012 “Perspectivas alimentarias: Análisis del Mercado mundial – Mayo 2012”. *Food and Agriculture Organization (FAO)*. Consulta: 14 de setiembre de 2012
<<http://www.fao.org/docrep/015/al989s/al989s00.pdf>>.
- [40] FOOD AND DRUG ADMINISTRATION
“GRAS claim notification Primex Chitosan”. *Food and Drug administration*. Consulta: 23 de setiembre de 2012.
<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras_notices/grn000073.pdf>
- [41] SPAGNA, G., PIFFERI, P.G., RANGONI, C., MATTIVI, F., NICOLINI, G., PALMONARI, R.
1996 “The stabilization of white Wines by Adsorption of Phenolic Compounds on Chitin and Chitosan”. *Food Research International*. Volumen 29, pp. 241–248.
- [42] IMERI, A.G y KNORR, D.
1988 “Effect of chitosan on yield and compositional data of carrot and apple juice”. *Journal of Food Science*. Volumen 53, pp.1707–1709.
- [43] HUANG, Jin-ru., HUANG, Ch., HUANG, Y., CHEN, R.
2007 “Shelf-life of fresh noodles as affected by chitosan and its Maillard reaction products”. *Food Science and Technology*. Volumen 40, número 7, pp. 1287–1291.
- [44] GE, L., HONGYIN, H., KEPING, Ch., LONGCHUAN, M., ZHANLI, X.
2010 “Effect of chitin on the antagonistic activity of *Rhodotorulaglutinis* against *Botrytis cinerea* in strawberries and the possible mechanisms involved”. *Food Chemistry Journal*. Volumen 120, pp. 490–495.

- [45] BENAVENTE, M., MORENO, L., MARTINEZ, J.
2011 "Sorption of heavy metals from gold mining wastewater using chitosan". *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. Volumen 42, número 6, pp. 976 – 988.
- [46] ANCHISI, C., MELONI, M.C., MACCIONI, A.M.
2006 "Chitosan beads loades with essential oils in cosmetic formulations". *Journal of cosmetic science*. Volumen 57, pp. 205 – 214.
- [47] BALDRICK, Paul
2010 "The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient". *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. Volumen 56, número 3, pp. 290 – 299.
- [48] XIN-YUAN, Shi y TIAN-WEI Tan
2004 "New Contact Lens Based on Chitosan/Gelatin Composites". *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. Volumen 19, pp. 467-479.
- [49] LIU, H., BO, Ch., ZHENGWEI, M., CHANGYOU G.
2007 "Chitosan Nanoparticles for Loading of Toothpaste Actives and Adhesion on Tooth Analogs". *Journal of Applied Polymer Science*. Volumen 106, pp. 4248–4256.
- [50] WAIBEL, K.H., HANEY, B., MOORE, M., WHISMAN, B., GOMEZ, R.
2011 "Safety of Chitosan Bandages in Shellfish Allergic Patients". *Military Medicine*. Volumen 176, número 10, pp. 1153, 2011
- [51] KHOR, Eugene y YONG LIM, Lee
2003 "Implantable applications of chitin and chitosan". *Biomaterials*. Volumen 24, pp. 2339–2349.
- [52] BALAU, L., LISA, G., POPA, M.I., TURA, V., MELNIG, V.
2004 "Physico-chemical properties of Chitosan Films". *Central European Journal of Chemistry*. Volumen 2, número 4, pp. 638 – 647.

- [60] GONZALEZ, José M. y CORTES, Cristino
1979 "Pimiento paste". Número de patente: 4168325. Fecha de emisión: 18 Setiembre 1979.
- [61] SINGER, N., CHANG, H., TAMG, P., DUNN, J.
1990 "Carbohydrate cream substitute". Número de patente: 4911946. Fecha de emisión: 27 Marzo 1990.
- [62] IVANOVIC, S., MIKINAC, K., PERMAN, L.
2011 "Molecular gastronomy in function of scientific implementation in practice". *UTMS Journal of Economics*. Volumen 2, número 2, pp.139–150.
- [63] TØNNESEN, H. y KARLSEN, J.
2002 "Alginate in Drug Delivery Systems". *Drug Development and Industrial Pharmacy*. Volumen 28, número 6, pp.621-630.
- [64] SREVENS, Molly
2004 "A rapid-curing alginate gel system: utility in periosteum-derived cartilage tissue engineering". *Biomaterials*. Volumen 25, número 25, pp. 887-894.
- [65] LAWRIE, G., KEEN, I., DREW, B., CHANDLER-TEMPLE, A., RINTOUL, LI., FREDERICKS, P., GRØNDAHL, L.
2007 "Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers Characterized Using FTIR and XPS". *Biomacromolecules*. Volumen 8, pp. 2533-2541.
- [66] SHU-HUEI, Y., FWU-LONG, M., YU-BEY, W.
2005 "Antibacterial Activity of Chitosan-Alginate Sponges Incorporating Silver Sulfadiazine: Effect of Ladder-Loop Transition of Interpolyelectrolyte Complex and Ionic Crosslinking in the Antibiotic Release". *Journal of Applied Polymer Science*. Volumen 98, número 2, pp.538-549.

- [67] POULSEN J.
1968 "Effect of Tropical vehicle composition on the In Vitro Release of Fluocinolone Acetonide and its Acetate Ester". *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Volumen 57, número 6, pp. 928-933.
- [68] SIEWERT, M., DRESSMAN, J., BROWN, C., SHAH, V.
2003 "AAPS Guidelines to Dissolution/in Vitro Release Testing of Novel/Special Dosage Forms". *AAPS PharmSciTech*. Volumen 4, número 1, pp. 43-52.
- [69] HIGUCHI, T.
1963 "Theoretical Analysis of Rate of Release of Solid Drugs Dispersed in solid matrices". *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Volumen 52, número 12, pp. 1145-1149.
- [70] LAVERTU, M., SERREGI, A., BERRADA, M., RODRIGUES, A., WANG, D., BUSCHMANN, M., GUPTA, A.
2003 "A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan". *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. Volumen 32, pp. 1149 – 1158.
- [71] WANG, S.
1991 "Determination of the Mark Houwink equation for chitosans with different degree of deacetylation". *International Journal of Biological Macromolecules*. Volumen 13, pp. 281-285 1991.
- [72] ROBERTS, G.A.
1982 "Determination of the viscosimetric constants for chitosan. " *International Journal of Biological Macromolecules*. Volumen 4, pp.374-377
- [73] INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANDARIZATION
1997 ISO 5983-1997. Animal feeding stuffs – Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content – Kjeldahl method. *International Organization of Standarization*.

- [74] ASTM
2001 ASTM F 2103-01 Standard guide for characterization and testing of chitosan salts as starting materials intended for use in biomedical and tissue engineering medical product applications.
- [75] AZEVEDO E., SALDANHA, T., NAVARRO, M., MEDEIROS, A., GINANI, M., RAFFIN, F.
2006 “Mechanical Properties and release studies of chitosan films impregnated with Silver Sulfadiazine”. *Journal of Applied Polymer Science*. Volumen 102, pp. 3462 – 3470
- [76] SHABIR, G.
2003 “Validation of high-performance and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization”. *Journal of Chromatography A*. Volumen 987, pp. 57 – 66.
- [77] FUENTES YALLI, Lina.
2009 Preparación, caracterización y evaluación de películas de quitosano proveniente de calamar gigante *Dosidicus gigas* para uso médico. Tesis para optar por el grado de Maestría en Química. *Pontificia Universidad Católica del Perú*.