UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Diseño de una película de quitosán como sistema terapéutico farmacéutico alternativo para el tratamiento de úlceras cutáneas

ARIADNA LISBETH PULIDO BARRIOS

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, D.C. Colombia
2012

Diseño de una película de quitosán como sistema terapéutico farmacéutico alternativo para el tratamiento de úlceras cutáneas

ARIADNA LISBETH PULIDO BARRIOS

Tesis presentada como requisito para optar al título de:
Magister en Ciencias Farmacéuticas

Director (a):
Ph.D. Bibiana Margarita Vallejo

Línea de Investigación:
Aplicaciones farmacéuticas de biopolímeros
Grupo de Investigación:
Procesos de Transformación de Materiales para la Industria Farmacéutica

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, D.C. Colombia
2012

No puedo cambiar la
dirección del viento,
pero si ajustar las velas
para llegar siempre
a mi destino.
James Deam.

Agradecimientos

A Dios, por mostrarme a través de las personas, que por muy larga que sea la tormenta, el sol siempre volverá a brillar entre las nubes. Por darme además las herramientas para asumir esta etapa con perseverancia y culminarla alcanzando una estrella más en mi vida.

A mi familia:
Mi dulce y adorada madre en Ibagué, María Hilda Barrios Varón, por su constante motivación y su confianza, a mi cómplice y madre en Bogotá, Nancy Judith Osorio Barrios, por apoyarme constantemente y siempre tener un tiempo para escuchar, a mi hermanito Hannier por su orientación, colaboración y oportunos consejos, a mi hermanita Melissa por sus palabras de ánimo cada vez que las necesité, mi tío Willy por su apoyo constante. A todos ellos además, por su amor incondicional.

Al Posgrado de Ciencias Farmacéuticas del Departamento de Farmacia.
Al Grupo de Investigación Procesos de Transformación de Materiales para la Industria Farmacéutica.
Al Grupo de Investigación en Inmunotoxicología del Departamento de Farmacia.
Al Grupo de Investigación Estudio químico y de actividad biológica de *Miristicaceas* y *Rutaceas* colombianas del Departamento de Química y, a la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Colombia.

A los profesores del Departamento de Farmacia:
Bibiana Vallejo por su seguimiento en la realización de este trabajo,
Helber de Jesús Barbosa por su dedicación, aportes y observaciones,
Milton Josué Crosby por su ayuda, su motivación, y su amistad,
Javier García, por su paciencia al referir mis inquietudes y por sus palabras de ánimo para continuar,
Jaiver Eduardo Rosas por su paciencia y observaciones,
Jaime Rojas por sus recomendaciones y
Gabriela Delgado por permitirme hacer parte de su proyecto de investigación.

A las laboratoristas del Departamento de Farmacia:
Dianita y Claudia ante todo por su amistad, por su paciencia y por su valiosa colaboración.

A mis compañeros y amigos:
Jhon Jairo Pinzón Barrantes, por brindarme su hombro dándome apoyo durante la realización de este trabajo de investigación, por su constante colaboración y paciencia,
Lissy Marcella Núñez Arango, por sus palabras de apoyo y su constante ayuda,
Bibiana Cardozo, por darle un giro a los momentos difíciles,
Diego Mauricio Rivera, por sus recomendaciones y su importante ayuda,
Melissa Obando, por sus acertadas sugerencias,
Ronald Jiménez, por sus valiosos aportes,
Luz Andrea Gordillo, por su oportuna colaboración,
Rosita, por su amistad y por endulzar cada día de trabajo,
Daniel Delgado, por su colaboración.

Resumen

El objetivo principal del presente estudio consistió en el diseño de películas poliméricas de quitosán, como alternativa terapéutica en el transporte de sustancias activas para el tratamiento de úlceras cutáneas. Las películas fueron preparadas por la técnica de vertimiento en placa, optimizando las condiciones para su obtención. Se evaluó como sistema el polímero catiónico de quitosán con dos pesos moleculares, bajo y mediano, empleando dos solventes, ácido acético y ácido láctico para su preparación. Las películas poliméricas obtenidas, tanto con y sin fármaco (antimoniato de meglumina), fueron caracterizadas en función de sus propiedades mecánicas, de transporte y funcionales, encontrando en términos generales, que las preparaciones con el polímero de quitosán de mediano peso molecular en ácido láctico presentaron mejores características con respecto a las demás preparaciones. Dentro de las propiedades mecánicas se evaluó la resistencia a la ruptura por tensión, determinando a partir de ésta el modulo de Young, así las películas tanto de bajo como de mediano peso molecular en ácido láctico con fármaco, resultaron ser elásticas, mientras que las demás películas demostraron ser rígidas, en este estudio se predice que entre mayor elasticidad de las películas se podrán manipular mejor sobre los contornos de la piel lesionada. Como propiedad de transporte se evaluó la transferencia del vapor de agua, en cuyo caso la película de mediano peso molecular en ácido láctico con fármaco, demostró ser aquella que permite un mayor paso de agua a través de sí misma, de tal manera que la permeabilidad sería apta para tratar las lesiones cutáneas, al no mantener la herida demasiado húmeda, pero tampoco demasiado ocluida. Con el índice de hinchamiento se estudio la capacidad de transporte de un medio fisiológico a través del sistema, con la posibilidad de predecir el comportamiento para la liberación de una sustancia activa, encontrando que entre más acidez de medio de evaluación, la película tendrá mayor capacidad de hinchamiento. Fueron realizados ensayos de mucoadhesión para evaluar la adherencia de las películas sobre lesiones cutáneas, la película de elección fue aquella con mayor trabajo de adhesión. El perfil de liberación *in vitro* del antimoniato de meglumina se evaluó desde las películas con mejores características, comprobando la liberación de éste desde el sistema. Finalmente, se observó la funcionalidad de dicha película al evaluarse sobre un modelo animal de hámster dorado – *leishmania panamensis*. Los prototipos de películas obtenidas mostraron características aptas en el tratamiento de afecciones que involucran la presencia de úlceras cutáneas.

Palabras clave: películas poliméricas, quitosán, úlceras cutáneas, leishmaniasis, transporte

Abstract

The main goal of this study was about chitosan polymeric films design, as a terapeutic alternative in cutaneous ulcers treatment. Films were prepared by casting technique, improving the conditions for their obtainment. A cationic chitosan polymer in two molecular weights, low and medium, and in two solvents, acetic acid and lactic acid were used as the study system to prepare the films. The obtained polymeric films, with and without the active substance (meglumine antimoniate), were characterized by their mechanical, transport and functional properties, broadly speaking it was found that chitosan medium molecular weight in lactic acid, had the most appropriate characteristics regarding to all the preparations. Among mechanical tests, tensile test was evaluated determining Young's modulus, hereupon lactic acid films were elastic, whereas acetic acid films were rigid, in this study it is predicted that the more elastic is the film the more handling over the skin contours will be. Water vapor transmission was evaluated as a transportable property, chitosan medium molecular weight in lactic acid makes water vapor transmission better, having an appropriate permeability to treat cutaneous lesions, keeping the wound not excessive moist or dry. Swelling index was studied to evaluate the transport capacity of a physiological route through the system, predicting the active pharmaceutical ingredient release behavior, finding that a more acidic medium gives as a result a high swelling index. Mucoadhesion assays were tested to evaluate the films adherence on cutaneous lesions, film with highest adhesion work was choosing. Meglumine antimoniate *in vitro* release profile was evaluated using films with best obtained characteristics, demonstrating such release from the films. Finally, functionality of the films was evaluated in golden hamster animal model. Films prototypes showed able characteristics treating cutaneous ulcers.

Keywords: polymeric films, chitosan, cutaneous ulcers, leishmaniasis, transport

Contenido

Resumen……I
Lista de figuras……V
Lista de tablas……VI
Lista de anexos……VII
Lista de símbolos y abreviaturas……VIII
Introducción…… 1
Justificación…… 3
Objetivos…… 5

1. Aspectos conceptuales……5
1.1 Estructura de la piel 5
1.1.1 Epidermis 5
1.1.2 Dermis 6
1.2 La piel como vía de administración 6
1.3 Leishmaniasis cutánea....6
1.3.1 Ciclo de vida del parásito 7
1.3.2 Evolución de la lesión 7
1.3.3 Tratamientos convencionales contra la leishmaniasis 8
1.4 El quitosán como biopolímero 9
1.4.1 Fuentes de obtención del quitosán 9
1.4.2 Generalidades del quitosán 10
1.4.3 Solubilidad del quitosán 11
1.5 Películas poliméricas de quitosán para tratamiento de lesiones en piel 11
1.5.1 Actividades hemostática y cicatrizante 12
1.5.2 Actividad antimicrobiana 13
1.6 Quitosán en el transporte de fármacos 13
2.1 Estandarización del método de elaboración de las películas 15

2.1.1 Preparación de las películas 15
2.1.2 pH de las dispersiones poliméricas 15
2.1.3 Viscosidad de las dispersiones poliméricas 15
2.1.4 Espesor de las películas de quitosán 15
2.2 Determinación de propiedades mecánicas 16
2.2.1 Resistencia a la ruptura por tensión 16
2.3 Evaluación de las propiedades de transporte 17
2.3.1 Transferencia del vapor de agua 17
2.3.2 Índice de hinchamiento 18
2.4 Validación de la metodología analítica 18
2.5 Ensayos de funcionalidad 19
2.5.1 Estudio del comportamiento mucoadhesivo de las películas 19
2.5.2 Perfil de liberación *in vitro* del fármaco 20
2.6 Determinación morfológica por microscopía electrónica de barrido (SEM) 21
2.7 Análisis estadístico de los datos 21
3.1.1 Preparación de las películas 22
3.1.2 pH de las dispersiones poliméricas 23
3.1.3 Viscosidad de las dispersiones poliméricas 24
3.1.4 Espesores de las películas poliméricas 26
3.2. Determinación de propiedades mecánicas 27
3.2.1 Resistencia a la ruptura por tensión 27
3.3 Evaluación de las propiedades de transporte 31
3.3.1 Transferencia del vapor de agua 31
3.3.2 Índice de hinchamiento 34
3.4 Validación de la metodología analítica 36
3.5 Ensayos de funcionalidad 38
3.5.1 Estudio del comportamiento mucoadhesivo de las películas 38
3.5.2 Liberación *in vitro* del fármaco 40
3.6 Determinación morfológica por microscopía electrónica de barrido (SEM) 42

Conclusiones 44
Recomendaciones 44
Bibliografía 45
Anexos 50

Lista de figuras

Pág.

Figura 1. Mosquito hembra que transmite la leishmaniasis 7
Figura 2. Ciclo de vida del parásito que provoca la leishmaniasis.....7
Figura 3. Estructura química de antimoniales pentavalentes (Sb^{v}).....8
Figura 4. Estructuras químicas de: a) la quitina y, b) el quitosán.....10
Figura 5. Ensayo de ruptura por tensión 16
Figura 6. Ensayo de transferencia del vapor de agua.....17
Figura 7. Ensayo para la determinación del índice de hinchamiento.....18
Figura 8. Ensayo de mucoadhesión.....20
Figura 9. Partes de una celda de difusión de Franz.....20
Figura 10. Estructura química de PVP y su interacción con enlace de hidrógeno del quitosán.....23
Figura 11. pH de las dispersiones poliméricas evaluadas 24
Figura 12. Viscosidad de las dispersiones poliméricas evaluadas. 25
Figura 13. Espesor promedio de las películas evaluadas......26
Figura 14. Fuerza en función de la distancia de las diferentes películas evaluadas.. 28
Figura 15. Tensión en función de la deformación de las diferentes películas evaluadas.29
Figura 16. Variación en el peso en función del tiempo de las diferentes películas.....33
Figura 17. Índices de hinchamiento en buffer de acetatos pH 5.5. 34
Figura 18. Índices de hinchamiento en buffer de fosfatos pH 7.4. 34
Figura 19. Linealidad de sistema y método.....36
Figura 20. Trabajo de adhesión de las películas estudiadas 39
Figura 21. Adherencia del sistema terapéutico farmacéutico 40
Figura 22. Perfil de liberación del antimoniato de meglumina desde la película de quitosán de mediano peso molecular en ácido láctico.....41
Figura 23. Cinética de liberación del fármaco desde la película de mediano peso molecular en ácido láctico.....41
Figura 24. Micrografías en corte transversal de las películas de quitosán de mediano peso molecular en ácido láctico.....43
Figura 25. Micrografías con vista superficial de las películas de quitosán de mediano peso molecular en ácido láctico.....43

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1. Parámetros empleados en la preparación de las películas mediante la técnica de casting....22
Tabla 2. pH de las dispersiones poliméricas....24
Tabla 3. Viscosidad de las dispersiones poliméricas....25
Tabla 4. Espesores de las películas obtenidas en el estudio....26
Tabla 5. Comparación de espesores evaluados en diversos estudios con películas de quitosán....27
Tabla 6. Evaluación de las propiedades mecánicas de las películas poliméricas....30
Tabla 7. Características mecánicas de películas de quitosán evaluadas en dos solventes orgánicos....31
Tabla 8. Parámetros en la determinación de la transmisión al vapor de agua....32
Tabla 9. Resumen de la evaluación de las rectas obtenidas en el sistema y el método....36
Tabla 10. Estadísticos de evaluación de la repetibilidad del sistema....37
Tabla 11. Parámetros para la determinación del trabajo de adhesión....38

Lista de anexos

Pág.

Anexo 1. Estadístico ensayo mecánico fuerza (N) vs distancia (mm) de la película de quitosán de bajo peso molecular en ácido acético 50
Anexo 2. Estadístico ensayo mecánico fuerza (N) vs distancia (mm) de la película de quitosán de bajo peso molecular en ácido láctico.....51
Anexo 3. Estadístico ensayo mecánico fuerza (N) vs distancia (mm) de la película de quitosán de mediano peso molecular en ácido acético 52
Anexo 4. Estadístico ensayo mecánico fuerza (N) vs distancia (mm) de la película de quitosán de mediano peso molecular en ácido láctico.....53
Anexo 5. Estadístico ensayo mecánico tensión (N/mm^2) vs deformación de la película de quitosán de bajo peso molecular en ácido acético 54
Anexo 6. Estadístico ensayo mecánico tensión (N/mm^2) vs deformación de la película de quitosán de bajo peso molecular en ácido láctico.....55
Anexo 7. Estadístico ensayo mecánico tensión (N/mm^2) vs deformación de la película de quitosán de mediano peso molecular en ácido acético 56
Anexo 8. Estadístico ensayo mecánico fueza (N) vs distancia (mm) de la película de quitosán de mediano peso molecular en ácido láctico.....57
Anexo 9. Estadístico ensayo de transporte cambio de masa (g) vs tiempo (h) de la película de quitosán de bajo peso molecular en ácido acético 58
Anexo 10. Estadístico ensayo de transporte cambio de masa (g) vs tiempo (h) de la película de quitosán de bajo peso molecular en ácido láctico 59
Anexo 11. Estadístico ensayo de transporte cambio de masa (g) vs tiempo (h) de la película de quitosán de mediano peso molecular en ácido acético 60
Anexo 12. Estadístico ensayo de transporte cambio de masa (g) vs tiempo (h) de la película de quitosán de mediano peso molecular en ácido láctico 61
Anexo 13. Estadístico ensayo de hinchamiento en buffer de acetatos pH 5.5, índice de hinchamiento vs tiempo (min) de la película de quitosán de bajo peso molecular en ácido acético.....62
Anexo 14. Estadístico ensayo de hinchamiento en buffer de acetatos pH 5.5, índice de hinchamiento vs tiempo (min) de la película de quitosán de bajo peso molecular en ácido láctico 63
Anexo 15. Estadístico ensayo de hinchamiento en buffer de acetatos pH 5.5, índice de hinchamiento vs tiempo (min) de la película de quitosán de mediano peso molecular en ácido acético 64
Anexo 16. Estadístico ensayo de hinchamiento en buffer de acetatos pH 5.5, índice de hinchamiento vs tiempo (min) de la película de quitosán de mediano peso molecular en ácido láctico 65
Anexo 17. Estadístico ensayo de hinchamiento en buffer de acetatos pH 7.4, índice de hinchamiento vs tiempo (min) de la película de quitosán de bajo peso molecular en ácido acético.....66
Anexo 18. Estadístico ensayo de hinchamiento en buffer de acetatos pH 7.4, índice de hinchamiento vs tiempo (min) de la película de quitosán de bajo peso molecular en ácido láctico 67
Anexo 19. Estadístico ensayo de hinchamiento en buffer de acetatos pH 7.4, índice de hinchamiento vs tiempo (min) de la película de quitosán de mediano peso molecular en ácido acético 68
Anexo 20. Estadístico ensayo de hinchamiento en buffer de acetatos pH 7.4, índice de hinchamiento vs tiempo (min) de la película de quitosán de mediano peso molecular en ácido láctico 69

Lista de símbolos y abreviaturas

ASTM	Sociedad Americana para ensayos y materiales (sigla en inglés)
OMS	Organización mundial de la Salud
PVP	Polivinilpirrolidona
LC	Leishmaniasis cutánea
STF	Sistema terapéutico farmacéutico
cps	centipoise
rpm	revoluciones por minuto
mm	milímetro
cm	centímetro
ml	mililitro
mcg	microgramo
Abs	Absorbancia
SEM	Microscopia electrónica de barrido (sigla en inglés)

Introducción

La piel es la envoltura que recubre el molde interno del que se compone cada ser viviente, al ser nuestro órgano más externo constituye una barrera de protección frente a diversos factores como cambios de temperatura, o agentes patógenos, entre otros, sin embargo, también puede afectarse ante imprevistos como accidentes, o ante enfermedades que la lesionen, ocasionando pérdida de su integridad y por lo tanto haciéndola más vulnerable.

Un tipo de lesión que se presenta sobre la piel como consecuencia de diferentes patologías son las úlceras cutáneas, para este trabajo en particular son de interés aquellas úlceras provocadas por una enfermedad conocida como Leishmaniasis cutánea (LC). Actualmente los tratamientos principales de la enfermedad cobijan administraciones orales, intramusculares e intralesionales, esta última vía es la más agresiva, pero también la menos tóxica dada su aplicación localizada (Minodier y Parola, 2007).

Diversas investigaciones han conducido al empleo de materiales poliméricos de origen animal o vegetal, e inclusive su combinación, en la elaboración de dispositivos médicos tales como apósitos para curación de heridas, implantes de piel y adecuación de películas poliméricas, entre otros, que generen tratamientos altamente tolerables por los pacientes cuya piel se haya visto afectada por condiciones como las mencionadas anteriormente, hasta el punto de alcanzar la eficacia requerida en la terapia.

Dichos materiales poliméricos, dada su naturaleza, son más conocidos como biopolímeros. Dentro de los diferentes biopolímeros, los compuestos orgánicos más abundantes de la biomasa son la celulosa y la quitina, la primera es sintetizada por las plantas y constituye el principal componente en la pared celular, mientras que la quitina se encuentra en los caparazones de crustáceos y exoesqueletos de artrópodos como una estructura que da soporte y protección (Kurita, 2006).

El quitosán es el derivado más importante de la quitina, ambos son considerados biopolímeros funcionales con un potencial mucho mayor que la celulosa en diversos campos y son importantes no solo como recursos abundantes, sino también como un tipo de materiales poliméricos biodegradables que los hace menos perjudiciales frente al medio ambiente (Kurita, 2006). Son además biocompatibles, de tal manera que al entrar en contacto con tejidos, fibras, órganos, entre otros, son aceptados más fácilmente por el organismo y no generan reacciones de rechazo que puedan desencadenar un efecto opuesto al deseado.

Las necesidades de los pacientes constituyen el factor principal por el cual la industria farmacéutica toma la iniciativa de diseñar sistemas de entrega farmacéuticos, integrando propiedades fisicoquímicas, farmacotécnicas y algunas biofarmacéuticas, entre otras, de los excipientes y el principio activo, que a través de la tecnología más indicada conduzcan a la elaboración de una formulación libre de incompatibilidades, capaz de garantizar como resultado un producto estable, seguro y eficaz. El sistema terapéutico farmacéutico, consta de un medio de transporte que debe adaptarse anatómicamente al sitio donde espera ser aplicado, a su vez dicho medio integra los componentes que regulan factores como tiempo y velocidad de liberación imitando características fisiológicas, y un reservorio de almacenamiento del fármaco (Rojas *et al.,* 2008). Las propiedades bioadhesivas del quitosán, lo convierten en un sistema terapéutico farmacéutico selectivo al dirigirse hacia un sitio de aplicación local, reduciendo la incidencia de efectos sistémicos y disminuyendo el riesgo de incumplimiento por parte del paciente (Rojas *et al.,* 2008; Vallejo, 2010).

El presente trabajo de investigación se orienta hacia la incorporación de un fármaco leishmanicida dentro de un sistema polimérico, esperando como resultado el desarrollo de un diseño tipo película polimérica de quitosán, como sistema terapéutico farmacéutico alternativo, que permita considerar el reemplazo eficiente de la forma de administración intralesional en la leishmaniasis cutánea, evitando el dolor del paciente ocasionado por esta vía de aplicación, y por ende incentivando la aceptación del tratamiento de manera que se logre cumplir un esquema terapéutico satisfactorio.

Justificación

La leishmaniasis cutánea hace parte del grupo de las enfermedades abandonadas, a razón de que existe poco interés de donantes financieros, autoridades en salud pública, y profesionales para implementar actividades de investigación, prevención, o control de la enfermedad. Adicionalmente, no existe una vacuna disponible que evite el desarrollo de misma y tanto los tratamientos de primera línea así como los alternativos desencadenan efectos adversos severos. Por su parte, en Colombia la leishmaniasis cutánea constituye un problema de salud pública (Reithinger *et al.,* 2007; Soto y Soto, 2006).

La administración intralesional, constituye una de las vías de tratamiento de las lesiones cutáneas características de la enfermedad. A través de esta ruta de administración, el fármaco alcanza una mayor concentración en el sitio de la infección, los efectos sistémicos tóxicos se reducen, mejora el tiempo de curación y disminuyen los costos asociados a la terapia convencional. Sin embargo, el dolor inherente asociado a esta vía de administración, hace que los pacientes no logren cumplir con el esquema terapéutico total (Reithinger *et al.,* 2007).

Los materiales poliméricos han venido siendo utilizados como sistemas de transporte en la liberación de fármacos, la ventaja de un mayor acercamiento al sitio de aplicación ha sido una de las razones para crear desarrollos innovadores de polímeros biodegradables en campos como la medicina (Mitrus *et al.,* 2010). Las propiedades bioadhesivas del quitosán lo hacen apto para ser utilizado sobre heridas abiertas, lo que sumado a sus actividades hemostática y cicatrizante, así como a su biodegradabilidad, lleva a la regeneración de la lesión (Fuentes y Pastor, 2009; Rojas *et al.,* 2008).

Tomando en cuenta las consideraciones mencionadas, el presente estudio busca partir del aprovechamiento de las propiedades del quitosán como biopolímero de interés en el tratamiento de heridas sobre la piel, dando inicio a una serie de estudios encaminados al diseño de sistemas de transporte que incorporen como principio activo el antimonio pentavalente, evitando el dolor provocado por el tratamiento con la inyección intralesional

en leishmaniasis cutánea, así como también los efectos tóxicos causados por las demás vías de administración, ayudando de esta manera al paciente en el cumplimiento de su terapia.

Los objetivos del presente estudio fueron:

OBJETIVO GENERAL

Diseñar películas de quitosán para ser utilizadas como sistema terapéutico alternativo en el tratamiento de úlceras cutáneas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar ensayos preliminares que definan las condiciones para llevar a cabo el diseño de las películas.

- Elaborar un prototipo de película biopolimérica que permita la incorporación del fármaco de interés.

- Caracterizar las propiedades mecánicas y de transporte de la película obtenida.

- Estudiar la cinética de liberación del activo desde las películas.

1. Aspectos conceptuales

1.1 Estructura de la piel

La piel es uno de los órganos más complejos del cuerpo humano, además de ser el más extenso tanto en área superficial como en peso. Sin duda, la principal función de la piel consiste en servir como barrera de protección frente a agentes externos físicos como la radiación ultravioleta, agentes químicos y patógenos, cambios de temperatura y la prevención de la deshidratación, La piel actúa también como un órgano sensor y desarrolla funciones endocrinas como la síntesis de vitamina D (Menon, 2002; Villarino y Landoni, 2006).

Según Menon (2002) la piel es un área de amplio interés industrial por cuanto existen diversos productos cosméticos y para el cuidado personal. Para los farmacéuticos constituye un desafío frente al diseño de sistemas de entrega, que logren alcanzar alguna porción de su amplia distribución. Las personas buscan lucir pieles jóvenes invirtiendo tiempo y dinero en su apariencia.

Principalmente, la piel está constituida por dos capas, la más externa conocida como la epidermis, y a continuación viene la dermis. Una capa subsecuente que no hace parte de la piel es la hipodermis, formada por tejido adiposo que sirve como depósito de grasas y además posee vasos sanguíneos que abastecen la piel. A partir de las diferentes capas se desprenden conformaciones anexas como las glándulas sudoríparas, folículos pilosos, uñas y receptores táctiles entre otros (Tortora y Derrickson, 2008).

1.1.1 Epidermis

Es la capa más delgada y se encuentra ubicada en la superficie. Está formada por tejido epitelial no vascularizado. Sus principales tipos de células son los queratinocitos, los melanocitos, las células de Langerhans y las células de Merkel (Tortora y Derrickson, 2008).

- Los queratinocitos constituyen el 90% de las células epidermales y se distribuyen en cinco estratos caracterizados por su diferenciación celular, de tal manera que el estrato más profundo (estrato basal) contiene queratinocitos que se van formando por división celular, mientras que en el estrato más externo (estrato córneo) los queratinocitos están muertos. Los queratinocitos sintetizan la proteína queratina encargada de proteger la piel frente abrasiones y químicos.

- Los melanocitos se encargan de la síntesis de melanina, proteína que influye en la coloración de la piel y absorbe la luz ultravioleta perjudicial.

- Las células de Langerhans participan en la respuesta inmune ayudando a otras células a reconocer agentes extraños para destruirlos.

- Las células de Merkel se relacionan con las sensaciones táctiles.

1.1.2 Dermis

La capa más profunda de la piel es la dermis compuesta por tejido conectivo con fibras de colágeno y elastina que le confieren una gran fuerza de tensión haciéndola resistente frente al estiramiento, pero elástica. La dermis está vascularizada y se divide en dos regiones (Tortora y Derrickson, 2008):

- Región papilar: región delgada en la cual se alojan los corpúsculos de Meissner, cuyas terminales nerviosas son responsables de desencadenar estímulos de dolor y sensaciones frente al frío o al calor.

- Región reticular: capa más gruesa y más profunda cuyos espacios entre las fibras son ocupados por folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas, así como vasos sanguíneos.

1.2 La piel como vía de administración

La administración tópica de fármacos de acción sistémica, es una importante alternativa que evita el efecto de primer paso hepático disminuyendo efectos tóxicos, así como también mejora el cumplimiento del paciente frente a tratamientos terapéuticos, porque su acción localizada logra disminuir los intervalos de dosificación que son mayores en otras formas farmacéuticas como la oral. La evidencia de la permeabilidad de la piel así como la posibilidad de ser atravesada por determinados agentes, trajo consigo una nueva perspectiva de administración de fármacos, los cuales deben lograr su absorción tópica, pasar a la circulación sanguínea, y finalmente alcanzar su sitio blanco de acción (Ariza, 2004; Villarino y Landoni, 2006).

1.3 Leishmaniasis cutánea

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la leishmaniasis hace parte del grupo de enfermedades tropicales más importantes, se distribuye a nivel mundial, principalmente en los trópicos y subtrópicos, reportando una prevalencia de 12 millones de casos con una incidencia anual entre 1.5 - 2 millones de nuevos casos, en los 88 países donde la enfermedad es endémica (Piñero *et al.,* 2006). La leishmaniasis se manifiesta en tres formas clínicas diferentes, la cutánea, la mucocutánea y la visceral, siendo la primera la más frecuente con un 95% de los casos. La forma cutánea de la infección en el continente americano, tiene una incidencia de 11.2 casos nuevos por año en Venezuela, 13.96 casos en Ecuador, 43 casos en Panamá, 55.2 casos en Costa Rica, y 60.9 casos en Colombia (Arias *et al.,* 1996; Piñero *et al.,* 2006; Santander, 2010).

La Leishmaniasis cutánea es un conjunto de infecciones que afecta la piel. Es causada por parásitos protozoos flagelados del género *Leishmania,* transmitidos a los humanos y a otros mamíferos por la picadura de un insecto flebotomíneo hembra infectado (figura 1) del género *Lutzomyia* como se observa en la figura 2 (Reithinger *et al.,* 2007). La infección en humanos es provocada por aproximadamente unas veinte especies de *Leishmania* (Peñuela y Sánchez, 2007; Wolff y Johnson, 2009).

Figura 1. Mosquito hembra que transmite la leishmaniasis (Ruiz, 2011)
Disponible en http://www.unperiodico.unal.edu.co/dper/article/descubren-por-que-el-humano-es-vulnerable-a-la-leishmaniasis.html

De acuerdo con el informe final del 2010 del Instituto Nacional de Salud, en Colombia, la leishmaniasis es una patología endémica extendida en la mayor parte del territorio nacional concentrándose en zonas rurales, exceptuando la capital Bogotá D.C y las islas de San Andrés (Gutiérrez, 2010).

1.3.1 Ciclo de vida del parásito

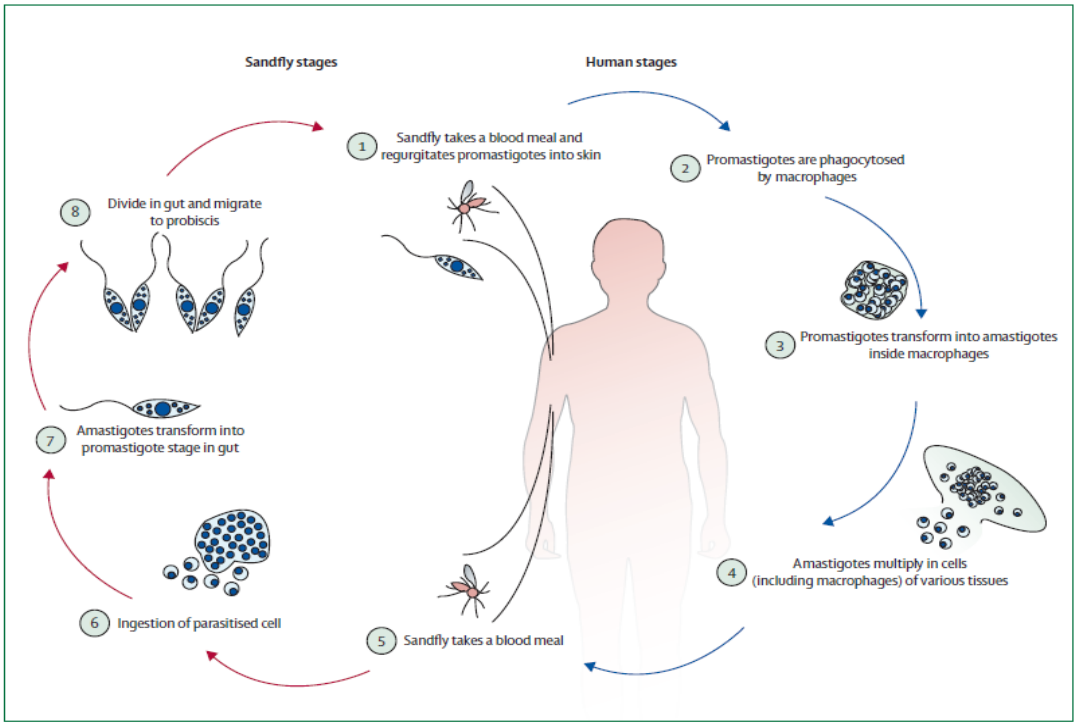


Figura 2. Ciclo de vida del parásito que provoca la leishmaniasis
Tomado de Reithinger et al., 2007

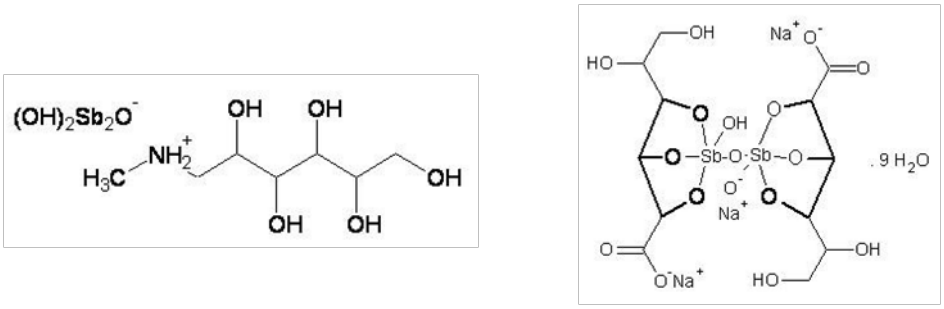
1.3.2 Evolución de la lesión

Comúnmente tras la picadura del mosquito infectado, aparece un eritema como signo inicial de la infección. El eritema evoluciona hasta convertirse en una pápula que

posteriormente pasa a formar pequeños nódulos, estos a su vez sufren una transformación, dentro de un periodo de dos a seis meses, de manera que se van ulcerando hasta generar la lesión característica de la leishmaniasis cutánea. Las úlceras presentan bordes elevados, son redondeadas y generalmente indoloras. No obstante, en muchos pacientes las lesiones son de tipo nodular sin llegar a la ulceración (Reithinger *et al.,* 2007). La histología de las lesiones ha presentado en ocasiones semejanzas con granulomas de la piel, de tal manera que a medida que la lesión evoluciona es común que estos aparezcan en la parte superior de la dermis llegando inclusive a difundirse por ésta capa (Mehregan *et al.,* 1999).

1.3.3 Tratamientos convencionales contra la leishmaniasis

La terapia convencional para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea consiste en la administración de antimoniales pentavalentes, en sus presentaciones de estibogluconato de sodio (Pentostan® y de antimoniato de N – metil - glucamina (Glucantime®) como línea de primera elección (figura 3), en dosis de 20 mg/kg/día por 20 – 28 días consecutivos, dependiendo de la forma clínica a tratar y del cumplimiento por parte del paciente, de acuerdo con la información suministrada por la OMS. Por otro lado, los tratamientos alternativos incluyen la anfotericina B o la pentamidina. Los tratamientos de primera elección son administrados vía intramuscular o intralesional, mientras que para los tratamientos alternativos se emplea la vía parenteral (Eric *et al.,* 2007; Henao *et al.,* 2004).



a) Antimoniato de N - metilglucamina b) Estibogluconato de sodio

Figura 3. Estructura química de antimoniales pentavalentes (Sb^{V})

Tanto los tratamientos de primera elección, así como los alternativos, presentan efectos secundarios tóxicos a nivel hepático y cardíaco principalmente, desarrollando resistencia clínica inclusive tras pocas semanas de su administración, y en algunos casos eleva el riesgo de coinfecciones en pacientes inmunosuprimidos (Piñero *et al.,* 2006).

Las complicaciones que aparecen tras los efectos tóxicos de los antimoniales pentavalentes, requieren de una atención médica paralela a la terapia convencional, que incrementa los costos del tratamiento; sumado a esto, los largos periodos de inyecciones intramusculares o intravenosas, se traducen en un esquema de tratamiento incompleto por parte del paciente (Reithinger *et al.,* 2007). Estas consideraciones sugieren un nuevo enfoque en el diseño de alternativas terapeúticas, que logren promover la motivación del paciente para culminar satisfactoriamente su tratamiento.

1.4 El quitosán como biopolímero

La preocupación por el impacto ambiental generado a partir de los desechos de materiales poliméricos no degradables tales como el polietileno y el poliestireno, entre otros, ha despertado el interés de los investigadores hacia la sustitución de polímeros sintéticos por materiales poliméricos biodegradables, contribuyendo en el fortalecimiento de un manejo sostenible para el medio ambiente. Los biopolímeros constituyen una opción viable que cumple con las necesidades estimadas, estos son formados bajo condiciones naturales durante los ciclos de crecimiento de todos los organismos. Comúnmente los métodos de disposición para los desechos generados por los materiales no degradables son limitados, además de que conllevan al aumento de la polución en el aire en el caso de ser incinerados, o a la generación de consumos intensos de energía al tratar de reciclarse elevando también los costos en su manejo (Mitrus *et al.,* 2010).

Gracias a sus características, los biopolímeros se han venido empleando en áreas como la medicina, productos farmacéuticos, cosméticos y biotecnológicos generando un menor impacto ambiental al tratarse de compuestos orgánicos que poseen características de biodegradabilidad, biocompatibilidad, e inclusive bajo costo. El quitosán es reconocido por ser un biopolímero muy versátil, teniendo aplicaciones en la agricultura al ser usado como protector de semillas, en la liberación controlada de fertilizantes así como de fungicidas, es ampliamente utilizado en el tratamiento de aguas principalmente como agente de desmetalización, en la medicina ha sido utilizado en la producción de glucosamina, cremas cicatrizantes, e inclusive en terapia génica, en el campo de los cosméticos se le han encontrado acciones adelgazantes, propiedades hidratantes, y usos como aditivo bactericida en jabones y champús, siendo éstas solo algunas de las innumerables aplicaciones de este biopolímero (Kurita, 2006; Lárez, 2006).

Tanto la quitina como el quitosán han sido descritos en enciclopedias, manuales, monografías y artículos, así como también en las guías de la Asociación americana de ensayo de materiales (ASTM) y en las farmacopeas de varios países (Kumar *et al.,* 2004).

1.4.1 Fuentes de obtención del quitosán

La quitina se encuentra presente tanto en especies del reino vegetal así como del reino animal. En el primero hace parte de algunas especies de hongos y levaduras, mientras que en el segundo es el principal componente de los caparazones de crustáceos (camarones, cangrejos, langostas, krill Antártico) y exoesqueletos de artrópodos como una estructura que da soporte y protección. Los desechos de la industria de los crustáceos son procesados como subproductos de la industria alimenticia dando lugar a la obtención de quitina como materia de partida en la producción de quitosán (Khanafari *et al.,* 2008; Pillai *et al.,* 2009).

La quitina es producida industrialmente siguiendo tres pasos básicos: el primero consiste en la desmineralización del carbonato de calcio presente en los caparazones de los crustáceos para lo cual los desechos se someten a un tratamiento ácido, a continuación se lleva la solubilización de las proteínas en medio alcalino logrando la desproteinización,

y finalmente se efectúa un proceso de decoloración que remueva los pigmentos remanentes para obtener un producto más homogéneo (López, 2008; Rinaudo, 2006).

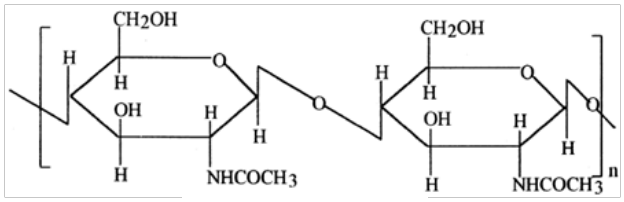
En Asia y en Medio Oriente hay un alto consumo de camarones y gambas que ha favorecido la producción de quitina/quitosán, gracias a la gran cantidad de desperdicios disponibles. El krill Antártico, así como los hongos cultivados son vistos como potenciales fuentes de producción para la quitina y el quitosán. El krill ha sido estudiado ampliamente en Chile pero más ampliamente en Polonia (Roberts, 2008).

La producción de estos materiales a partir de los micelios fúngicos recientemente ha sido de mayor interés debido a las ventajas significativas que tiene su aprovechamiento, por ejemplo, mientras los residuos de crustáceos son limitados de acuerdo con las temporadas y los sitios de la industria pesquera, el micelio fúngico puede ser obtenido por procesos de fermentación que no se ven limitados por los anteriores aspectos. El micelio fúngico tiene más bajo nivel de materiales inorgánicos en comparación con los residuos de crustáceos, esto conlleva a que no sean necesarios tratamientos de desmineralización durante el proceso. Al tratarse de un proceso de fermentación se utiliza álcali que remueve la proteína y a su vez deacetila la quitina (López, 2008).

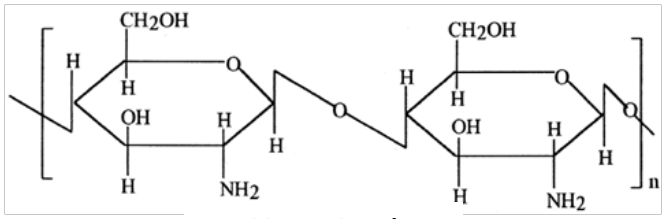
1.4.2 Generalidades del quitosán

En 1811 el profesor francés de historia natural Henri Braconnot, director del jardín botánico en Nancy, Francia, aisló un material en los hongos que se caracterizaba por no disolverse en ácido sulfúrico, lo llamó fungina. En 1823 Antoine Odier estudiaba cutículas de escarabajos, en las cuales encontró quitina que por sus características vendría a ser la misma fungina hallada por Braconnot. Odier tomó el nombre de quitina de la palabra griega "khiton" que significa túnica o envoltura. Finalmente en 1859 el profesor Rouget descubrió el quitosán como derivado de la quitina y desde entonces hay más de 2000 aplicaciones de la quitina y sus derivados (Kavitha *et al.,* 2011; Khoushab y Yamabhai 2010).

Tras la desacetilación parcial de la quitina es obtenido el quitosán, un polímero catiónico no ramificado de glucosamina y N-acetilglucosamina, de origen natural y no tóxico (Khanafari *et al.,* 2008). Ambas moléculas se presentan en la figura 4 (Ravi Kumar, 2000).



a) Quitina



b) Quitosán

Figura 4. Estructuras químicas de: a) la quitina y, b) el quitosán

La presencia de los grupos aminos libres en cada residuo monomérico de su molécula, permite que el quitosán sea transformado químicamente a partir de la modificación de sus grupos amino así como hidroxilos primario y secundario. Las derivatizaciones posibles incluyen su entrecruzamiento, eterificación, esterificación. Dichas transformaciones alterarían sus propiedades físicas y químicas llevando a la versatilidad que le caracteriza favorable en un amplio campo de aplicaciones tecnológicas y biomédicas (Cárcamo, 2005).

Las propiedades físicas del quitosán dependen de diversos parámetros tales como el peso molecular (aproximadamente 10000 a 1 millón de Daltons), grado de deacetilación (en el rango de 50-95%), secuencia de los grupos amino y acetamido y la pureza del producto.

1.4.3 Solubilidad del quitosán

El empaquetamiento cerrado del quitosán y la presencia de diferentes tipos de enlaces de hidrógeno como se muestra en la figura 4, son algunas de las razones que explican su naturaleza hidrofóbica. El quitosán es catalogado como una base fuerte fácilmente soluble en soluciones diluidas de ácidos orgánicos por debajo de pH 6.0. En su molécula posee grupos amino primarios que a pH bajo se protonan y se cargan positivamente y convierten al quitosán en un polielectrolito catiónico soluble en agua. Al incrementar el pH por encima de 6.0 las aminas se desprotonan y el polímero pierde su carga y se vuelve insoluble. El pKa del quitosán es cercano a la neutralidad, y la transición soluble-insoluble ocurre a pH entre 6 y 6.5 (Yi *et al.,* 2005).

Los ácidos orgánicos tales como acético, fórmico, y ácido láctico pueden disolver al quitosán, ya que a bajos valores de pH, éste forma fácilmente sales de nitrógeno cuaternario. El solvente más común es una solución de ácido acético al 1% a pH 4.0. El quitosán no es soluble en solventes orgánicos ni en condiciones neutras debido a la existencia de grupos amino y la alta cristalinidad, mientras que es fácilmente soluble en la presencia de ácido (Huang y Fu, 2010).

1.5 Películas poliméricas de quitosán para tratamiento de lesiones en piel

En el lenguaje de la ciencia de los polímeros, una película polimérica es una lámina cuyo espesor es muy pequeño en proporción con la longitud y la amplitud, siendo no mayor a 0.25 mm (Vachon, 2005).

Idealmente las películas poliméricas destinadas a la curación de heridas sobre la piel buscan cumplir una serie de propiedades que las hagan aptas para tal fin, entre las que se encuentran:

- En lo posible ser transparentes, para poder hacer un seguimiento de la evolución de la herida (Dutton, 2011).

- Poseer alta elasticidad para acomodarse a las superficies irregulares de la herida y a los diferentes contornos de la piel sin que se afecten las actividades cotidianas (Dutton, 2011; Mortimer, 2000).

- Presentar características semipermeables a permeables al vapor de agua, de tal manera que se mantenga un ambiente húmedo para la herida sin llegar a la acumulación de fluidos (Fuentes y Pastor, 2009).

- Preferiblemente ser biodegradables de tal manera que se logre la reducción en el número de recambios incrementando la comodidad del paciente y la reducción en el dolor y efectos secundarios (Aggarwal y Dhawan, 2009; Mortimer, 2000).

- Permitir la incorporación de fármacos, convirtiéndose en un sistema de transporte de éstos con características que favorezcan su liberación gradual.

Finalmente, se espera que combinando estas propiedades se logre una curación eficaz de la herida a un costo razonable generando los menores inconvenientes posibles para el paciente (Boateng *et al.,* 2008).

Dada su biocompatibilidad, biodegradabilidad y, no toxicidad, el quitosán se usa en las industrias farmacéuticas y de alimentos (Shih *et al.,* 2009) . El uso del quitosán también se ve favorecido por su producción a bajo costo.

Comercialmente existen diversos materiales para curación de heridas derivados de quitina y quitosán. Dentro de aquellos materiales derivados del quitosán, por ejemplo el HemCon® es un vendaje hemostático usado en emergencias para detener el sangrado, el vendaje TraumaStat® es también una alternativa frente al HemCon®. El Tegaderm® ha sido usado como apósito tratando úlceras en piernas, heridas crónicas y heridas a nivel del sacro (Jayakumar *et al.,* 2011; Muzzarelli, 2009).

Hasta el momento no se han reportado casos clínicos en los cuales se produzcan reacciones alérgicas del quitosán después de ser implantado o administrado por inyección o tópicamente (Fuentes y Pastor, 2009).

1.5.1 Actividades hemostática y cicatrizante

El carácter catiónico del quitosán crea una atracción con las cargas negativas de los glóbulos rojos de la sangre, lo cual se traduce en términos de heridas en la creación de un sello como consecuencia de la activación de la cascada de coagulación que acelera la generación de trombina, dando como resultado la propiedad hemostática del quitosán que promueve la regeneración de tejido normal (Bonferoni *et al.,* 2009; Pillai *et al.,* 2009). Dentro de los usos dados como hemostático los paramédicos de las fuerzas en los Estados Unidos en Iraq y Afganistan emplean los vendajes de quitosán para detener el sangrado instantáneamente, por otro lado en Japón las fibras de algodón y esponjas de quitina y quitosán son comúnmente usadas por veterinarios como apósitos para heridas en animales (Kurita, 2006).

Según Lárez (2006) los antepasados de los coreanos extraían la quitina de la concha interna del calamar para ser empleada en el tratamiento de abrasiones, y los antepasados de los mexicanos aplicaban quitosán tomado de las paredes celulares de los hongos para la aceleración de la cicatrización de heridas.

Actualmente, algunos de los usos médicos más sencillos de este tipo de material abarcan, la producción de gasas y vendajes tratados con quitosán, el empleo de cremas

bactericidas para el tratamiento de quemaduras y la aplicación como agente hidratante para la piel debido a que en su forma de gel tiene la capacidad de proporcionar agua evitando de este modo la resequedad (Lárez, 2006).

Por otro lado, el quitosán ha demostrado tener un efecto de aceleración sobre el proceso de curación de heridas. A nivel bioquímico estos materiales participan en dicho proceso con la activación de células polimorfonucleares, de fibroblastos, producción de citoquinas, migración celular y estimulación de síntesis de colágeno tipo IV (Jayakumar *et al.,* 2010; Mezzana, 2008). Los diseños para tratamiento de heridas en la piel, deben incluir enzimas proteolíticas que favorezcan el tratamiento en la primera etapa de cicatrización, estas enzimas se encargan de romper el tejido muerto, disminuyendo la viscosidad del exudado de la herida y conduciendo a su eliminación gradual, en la segunda etapa de la cicatrización se dará la propagación de un nuevo tejido con la proliferación de fibroblastos y epitelio (Kil'deeva *et al.,* 2006).

Gracias a la similitud estructural con los glicosaminoglicanos naturales de la piel el quitosán facilita el crecimiento de queratinocitos y fibroblastos, adicionalmente su baja toxicidad, degradación por enzimas como quitosanasa y lisozima, y biocompatibilidad, lo han posicionado en el campo biomédico en la liberación de fármacos, elaboración de dispositivos médicos como apósitos para heridas, en aplicaciones en ingeniería de tejidos, entre otros (Antonov *et al.,* 2008; Huang y Fu, 2010).

1.5.2 Actividad antimicrobiana

Los grupos amino del quitosán cargados positivamente interaccionan con la membrana celular de la bacteria cargada negativamente, llevando al deterioro de las proteínas y de otros componentes de la membrana de los microorganismos al alterar la permeabilidad de ésta y por lo tanto conducir a su pérdida de funcionalidad de barrera.

Cabe resaltar que la actividad antibacterial del quitosán, así como ya se ha mencionado para otras de sus propiedades, está influenciada por el grado de deacetilación, su concentración en solución y el pH del medio. Es así como por ejemplo los derivados de quitosán solubles en pH fisiológicos ácidos y básicos pueden ser buenos candidatos como biocidas policatiónicos, así como también los quitosanes con pesos moleculares entre 10.000 - 100.000 kDa podrían restringir el crecimiento de bacterias (Bonferoni *et al.,* 2009; León y Santiago, 2007; Rodríguez *et al.,* 2009).

1.6 Quitosán en el transporte de fármacos

Dadas las propiedades del quitosán como polímero bioadhesivo, además de incrementador de la absorción que promueve el paso de fármacos a través de la barrera mucosa, este se convierte en un potencial sistema para aplicaciones en liberación controlada, prolongando el tiempo de contacto en el sitio de absorción, sosteniendo el perfil de liberación y mejorando la biodisponibilidad de fármacos (Dodane y Vilivalam, 1998; Pillai y Panchagnula, 2001). Diversos sistemas de liberación desde liposomas recubiertos con quitosán para mejorar la absorción enteral de insulina, o microesferas de nifedipina para tratar afecciones cardíacas, o bien diseños de lentes oculares como dispositivos para tratamiento de ojos traumatizados, son algunos ejemplos de las aplicaciones dadas al quitosán para transporte de fármacos (Dodane y Vilivalam, 1998; Kavitha *et al.,* 2011).

La ruta transdérmica en la entrega de fármacos constituye una alternativa frente a la administración de formas orales que requieren metabolismo de primer paso, así mismo en sistemas agresivos como vías inyectables. A pesar de la habilidad del quitosán como formador de películas, solo pocos estudios se conocen sobre la utilidad del quitosán como dispositivo de membranas transdérmicas, así pues, autores como (Thacharodi y Rao, 1995) desarrollaron sistemas de liberación de propanolol con membranas transdérmicas de quitosán variando la permeabilidad de éstas, encontrando perfiles de liberación *in vitro* con características reproducibles que daban un indicio del comportamiento predictivo a nivel *in vivo*, por otro lado, observaron que al utilizar polímeros naturales en el diseño de sistemas transdérmicos, la mayoría de las reacciones adversas por contacto, como alergias e inflamaciones, llegaban a minimizarse.

La capacidad del quitosán para adsorber iones metálicos mediante interacciones electrostáticas, atribuido a sus propiedades catiónicas (Montero *et al.,* 2010) sumadas a sus propiedades cicatrizantes así como de regeneración de tejidos (Muzzarelli, 2009) son dos de las razones por las cuales este polímero toma interés para llevar a cabo este desarrollo farmacéutico, el cual es pionero en la incorporación de un fármaco leishmanicida en un sistema polimérico tipo película, prometedor en el transporte de este fármaco en la terapia convencional de la leishmaniasis cutánea.

2. Materiales y métodos

2.1 Estandarización del método de elaboración de las películas

2.1.1 Preparación de las películas

Para la preparación de las películas se empleó un polímero de quitosán de dos pesos moleculares, bajo peso molecular (50.000 – 190.000 Da) lote 06513AE, y mediano peso molecular (190.000 – 310.000 Da) lote MKBD7238V, ambos provenientes de Aldrich; Kollidon®25 polivinilpirrolidona (PVP) de BASF; antimoniato de meglumina lote 22110701 suministrado por Laboratorio Arbofarma S.A. Las dispersiones de quitosán tanto de bajo como de mediano peso molecular, fueron preparadas al 1% p/v en solución de ácido acético 1% p/p con PVP 0.2%, y en ácido láctico 1% p/p con PVP 0.2%. Se siguió el método de evaporación de solvente, más conocido como *casting*, bajo una temperatura de preparación de 60 ± 5°C, agitación a 400 rpm en agitador *Heildoph* RZR 2020, y tiempo de 1 hora. Finalmente, las preparaciones fueron depositadas sobre un molde nivelado de 15 x 15 cm y llevadas al secado bajo temperatura constante de 55 ± 5°C durante 8 horas, hasta la formación de la película sólida (Crompton, 1993; Czichos *et al.,* 2006). Las películas formadas se desprendieron de los moldes y fueron almacenadas en condiciones controladas de humedad relativa de 55%±2 a 18°C durante 48 horas para las determinaciones posteriores. La inclusión del fármaco (antimoniato de meglumina) en las preparaciones se hizo lentamente durante la etapa de mezcla, manteniendo las consideraciones mencionadas previamente.

2.1.2 pH de las dispersiones poliméricas

A las dispersiones obtenidas en los diferentes medios de preparación, se les realizaron tres lecturas de pH con un potenciómetro portátil HI 991300.

2.1.3 Viscosidad de las dispersiones poliméricas

La viscosidad se determinó empleando un viscosímetro (Brookfield DV – II + Pro, Brookfield Engineering Laboratories, Inc., USA) al cual se le adecuó la aguja No. 3 y la velocidad de la prueba no superaba 100 revoluciones por minuto (rpm). Las muestras se encontraban a 20°C en el momento de la determinación, la cual se realizó por triplicado

2.1.4 Espesor de las películas de quitosán

Los espesores son un indicativo de la distribución homogénea de la mezcla sobre el molde. Los espesores de las películas fueron determinados usando un calibrador digital, Digital caliper 0 – 200 mm. Teniendo en cuenta el área a tratar sobre la lesión y considerando la facilidad en la manipulación, se cortaron recuadros de dimensiones de 2 cm x 2 cm de diferentes partes de la película y a estas se les midió el espesor en los

cuatro bordes así como en el centro para un total de 5 puntos de muestreo. Se llevaron a cabo 30 determinaciones. Las muestras de estudio que presentaran defectos tales como burbujas o desgarros se excluían de la prueba.

2.2 Determinación de propiedades mecánicas

2.2.1 Resistencia a la ruptura por tensión

Para la realización de este ensayo se tomaron tiras de películas de 20 mm x 100 mm que fueron sujetadas entre dos mordazas de extremo a extremo, de manera que quedaran orientadas verticalmente a una distancia de 70mm como lo indica la figura 5. Se empleó un Analizador de Textura TA.XT *plus* Texture Analyser. El instrumento se programa en el modo de tensión, la película es halada por la mordaza superior a una velocidad de 0,5 mm/seg y a una distancia de 20 mm antes de regresar al punto de partida, dichos parámetros fueron preestablecidos en estudios realizados por el grupo de investigación (Vallejo, 2010). Los valores empleados son el promedio de 7 ensayos.

Figura 5. Ensayo de ruptura por tensión en instrumento TA.XT plus Texture Analyser

La resistencia es la fuerza de tensión necesaria para romper un material. Este ensayo reviste de importancia por cuanto brinda información con respecto a la elasticidad y la fuerza de las películas, la primera de ellas representada desde la elongación como parte de un tipo de deformación, y la segunda en la fuerza de tensión (Brindis, 2002; Khan *et al.,* 2000).

La fuerza de tensión y la elongación, son calculadas mediante las ecuaciones 1 y 2 (Khan *et al.,* 2000):

$$Fuerza\ de\ tensión\ \left(\frac{N}{mm^2}\right) = \left(\frac{Fuerza\ de\ ruptura\ (N)}{Área\ corte\ transversal\ muestra\ mm^2}\right) \quad (1)$$

$$Elongación\ (\%) = \left(\frac{Incremento\ en\ la\ longitud\ en\ el\ punto\ de\ ruptura\ (mm)}{Longitud\ original\ (mm)}\right) \times 100\% \quad (2)$$

Por otro lado se realizó la determinación del módulo de Young a partir de la ecuación 3. El módulo de Young se estima teniendo en cuenta la pendiente de la porción lineal obtenida en las curvas de tensión en función de la deformación.

$$Módulo\ de\ Young\ \left(\frac{N}{mm^2}\right) = \left(\frac{Tensión\ \left(\frac{N}{mm^2}\right)}{Deformación\ \left(\frac{mm}{mm}\right)}\right) \qquad (3)$$

2.3 Evaluación de las propiedades de transporte

2.3.1 Transferencia del vapor de agua

Se siguió el procedimiento descrito por la ASTM E96 (ASTM 2005) del método del agua, en el cual los recipientes diseñados para tal fin son llenados con un volumen fijo de agua destilada (30 ml) y posteriormente la película a evaluar se adecua de tal modo que cubra el recipiente por completo, asegurándose de sellar los bordes herméticamente. A continuación el sistema de prueba es llevado a un desecador acondicionado a 55% de humedad relativa y 18 ± 2°C de temperatura, tal como se observa en la figura 6.

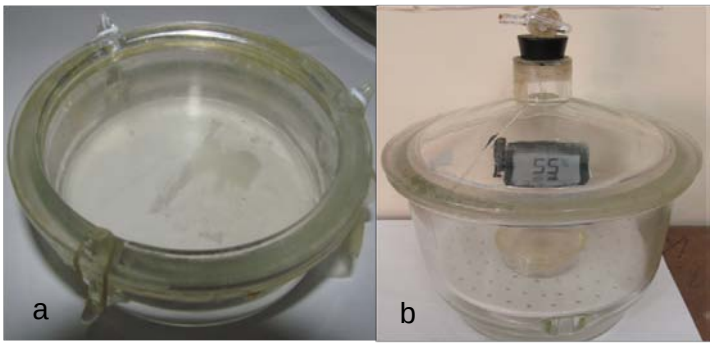


Figura 6. Ensayo de transferencia del vapor de agua. a) Previo al acondicionamiento en el desecador; b) en el desecador

La transferencia del vapor de agua es una estimación de los gramos de agua que atraviesan un área determinada de un material, dentro del tiempo al que se ajuste la evaluación. El peso es monitoreado cada 12 horas durante 3 días, y se grafica el cambio de masa expresado como variación en el peso, en función del tiempo. La pendiente resultante es dividida por el área expuesta de la película para determinar la transmisión al vapor de agua (WVT), como se indica en la ecuación 4.

$$WVT\ \left(\frac{G}{tA}\right) = \frac{\left(\frac{G\ (g)}{t(h)}\right)}{A\ (m^2)} \qquad (4)$$

G = cambio de peso (de la línea recta) (g)
T = tiempo (h)
G/t = pendiente de la línea recta (g/h)
A = área del ensayo (área de la boca del recipiente)
WVT = transmisión de vapor de agua (g/h·m^2)

2.3.2 Índice de hinchamiento

La realización de este ensayo se llevó a cabo utilizando dos medios de prueba, buffer de acetatos pH 5.5 y buffer de fosfatos pH 7.4. Se emplearon películas con dimensiones 2 cm x 2 cm que fueron depositadas dentro de una malla metálica, previamente pesada. La malla con la película fue puesta en contacto con 30 ml del medio de ensayo respectivo contenido en una caja de petri como se observa en la figura 7.

Figura 7. Ensayo para la determinación del índice de hinchamiento

Una vez adecuado el montaje para el ensayo, la malla junto con la película era retirada del medio cada 2 minutos, y a continuación se secaban homogéneamente con toallas de tela para retirar el exceso de solución y así poder proceder a la toma de su peso. Estos registros se hicieron durante una hora por triplicado. El índice de hinchamiento S, por sus siglas en inglés, fue calculado mediante la ecuación 5:

$$Índice\ de\ hinchamiento\ (S) = \frac{S_t - S_0}{S_0} \qquad (5)$$

En la cual S_0 es el peso inicial de la película a tiempo cero, S_t es el peso de la película hinchada después de un tiempo t (Shilpa y Poddar, 2010).

2.4 Validación de la metodología analítica

De acuerdo a lo descrito por Rojas et al., (2008) en su determinación de antimoniato de meglumina en formas inyectables, cada muestra fue tratada con la adición de una solución de yoduro de potasio (KI) 1.75% y solución de ácido clorhídrico (HCl) 3.75 N, dando como tiempo de reacción 10 minutos hasta la aparición de un complejo coloreado ligeramente amarillo, realizando lecturas espectrofotométricas en un espectrofotómetro T70 UV/VIS.

2.4.1 Linealidad

Las curvas de calibración tanto para el sistema, así como para el método, se construyeron a partir de 10 determinaciones a diferentes niveles de concentración. Los ensayos corresponden al promedio de tres determinaciones.

2.4.2 Precisión

La precisión fue evaluada empleando tres concentraciones diferentes por triplicado y analizada en el nivel de repetibilidad, considerando que el estudio se llevó a cabo por el mismo investigador, los mismos reactivos, los mismos equipos e instrumentos, en el mismo día (Heredia, 2001).

2.4.3 Exactitud

En esta determinación fueron empleados tres niveles de concentración, a partir de los cuales se construyeron gráficas de absorbancia en función de la concentración, para sistema y método, haciendo una relación del porcentaje de recuperación a partir de las pendientes halladas.

2.4.4 Especificidad

Se empleó un patrón de trióxido de antimonio en un rango de longitudes de onda contempladas en extremos inferior y superior de la referencia a 352 nm.

2.5 Ensayos de funcionalidad

2.5.1 Estudio del comportamiento mucoadhesivo de las películas

Este ensayo se realizó en el analizador de textura ajustándolo en el modo de adhesión. Un recuadro de 10 mm x 10 mm se sujetó de sus cuatro esquinas a un soporte metálico (Vallejo, 2010) como lo indica la figura 8, llevando a cabo 10 determinaciones, empleando dos lotes de estudio. Se utilizó una sonda cilíndrica P/5 que se acercaba a la muestra a una velocidad de 0.5 mm/seg aplicando una fuerza de 5 N, dicha fuerza se mantuvo durante 1 min como tiempo de contacto entre la sonda y la muestra, posteriormente ocurrió una separación entre la sonda y la película evaluada, con una distancia de retorno de 20 mm a una velocidad máxima de 10 mm/seg. Se empleó extracto de mucosa intestinal fetal bovina para simular las condiciones de adhesión sobre la zona ulcerada de la lesión. El trabajo de adhesión fue determinado a partir de la región positiva del área bajo la curva.

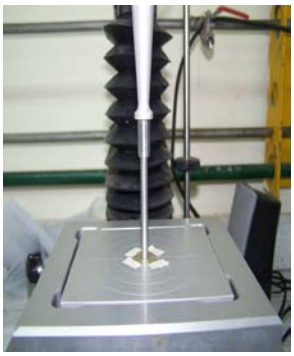


Figura 8. Ensayo de mucoadhesión

2.5.2 Perfil de liberación *in vitro* del fármaco

Para este ensayo se emplearon celdas de difusión *in vitro* de Franz de 15 ml de capacidad (Siliser). En el compartimento donor de la celda, se adecuó la película a evaluar, la cual se encontraba separada del compartimento receptor, mediante una membrana sintética de acetato de celulosa que simula la piel. El compartimento receptor contenía una solución de buffer de fosfatos pH 7.4, como medio para la difusión del fármaco presente en la película polimérica (figura 9). El sistema se evaluó a una temperatura de 32±2 °C, manteniendo bajo agitación constante de 100 rpm la solución de buffer de fosfatos pH 7.4 (Siewert *et al.,* 2003). Se tomaron muestras de 1 ml a diferentes intervalos de tiempo durante 3 días, las cuales eran reemplazadas inmediatamente por volúmenes iguales de la solución buffer. Los ensayos se hicieron por triplicado. Las absorbancias fueron medidas a 352 nm tratando las muestras según lo recomendado en estudios previos (Rojas *et al.,* 2008). Se graficó el porcentaje acumulado de fármaco liberado en función del tiempo.

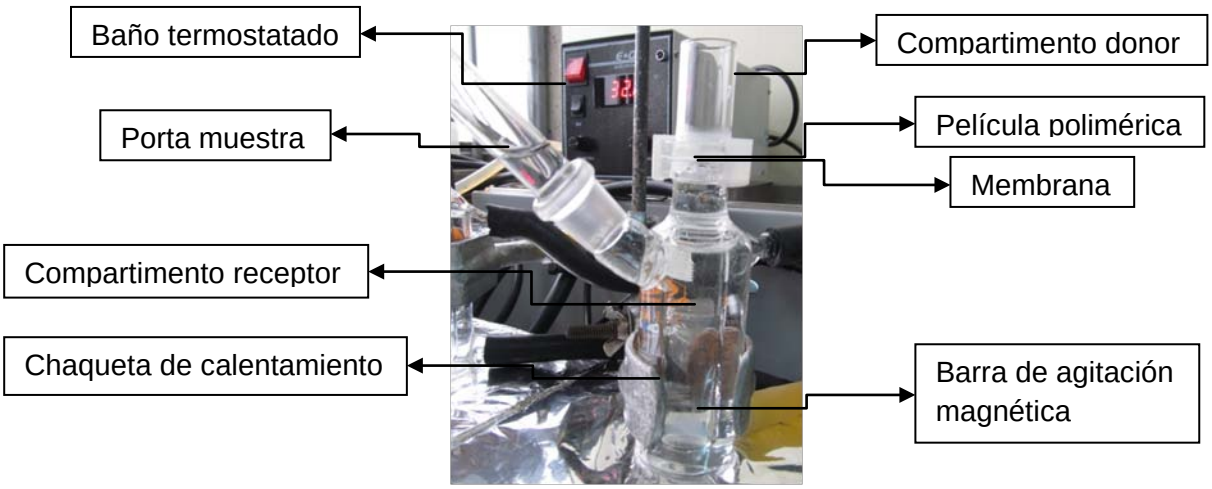


Figura 9. Partes de una celda de difusión de Franz

2.6 Determinación morfológica por microscopía electrónica de barrido (SEM)

La inspección morfológica de las películas se determinó en un Microscopio Electrónico de Barrido FEI QUANTA 200. Las muestras se sometieron a un tratamiento previo de recubrimiento por metalización, realizado en un Sputter SDC-050 de la Marca Balzers, en condiciones de prevacío ($<10^{-1}$ torr) con argón como gas de ataque (plasma) sobre una placa (ánodo) de oro-paladio (8:2)). La película se deposita sobre las muestras (cátodo) a corriente de descarga de +/- 50mA y el espesor típico es de +/- 200 nm.

Se analizaron cortes superficiales y transversales de las películas magnificando la observación en 1200x y 3000x aumentos.

2.7 Análisis estadístico de los datos

La interpretación estadística de los datos a nivel de laboratorio fue llevada a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) y test HSD Tukey con un nivel de confianza del 95%. Para tal fin se utilizó el software SAS 9.0 para Windows.

3. Resultados y discusión

3.1 Estandarización del método de elaboración de las películas

3.1.1 Preparación de las películas

Las condiciones de estudio se siguieron de acuerdo a los parámetros especificados por diferentes autores, en algunos casos dejando las muestras en agitación durante toda la noche, y en otros utilizando un tiempo de secado incluso de 24 horas (Cárdenas *et al.,* 2008; Khan *et al.,* 2000; Sezer *et al.,* 2007) encontrando que al emplear temperaturas de preparación >60°C, así como velocidades de agitación >400 rpm se incorporaban grandes cantidades de burbujas dentro de la preparación, retrasando el tiempo para el inicio del secado, por otro lado con velocidades de agitación <400 rpm, la mezcla tardaba mucho tiempo en alcanzar una incorporación homogénea de sus componentes. Por esta razón se eligieron las condiciones propuestas en el trabajo de Vallejo (2010) obteniendo películas más uniformes, sin aparición de burbujas y, optimizando el tiempo del desarrollo de la prueba.

La tabla 1 presenta los parámetros utilizados en la preparación de las películas de estudio, quitosán de bajo y mediano peso molecular, en solventes orgánicos de ácido láctico y ácido acético.

Tabla 1. Parámetros empleados en la preparación de las películas mediante la técnica de casting

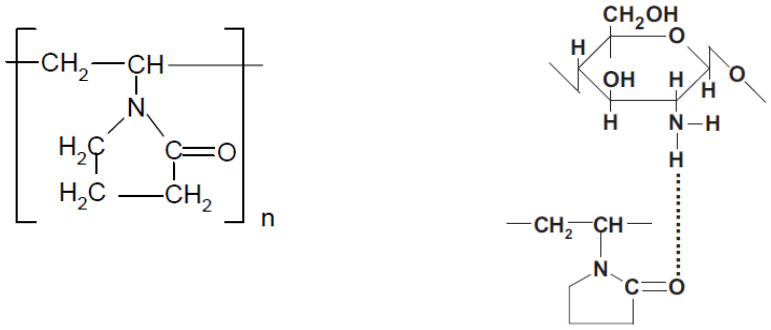
Mezcla			**Secado**	
Temperatura (°C)	Velocidad de agitación (rpm)	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Tiempo (h)
60±5	400	1	55±5	8 - 10

En total se prepararon ocho películas, cuatro de ellas como control (sin antimoniato de meglumina) y cuatro de ellas como películas de evaluación (con antimoniato de meglumina), todas ellas con un porcentaje mínimo de PVP.

Piñero et al., (2006) emplearon la técnica de casting en diseños de películas biopoliméricas para liberación de fármacos con actividad promisoria leishmanicida, diseñando un nuevo modelo de películas biodegradables de ácido polilacticoglicólico (PLGA) tras incorporar una chalcona semisintética, la benzilideneacetofenona (*trans* - chalcona) cuyos resultados proporcionaron un sistema de liberación local útil para tratamiento experimental de leishmaniasis.

Las películas de quitosán preparadas en ácido acético con PVP durante el presente estudio, presentaron un aspecto final transparente, lo cual es consistente con los

resultados encontrados por Li (2008). Sin embargo, al comparar las preparaciones hechas en ácido acético en nuestro desarrollo, frente a aquellas preparadas en ácido láctico, las primeras desprendieron un leve olor acídico con respecto a las segundas, que por su parte fueron imperceptibles olfativamente y además, presentaron una flexibilidad mucho mayor con respecto a aquellas preparadas en ácido acético, lo cual se acerca a las características esperadas para el tipo de diseño evaluado, puesto que las películas flexibles se pueden manipular más fácilmente adecuándolas a las diferentes superficies de la piel.



a) Polivinilpirrolidona, PVP b) Enlace de hidrógeno entre quitosán y PVP

Figura 10. Estructura química de PVP y su interacción con enlace de hidrógeno del quitosán. Imágenes tomadas de Sionkowska (2011); Velilla (2002)

Como se observa en la figura 10 diversos estudios han sugerido que la mezcla del PVP con el quitosán en las películas se promueve gracias a que los grupos carbonilos en los anillos de pirrolidona del PVP, forman enlaces de hidrógeno con los grupos amino e hidroxilo del quitosán dando lugar a un material con nuevas características (Li *et al.,* 2010; Sionkowska, 2011; Velilla, 2002). En 1992 se emplearon mezclas de quitosán/PVP destinadas a usarse como membranas de diálisis, reportando que éstas fueron transparentes y no hubo separación del PVP (Fang y Goh, 2000; Qurashi *et al.,* 1992).

La mezcla entre polímeros sintéticos y naturales se ha convertido en una estrategia práctica que aprovecha las propiedades inherentes de los materiales por separado, para crear nuevas alternativas de diseño que potencialicen las bondades individuales del uso de estos materiales ahora como uno solo. El PVP es un polímero sintético, no tóxico y biocompatible destacado por su excelente absorción y habilidades en la formación de complejos y películas, por lo que ha sido ampliamente utilizado en medicina y farmacia, al sumar estas características con las diversas aplicaciones del quitosán que han venido siendo mencionadas, se obtiene un material con propiedades mejoradas (Marsano *et al.,* 2004).

3.1.2 pH de las dispersiones poliméricas

Los resultados obtenidos en la determinación del pH de las dispersiones poliméricas, son un claro reflejo de la influencia del tipo de ácido utilizado en las preparaciones. De esta manera, como se observa en la tabla 2 así como en la figura 11, las dispersiones preparadas en ácido láctico presentaron un pH más ácido con respecto a aquellas preparadas en ácido acético lo cual se explica por sus valores de pKa 3.86 y 4.76, respectivamente (Rowe *et al.,* 2003).

Tabla 2. pH de las dispersiones poliméricas

	pH	
Dispersión polimérica	Sin fármaco	Con fármaco
Bajo peso molecular en ácido acético	4.19 ± 0.01	4.04 ± 0.02
Mediano peso molecular en ácido acético	4.09 ± 0.00	4.01 ± 0.00
Bajo peso molecular en ácido láctico	3.69 ± 0.00	3.38 ± 0.02
Mediano peso molecular en ácido láctico	3.36 ± 0.02	3.31 ± 0.00

Todas las preparaciones contienen PVP; el símbolo ± indica la desviación estándar de tres réplicas

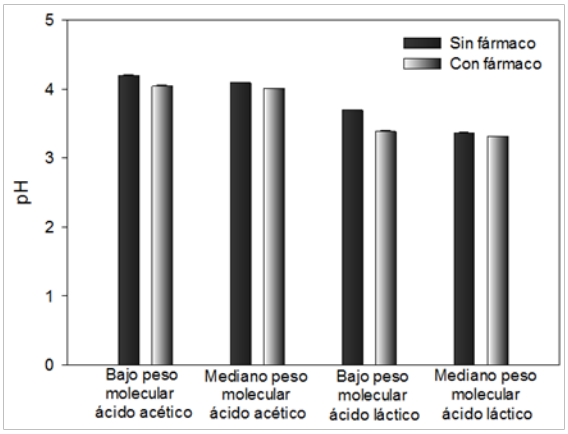


Figura 11. pH de las dispersiones poliméricas evaluadas. Cada barra representa la media de tres réplicas; las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Por otro lado, la incorporación del fármaco lleva a una leve disminución del pH en las dispersiones poliméricas, debido a que la sal de antimonio pentavalente presenta un carácter ácido que por ende influye sobre esta propiedad favoreciendo la acidificación de las dispersiones evaluadas.

3.1.3 Viscosidad de las dispersiones poliméricas

El incremento en la concentración de quitosán conduce a un aumento en la viscosidad de las soluciones de éste, mientras que al elevar la temperatura y el grado de deacetilación disminuye la viscosidad del producto (Veiga y Ruiz, 2004). Teniendo en cuenta los datos reportados en la tabla 3 y figura 12, la viscosidad fue menor para las dispersiones que contenían el polímero de bajo peso molecular y, mayor para aquellas de mediano peso molecular, lo cual está asociado con el volumen que ocuparía la macromolécula en solución, así, a mayor peso molecular el volumen ocupado por la macromolécula será mayor y por tanto su viscosidad también. Con respecto a la relación con el grado de deacetilación, este proceso involucra la remoción de grupos acetilo de la cadena molecular de la quitina, dando como resultado un componente con un grupo amino reactivo ($-NH_2$) el cual es el quitosán (Kalut, 2008). Los grados de deacetilación para los quitosanes utilizados fueron tomados del certificado de análisis enviado por Sigma –

Aldrich, para el quitosán de bajo peso molecular es de 95.5% y para el quitosán de mediano peso molecular es de 76.0%, a menor peso molecular mayor será el grado de deacetilación (Araya y Meneses, 2011). Bajo las consideraciones mencionadas, como era de esperarse la relación entre viscosidad y grados de deacetilación fue inversa.

Tabla 3. Viscosidad de las dispersiones poliméricas

	Viscosidad (cp)	
Dispersión polimérica	Sin fármaco	Con fármaco
Bajo peso molecular en ácido acético	132.7 ± 1.7	130.3 ± 0.5
Mediano peso molecular en ácido acético	203.9 ± 0.8	203.2 ± 0.2
Bajo peso molecular en ácido láctico	198.9 ± 0.8	196.1 ± 0.1
Mediano peso molecular en ácido láctico	230.0 ± 0.0	218.0 ± 0.0

Todas las preparaciones contienen PVP; el símbolo ± indica la desviación estándar de tres réplicas

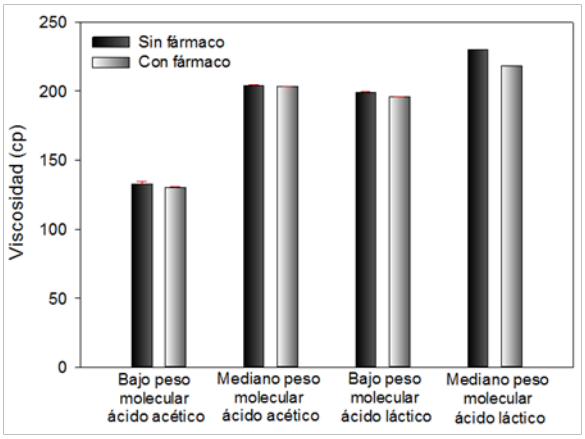


Figura 12. Viscosidad de las dispersiones poliméricas evaluadas. Cada barra representa la media de tres réplicas; las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Las dispersiones poliméricas con mayor viscosidad fueron aquellas de mediano peso molecular, lo cual es consistente con la relación viscosidad peso molecular ya que es directamente proporcional.

La incorporación del fármaco no generó un efecto significativo en la viscosidad de las dispersiones poliméricas, lo cual sugiere que se presenta un tipo de interacción superficial en la cual el fármaco ocuparía los sitios disponibles de los protones cedidos por los ácidos empleados, de tal manera que las moléculas no se extenderían y de esta manera la viscosidad se mantendría constante (Fernández; Li, 2008). En el caso de la dispersión del polímero de mediano peso molecular en ácido láctico, se presentó una ligera disminución de la viscosidad tras la interacción con el fármaco, que probablemente se deba a la influencia de las cargas ácidas de la sal de antimonio pentavalente, sobre el desplazamiento de los iones lactato en este medio de evaluación.

3.1.4 Espesores de las películas poliméricas

La homogeneidad de la distribución de las películas sobre los moldes de vertido, es el resultado esperado en este tipo de determinación. La tabla 4 muestra los espesores promedios de las diferentes películas evaluadas.

Tabla 4. Espesores de las películas obtenidas en el estudio

Película	Espesor promedio (mm ± SD*)	
	Sin fármaco	Con fármaco
Bajo peso molecular en ácido acético	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.00
Mediano peso molecular en ácido acético	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.01
Bajo peso molecular en ácido láctico	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01
Mediano peso molecular en ácido láctico	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.00

Todas las preparaciones contienen PVP; cada valor representa la media de treinta réplicas; *desviación estándar de los valores obtenidos en las variables de estudio

Según los resultados obtenidos en la determinación del pH, el ácido láctico posee un pKa menor con respecto al del ácido acético y en su estructura posee un mayor número de hidrógenos, se infiere entonces que tras la evaporación del ácido en el proceso de formación de la película al ponerse nuevamente en contacto con el ambiente, ésta toma cierta humedad que sumada a los hidrógenos propios de su molécula, favorecen la capacidad de captación de agua, dando como resultado películas con mayor espesor frente a aquellas preparadas en ácido acético, lo cual es observado en la tabla 4 y figura 13. El polímero de bajo peso molecular en ácido láctico presenta espesores más bajos frente al polímero de mediano peso molecular en el mismo solvente, debido a que el primero es una molécula de menor tamaño y por lo tanto tiene menos sitios disponibles en la interacción con el solvente. En general la adición del antimoniato de meglumina en las preparaciones no tuvo una influencia significativa sobre los espesores de las películas, de tal manera que estos se mantuvieron constantes, a excepción de la película de mediano peso molecular en ácido láctico en la cual el espesor disminuyó levemente. Posiblemente los espesores no se vieron afectados entre las películas control y las películas con fármaco, porque al ser una molécula de menor tamaño con respecto al polímero que es una macromolécula, logra acomodarse incorporándose homogéneamente a la preparación.

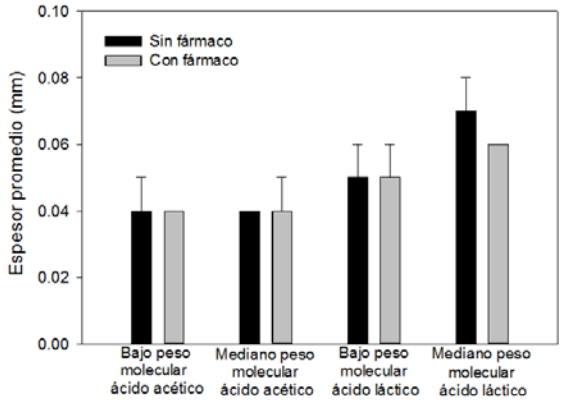


Figura 13. Espesor promedio de las películas evaluadas. Cada barra representa la media de treinta réplicas; las barras de error corresponden a la desviación estándar.

La tabla 5 muestra los resultados obtenidos por diferentes autores al evaluar el espesor de sus películas poliméricas.

Tabla 5. Comparación de espesores evaluados en diversos estudios con películas de quitosán

Solvente	Volumen (ml)	Moldes	Dimensión (cm)	Espesor (mm)	Fuente
Ácido acético	50	Teflón	-	0.02 – 0.1	Balau *et al.,* (2004)
	15 -20	Vidrio	-	0.021 – 0.04	Cárdenas *et al.,* (2008)
	10 ml	Petri	5	0.042	Li *et al.,* (2010)
	45	Petri	9	0.067	Aldana *et al.,* (2012)
	100	Acrílico	15	0.04	*Estudio en curso*
Ácido láctico	15	Petri	8.8	0.035	Fuentes y Pastor (2009)
	-	Vidrio	-	0.048	Khan *et al.,* (2000)
	20	Petri	-	0.03 – 0.04	Niamsa y Baimark (2009)
	3	Petri	-	0.029	Sezer *et al.,* (2007)
	100	Acrílico	15	0.05	*Estudio en curso*

Los resultados de la tabla 5 son heterogéneos, puesto que los parámetros de preparación son particulares para cada caso, desde los volúmenes finales de la preparación, hasta el uso de moldes de vertimiento de diferente naturaleza y dimensión, se podría inferir que el uso de bajos volúmenes, por ejemplo, en recipientes de poca dimensión llevaría a la obtención de películas con espesores más bajos, mientras que si los volúmenes aumentan y se vierten sobre moldes pequeños, se esperarían películas de mayor espesor.

3.2. Determinación de propiedades mecánicas

3.2.1 Resistencia a la ruptura por tensión

Las gráficas de la figura 14 muestran la relación de la fuerza en función de la distancia recorrida hasta el momento de la ruptura de las películas. Las películas preparadas en ácido acético tanto de bajo y mediano peso molecular (Figuras 14 A y C), se rompieron durante la realización del ensayo, como lo señalan las flechas, alcanzando altas fuerzas de tensión previas a su ruptura, pero recorriendo distancias muy cortas con relación a aquellas películas en ácido láctico. Dichas películas en ácido acético no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados ($p>0,05$), lo anterior podría atribuirse a observaciones como las realizadas por Park et al., (2002) en las que se sugirió que las películas formadas con quitosán en solución de ácido acético llevarían a la formación de dímeros, dando como resultado una estructura más compacta con respecto a aquellas películas preparadas en otras soluciones ácidas, de tal manera que se crea una interacción intermolecular relativamente fuerte. Por otro lado, puesto que el ácido acético es una molécula de menor tamaño con respecto a la de ácido láctico, otra razón que puede atribuirse a la ruptura de las preparaciones en ácido acético, es el

fácil ingreso del PVP de naturaleza rígida y frágil en dichas preparaciones, que genera una fuerte interacción de los enlaces de hidrógeno del quitosán con las macromoléculas de PVP (Yeh *et al.,* 2006; Zeng *et al.,* 2011) contribuyendo a la formación de una estructura más rígida.

En el caso de las películas poliméricas en las cuales se empleó ácido láctico (Figuras 14 B y D), éstas únicamente se estiraron, mas no se rompieron, de modo que al finalizar la prueba retornaron a su longitud inicial, por lo anterior, el comportamiento de las películas de quitosán en ácido láctico es un tipo de deformación elástica, caracterizada por presentarse al aplicar la fuerza, permanecer durante el esfuerzo y desaparecer una vez concluye la fuerza (Askeland y Phulé, 2004). De acuerdo con el análisis por el test de Tukey hubo diferencias estadísticamente significativas *(p<0,05)* entre los tratamientos de estudio (Figuras 14 B y D) con una notable disminución en la fuerza de tensión (~50%) de las preparaciones con antimoniato de meglumina, el quitosán forma una sal soluble con el ácido láctico por las interacciones electrostáticas entre el grupo amino protonado del polímero y los grupos carbonilos del ácido, se sugiere que al incorporar la sal de antimonio ésta podría debilitar las uniones del entramado polimérico, hasta el punto de disminuir la fuerza tensil.

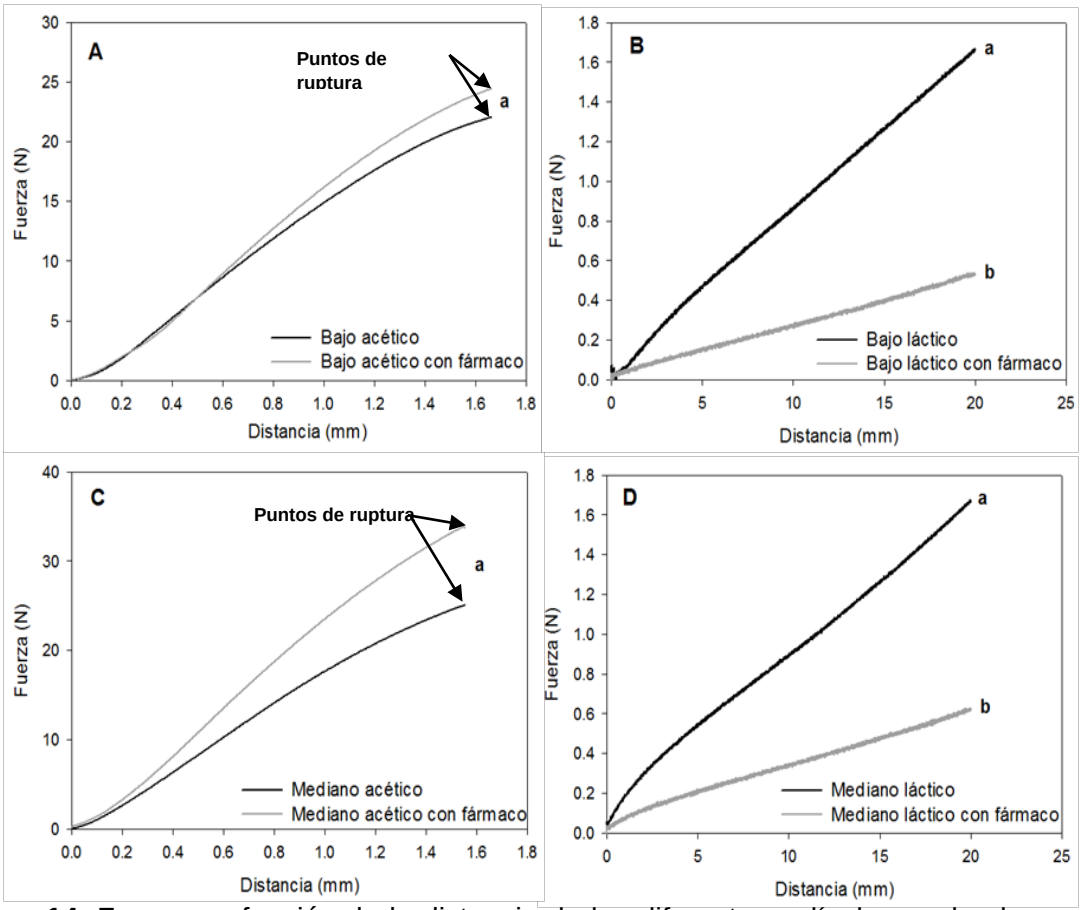


Figura 14. Fuerza en función de la distancia de las diferentes películas evaluadas. Cada valor representa la media de siete réplicas. A y C son tratamientos de polímeros en ácido acético, Tukey (*p>0,05*) presentan ruptura; B y D son tratamientos de polímeros en ácido láctico, Tukey (*p<0,05*) presentan elongación. Letras minúsculas diferentes indican que hay diferencias estadísticamente significativas mediante el test de Tukey HSD (*p<0,05*).

El ácido láctico no solo es empleado como solvente orgánico para las preparaciones con el quitosán, sino también, ha sido utilizado como plastificante en algunas experimentaciones con el fin de mejorar la flexibilidad al reducir la resistencia puesto que debilita las fuerzas intermoleculares entre las cadenas adyacentes de polímeros (Khan *et al.,* 2000; Park *et al.,* 2002) por esta razón las películas preparadas en este solvente son más flexibles frente a aquellas preparadas en ácido acético.

Los materiales poliméricos se caracterizan según sus propiedades de tensión en función de la deformación (Labarre *et al.,* 2011). En las gráficas del comportamiento de tensión en función de la deformación (Figuras 15 A - D) el análisis por el test de Tukey *(p<0,05)* indicó diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, es así como en las figuras 15 A y 15 C se observa que las películas en ácido acético sin fármaco, presentaron una baja deformación con mayor esfuerzo, atribuible a su estructura más rígida, mientras que las películas sin fármaco formadas en ácido láctico (Figuras 15 B y D) se alargaron fácilmente logrando un mayor alcance en su deformación, y a su vez requieren de poco esfuerzo puesto que se resisten menos. Lo anterior es consistente con los resultados obtenidos por Khan et al., (2000) en su evaluación de las propiedades mecánicas de preparaciones de películas de quitosán, tanto en ácido acético como en ácido láctico, en la cual las fuerzas de tensión fueron mayores para las primeras y menores para las segundas. Así mismo del estudio de Araya (2011) sobre la influencia de algunos ácidos orgánicos en las propiedades de películas de quitosán, se infirió que las películas de mayor resistencia frente a la ruptura por tensión fueron aquellas preparadas en ácido acético, seguidas de las películas con ácido láctico, concluyendo que a mayor acidez del ácido orgánico utilizado menor es la interacción con el polímero.

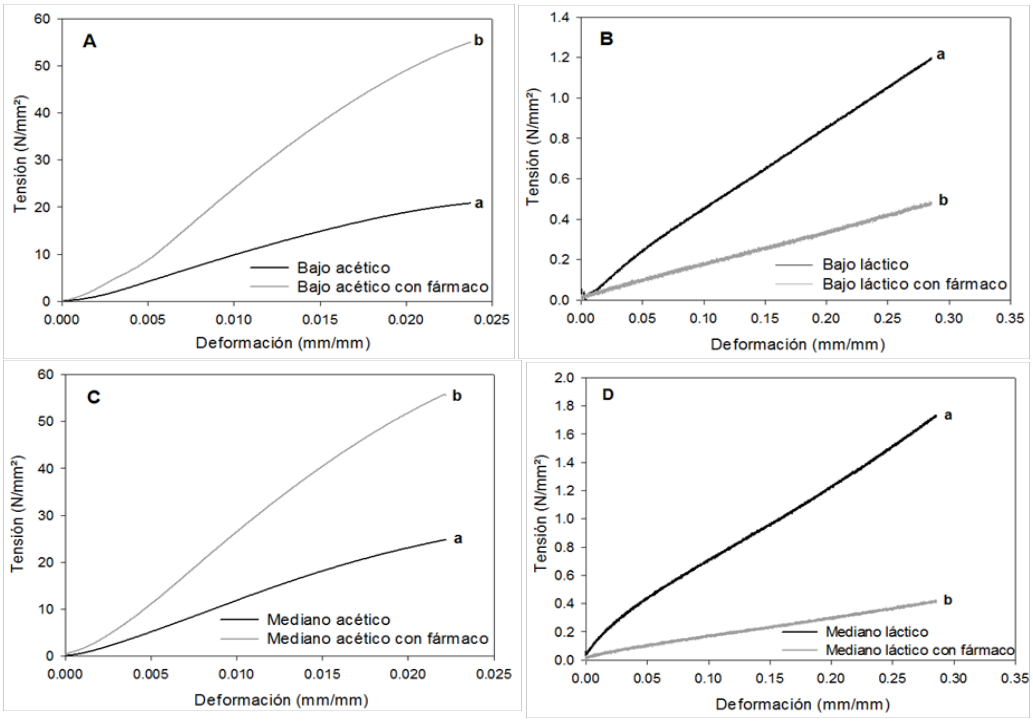


Figura 15. Tensión en función de la deformación de las diferentes películas evaluadas. Cada valor representa la media de siete réplicas. A y C son tratamientos de polímeros en ácido acético, Tukey *(p<0,05)*; B y D son tratamientos de polímeros en ácido láctico, Tukey *(p<0,05).* Letras minúsculas diferentes indican que hay diferencias estadísticamente significativas mediante el test de Tukey HSD (*p<0,05*).

Por otro lado, para aquellas películas con antimoniato de meglumina (Figuras 15 Ab – Db) el comportamiento es semejante a aquel obtenido en las gráficas de fuerza en función de la distancia (Figuras 14 A – D), es así como en aquellas preparaciones de ácido acético (Figuras 15 Ab y Cb) se requiere de un alto esfuerzo de tensión y poca deformación, frente a las películas de ácido láctico (Figuras 15 Bb y Db) en cuyo caso el comportamiento es inverso, lo cual podría explicarse de acuerdo a las consideraciones mencionadas previamente sobre las interacciones de sus componentes, teniendo en cuenta que el fármaco ingresa con mayor facilidad en las películas de ácido acético acomodándose en los espacios intermoleculares de la preparación. Por el contrario, en las películas con ácido láctico, el carácter ácido de la sal de antimonio contribuye a la acidificación del medio debilitando las uniones probablemente por el desplazamiento del ion lactato de tal manera que se disminuye el esfuerzo de tensión.

Adicionalmente se llevó a cabo la determinación de la máxima fuerza de tensión, elongación y el módulo de Young, obteniendo los datos de la tabla 6. Cuando la pendiente de la porción lineal de la curva tensión en función de la deformación es pronunciada, como se presenta en los casos de las películas preparadas en ácido acético (Figuras 15 A y 14 C), este comportamiento indica que tales películas se resisten a la deformación puesto que se necesitarían grandes fuerzas para separar los átomos hasta lograr una deformación elástica (Askeland y Phulé, 2004; Brindis, 2002) por lo tanto estas películas presentan altos módulos de Young como se puede ver en la tabla 6. Según las consideraciones hechas por Sionkowska et al., (2005) generalmente las mezclas de quitosán en ácido acético con PVP exhiben bajas elongaciones y altos módulos de Young, así como se observa en los resultados obtenidos en este estudio.

Tabla 6. Evaluación de las propiedades mecánicas de las películas poliméricas

	Tensión (N/mm^2 ± SD)		**Elongación (% ± SD)**		**Módulo de Young (N/mm^2)**	
Película	Sin fármaco	Con fármaco	Sin fármaco	Con fármaco	Sin fármaco	Con fármaco
Bajo peso molecular en ácido acético	20.78±3.87	55.02±7.24	77.91±0.50	105.85±1.02	960.578	2559.45
Mediano peso molecular en ácido acético	24.77±2.36	55.51±8.18	80.47±2.37	106.54±3.15	1200.56	2705.65
Bajo peso molecular en ácido láctico	1.19±0.12	0.48±0.07	101.53±0.74	132.16±3.02	4.11	1.60
Mediano peso molecular en ácido láctico	1.73±0.43	0.56±0.07	106.91±3.95	128.76±0.05	5.49	1.76

Todas las preparaciones contienen PVP; cada valor representa la media de tres réplicas; el símbolo ± indica la desviación estándar

Por el contrario, en los casos cuya pendiente fue poco pronunciada, es decir para las películas preparadas en ácido láctico (Figuras 15 B y D), se presentaron bajos módulos de Young (tabla 6), a partir de lo cual se infiere que dichas películas pueden ser deformadas con facilidad. Las fibras de elastina presentes en la dermis, tienen un módulo de Young de $6x10^5$ N/m^2, o bien, 0.6 N/mm^2 alcanzando a estirarse hasta un 250% de su longitud original. Las películas del presente estudio preparadas en ácido láctico, aún toleran modificaciones tecnológicas que puedan llevarlas a alcanzar un módulo de Young cercano al de las fibras de elastina para asemejarse más a un comportamiento en piel. El colágeno por su parte, es muy extensible y se rompe cuando el esfuerzo de tensión es de aproximadamente 500 millones de Newtons por metro cuadradro ($5x10^8$ N/m^2), es decir, que su resistencia es similar a la del acero (Gutiérrez 2000).

La tabla 7 muestra una comparación de las características mecánicas reportadas por diferentes autores, en estudios realizados con películas de quitosán tanto en ácido acético como en ácido láctico, resaltando la elección de éste último.

Tabla 7. Características mecánicas de películas de quitosán evaluadas en dos solventes orgánicos

Películas de quitosán en ácido acético	**Películas de quitosán en ácido láctico**	**Aplicaciones sobre lesiones cutáneas**
Fuertes y rígidas	Suaves y flexibles	Khan *et al.,,* (2000)
No flexibles	Mejoran la flexibilidad	Niamsa y Baimark (2009)
No evaluadas	Alta elasticidad y poca fuerza mecánica	Sezer *et al.,,* (2007)

De acuerdo con Khan et al., (2000) para dispositivos médicos aplicados sobre la piel se recomienda el diseño de películas que sean fuertes pero flexibles. Teniendo en cuenta las consideraciones de la tabla 7, se podría inferir que las películas de quitosán en ácido láctico, soportarían mucho mejor su manipulación en el momento de ser utilizadas sobre la piel, adecuándose fácilmente al contorno de aplicación, evitando por otro lado la ruptura que podría presentarse en el caso de emplear películas en ácido acético, dada su rigidez.

3.3 Evaluación de las propiedades de transporte

3.3.1 Transferencia del vapor de agua

En cuanto a los resultados obtenidos para el ensayo de la transferencia del vapor de agua, éstos se presentan en la tabla 8 y en la figura 16.

El carácter hidrofóbico del quitosán no contribuye en la transmisión del vapor de agua. Sin embargo, con la inclusión del PVP dada su naturaleza hidrofílica, esta propiedad de transporte se favorece (Li *et al.,* 2010), induciendo el movimiento del vapor de agua a través de la película y a su vez, evitando la condensación del agua, lo cual podría ser un causal de deterioro microbiano (Hernandez, 2009).

Tabla 8. Parámetros en la determinación de la transmisión al vapor de agua

Película polimérica	Área de prueba (m^2)	Pendiente de la línea recta (g/h)	Transmisión al vapor de agua (g/m^2h)	R^2
Bajo peso molecular en ácido acético	0.0050	0.0210	4.2913 ± 0.7104	0.9993
Bajo peso molecular en ácido acético con fármaco	0.0050	0.0261	5.2024 ± 0.6466	0.9975
Mediano peso molecular en ácido acético	0.0052	0.0238	4.6677 ± 0.6690	0.9998
Mediano peso molecular en ácido acético	0.0052	0.0289	5.6181 ± 0.6307	0.9968
Bajo peso molecular en ácido láctico	0.0050	0.0231	4.5956 ± 0.4377	0.9950
Bajo peso molecular en ácido láctico con fármaco	0.0050	0.0259	5.1526 ± 1.4722	0.9995
Mediano peso molecular en ácido láctico	0.0048	0.0197	4.1228 ± 0.9627	0.9993
Mediano peso molecular en ácido láctico con fármaco	0.0048	0.0347	7.2619 ± 0.5950	0.9996

Todas las preparaciones contienen PVP. Cada valor representa la media de tres réplicas; el símbolo ± indica la desviación estándar.

Tras realizar el análisis estadístico por el test de Tukey *($p<0,05$)* únicamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas, entre los tratamientos de la película de quitosán de mediano peso molecular en ácido láctico (Figura 16 D) este comportamiento podría explicarse considerando que las propiedades de barrera de la película disminuyen por la propiedad plastificante del ácido láctico, la cual crea un efecto sinérgico con el vapor de agua dentro de la matriz polimérica del quitosán (Wiles *et al.,* 2000).

Por otro lado, luego de incorporar el fármaco se presentaron transmisiones de vapor de agua más altas con respecto a sus controles, quizás porque los grupos hidroxilo de la sal de antimonio interactuarían con la cadena polimérica del quitosán, reduciendo los enlaces de hidrógeno internos, así como también las fuerzas intermoleculares, de este modo las cadenas del quitosán incrementarían su movilidad facilitando el paso del agua a través de la red polimérica (Trejo *et al.,* 2001).

Todas las preparaciones mantuvieron un rango uniforme en la transmisión del vapor de agua, indicando que se presenta el paso de ésta a través de las películas en alguna proporción. Idealmente la película debe permitir una permeabilidad que no sea tan alta, puesto que bajo esta condición, tras la evaporación del agua se favorecería el crecimiento de microorganismos, igualmente la permeabilidad de la película no debe ser tan baja, porque así se aumentaría la retención de agua generando en la lesión cutánea la posibilidad de formación de nuevas secreciones (Khan *et al.,* 2000).

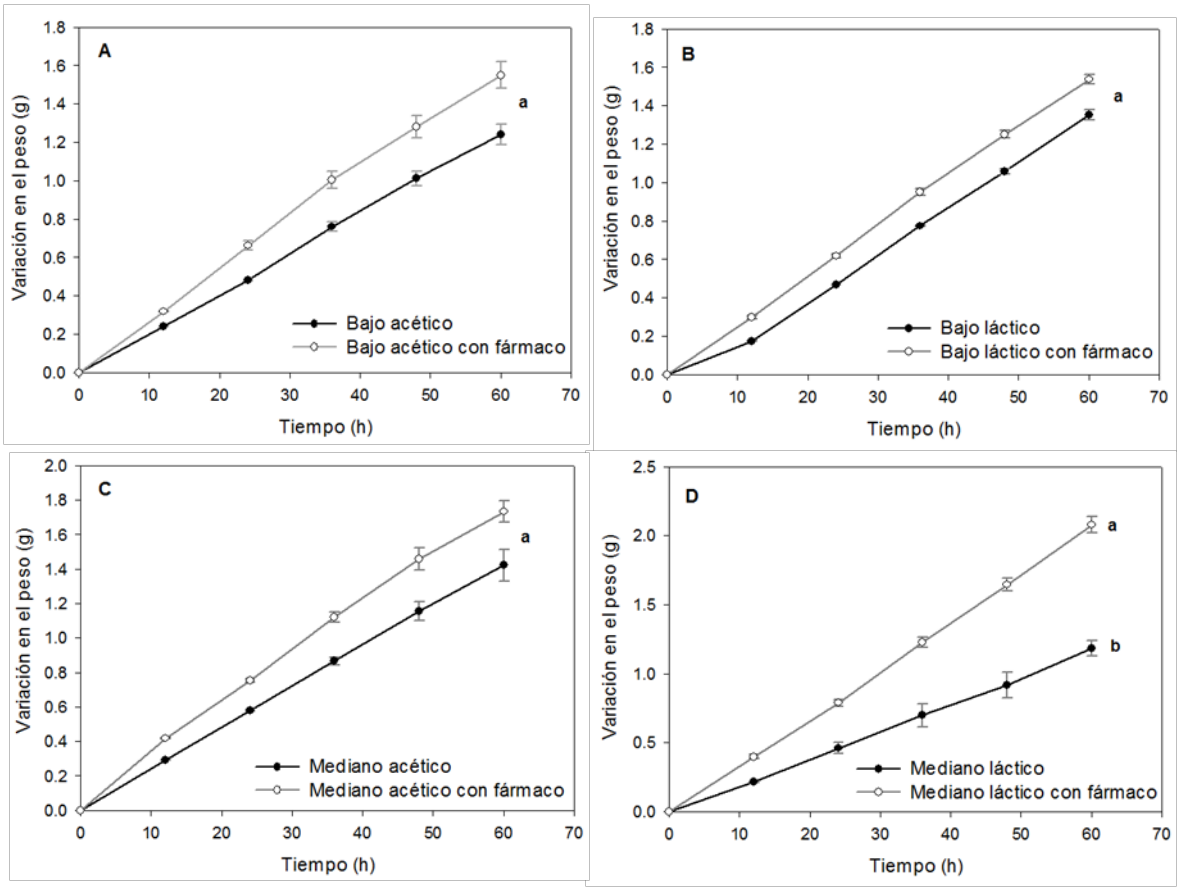


Figura 16. Variación en el peso en función del tiempo de las diferentes películas. Cada valor representa la media de tres réplicas. A y C son tratamientos de polímeros en ácido acético, Tukey *(p>0,05)*; B y D son tratamientos de polímeros en ácido láctico, Tukey *(p>0,05)* y Tukey *(p<0,05),* respectivamente. Letras minúsculas diferentes indican que hay diferencias estadísticamente significativas (*p<0.05*) de acuerdo al test de Tukey HSD. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

No obstante, la pérdida por evaporación de agua depende principalmente de la profundidad de la herida, mas no de su etiología; la piel intacta presenta una tasa de transmisión del vapor de agua de 8.5 g/m^{2}h (Wu *et al.,* 1996). Como se observa en la tabla 8 la película que mayor permeabilidad presentó, fue aquella de mediano peso molecular en ácido láctico con fármaco, con una transmisión del vapor de agua de 7.26 g/m^{2}h, la cual es cercana al valor mencionado sobre piel intacta, de manera que esta aproximación refuerza la selección de este sistema para tratar el tipo de úlcera característica de leihsmanianis cutánea.

3.3.2 Índice de hinchamiento

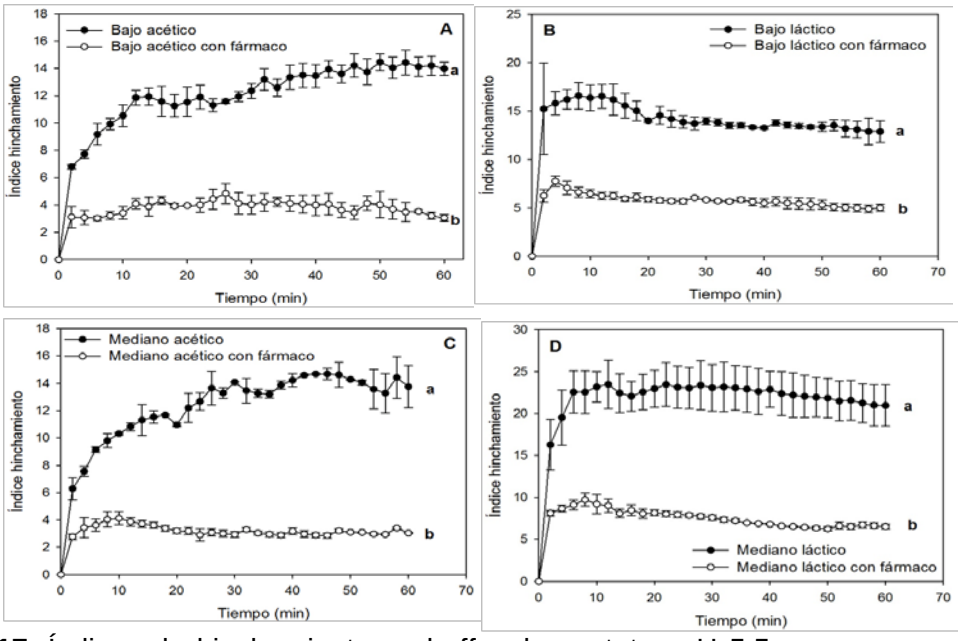


Figura 17. Índices de hinchamiento en buffer de acetatos pH 5.5. Cada valor representa la media de tres réplicas. A y C son tratamientos de polímeros en ácido acético, Tukey *(p<0,05)*; B y D son tratamientos de polímeros en ácido láctico, Tukey *(p<0,05)* Letras diferentes indican que hay diferencias estadísticamente significativas (*p<0.05*) de acuerdo al test de Tukey HSD. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

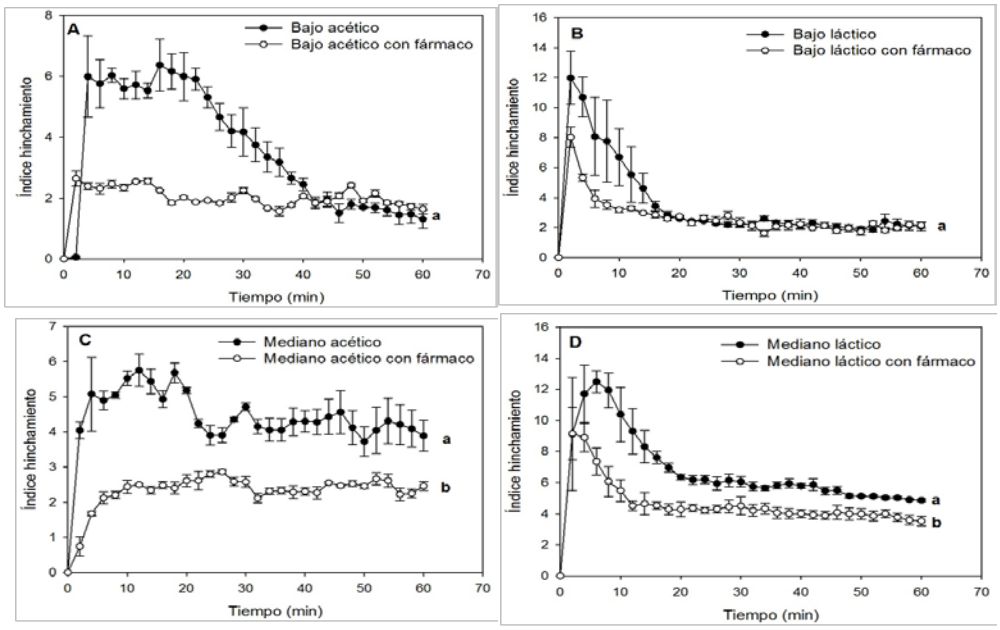


Figura 18. Índices de hinchamiento en buffer de fosfatos pH 7.4. Cada valor representa la media de tres réplicas. A y B son tratamientos de polímeros de bajo peso molecular, en ácido acético y ácido láctico, respectivamente, Tukey *(p>0,05)*; C y D son tratamientos de polímeros de mediano peso molecular, en ácido acético y ácido láctico, respectivamente, Tukey *(p<0,05).* Letras minúsculas diferentes indican que hay diferencias estadísticamente significativas (*p<0.05*) de acuerdo al test de Tukey HSD. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Durante la realización del ensayo en el buffer de acetatos pH 5.5, las películas incrementaron sus dimensiones originales desde 2 cm x 2 cm, hasta de 2.5 cm x 2.5 cm, e inclusive 5 cm x 5 cm, este último para el caso de la película control de mediano peso molecular en ácido láctico.

De los controles de las películas evaluadas en el buffer de fosfatos pH 7.4, hubo un incremento en las dimensiones desde 2.5 cm x 2.5 cm a 3.0 cm x 3.0 cm. Por otro lado, en las películas que contenían fármaco, las dimensiones permanecieron constantes.

En el buffer de fosfatos pH 7.4, mediante el test de Tukey ($p<0.05$) se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos realizados en las películas de mediano peso molecular (Figuras 18 C y D). Únicamente, en las preparaciones con películas de bajo peso molecular (Figuras 18 A y B), no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$).

En todos los casos, tanto en el buffer de acetatos (Figura 17) como en el buffer de fosfatos (Figura 18) las películas sin fármaco demostraron una mayor capacidad de hinchamiento con respecto a aquellas en las cuales el antimoniato de meglumina fue adicionado, esto podría ser porque como lo explicaba Cartaya et al., (2008) el quitosán se encontraría altamente desprotonado en este tipo de medios, de tal manera que probablemente el fármaco se acomodaría en los espacios intramoleculares del polímero disminuyendo el paso del medio de ensayo a través de sí mismo, y por lo tanto llevando a índices de hinchamiento más bajos.

Vale la pena destacar que un hinchamiento excesivo se traduce en una rápida destrucción de la película, mientras que a través de un hinchamiento controlado se predice un perfil de liberación del fármaco gradual, manteniendo por más tiempo la forma inicial de la película y proporcionando una liberación sostenida en el tiempo. El dispositivo de entrega del activo debe ser estable al ingresar al ambiente biológico y no cambiar su tamaño por efecto del hinchamiento, llevando a un tipo de liberación controlada en la cual la difusión del activo se logre a través de las macromoléculas del polímero. Sumado a esto, el PVP contribuiría en la difusión de las cadenas poliméricas, mejorando las características de manipulación y liberación de activos desde la película (Aldana *et al.,* 2008; Escobar *et al.,* 2002; Kharenko *et al.,* 2008).

Considerando que al incrementar el pH por encima de 6.0 las aminas del quitosán se desprotonan y, el polímero pierde su carga y se vuelve insoluble, esto explicaría su comportamiento en los medios evaluados, por lo tanto, es más fácil que se hinche en el buffer de acetatos puesto que la película experimentará un mayor cambio conformacional al relajar sus cadenas, favoreciendo así el paso del medio a través de ésta.

En un medio cuyo pH sea más ácido (pH 5.5), puede ocurrir disociación de enlaces iónicos, aumentando la concentración de grupos NH_3^+ generando un mayor grado de hinchamiento por la fuerzas de repulsión de las cargas positivas del grupo amino protonado. Caso contrario ocurre en el buffer de fosfatos, dado que la desprotonación del grupo NH_3^+ induce a la disminución del enlace iónico y aumenta la ionización del grupo aniónico del fosfato (Becerra-Bracamontes *et al.,* 2009) de este modo, se observan hinchamientos más bajos puesto que la película lograría mantener su red polimérica inalterada, al tratarse de un diseño para aplicación tópica esto sería conveniente por cuanto la película no se desintegrará fácilmente y adicionalmente, podrá transportar el fármaco al ser aplicado sobre la úlcera a tratar, ya que se pondrá en contacto con una superficie que por su condición húmeda facilitará la cedencia del mismo.

3.4 Validación de la metodología analítica

Partiendo del estudio desarrollado por Rojas et al., (2008) la determinación de antimoniato de meglumina mediante un método analítico por espectrofotometría visible, al ser una técnica rápida y sencilla, con poco requerimiento de solventes (Swartz y Krull, 2008), demostró ser adecuada para el reconocimiento del fármaco en estudio.

3.4.1 Linealidad

Las curvas de calibración presentaron una respuesta de absorbancia directamente proporcional a la concentración del antimoniato de meglumina en la muestra, según se observa en la figura 19, con una variación constante que refleja la homocedasticidad en la determinación.

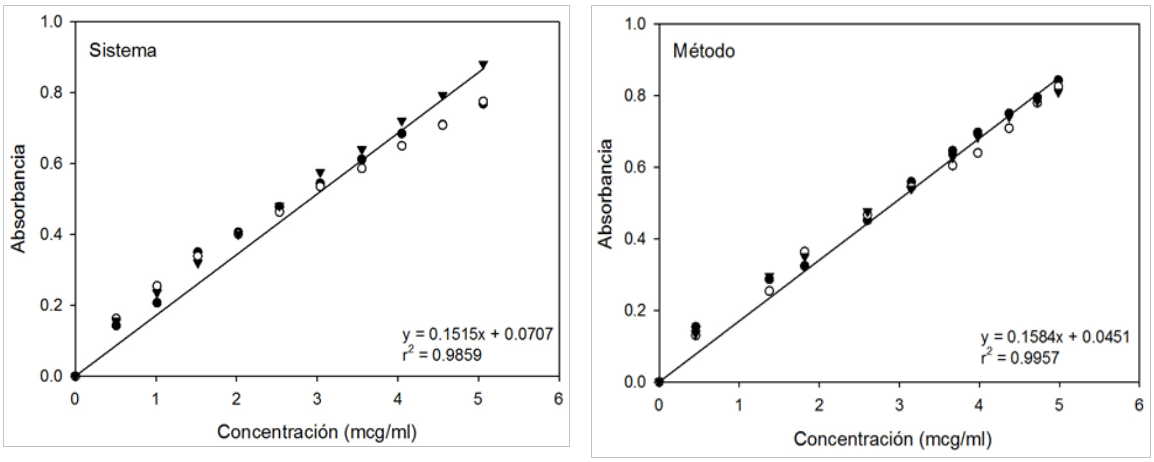


Figura 19. Linealidad de sistema y método.
Los símbolos corresponden a los datos de tres determinaciones

Tabla 9. Resumen de la evaluación de las rectas obtenidas en el sistema y el método

	Hipótesis nula	Estimativo	t_{cal} sistema	t_{cal} método	t_{tab}	Criterios	Conclusión estadística
Regresión	No hay regresión	$t_r = \frac{r*\sqrt{N-2}}{\sqrt{1-r^2}}$	t_r =42.0687268	t_r =43.0402732	2.306	Si t_{cal}> t_{tab} se rechaza la hipótesis	Se rechaza la hipótesis
Intercepto	a=0	$t_a = \frac{a}{S_a}$	t_a =2.125314	t_a =0.47005726	2.306	Si t_{cal}< t_{tab} no se rechaza la hipótesis	No se rechaza la hipótesis
Pendiente	b=0	$t_b = \frac{b}{S_b}$	t_b =9.16076076	t_b =5.66234481	2.306		Se rechaza la hipótesis

Mediante los resultados obtenidos por la evaluación de la recta (tabla 9) se comprobó estadísticamente que las gráficas halladas tanto para el sistema, así como para el método, tienen linealidad en la relación existente entre la concentración y la absorbancia. El intercepto de la gráfica se puede considerar cero y así mismo, ésta posee pendiente.

Como se puede observar la representación grafica del método es muy similar a la del sistema, manteniendo la linealidad, de tal manera que no hay efecto matriz significativo y por ende se obtendrían resultados confiables y comparables con los del sistema. De acuerdo con lo anterior, la metodología analítica utilizada proporciona una curva de calibración adecuada para la determinación de antimoniato de meglumina por espectrofotometría visible en las concentraciones experimentales aplicadas.

3.4.2 Precisión

Tabla 10. Estadísticos de evaluación de la repetibilidad del sistema

Sistema			**Método**		
Concentración (mcg/ml)	Desviación estándar	Coeficiente de variación CV (%)	Concentración (mcg/ml)	Desviación estándar	Coeficiente de variación CV (%)
2.024	0.0025	0.6406	1.375	0.0180	6.4714
3.542	0.0218	3.5585	3.149	0.0080	1.4674
4.554	0.0394	5.3457	3.980	0.0245	3.6403

Los coeficientes de variación hallados en la tabla 10 no exceden en ningún caso el 15% (Heredia 2001), de tal manera que hay concordancia entre los diferentes resultados obtenidos y por lo tanto se podría inferir que el método es preciso.

3.4.3 Exactitud

Se obtuvo un porcentaje de recuperación estimado en un 98%, lo cual es válido considerando que el criterio de aceptación acoge un rango entre 98 – 102%.

3.4.4 Especificidad

Teniendo en cuenta las consideraciones mencionadas por Rojas *et al,*. (2008) un barrido de muestras de trióxido de antimonio en diferentes concentraciones, fue evaluado en el rango de 252 nm – 420 nm encontrando que no se presentaron interferencias en la longitud de onda estimada para las determinaciones, 352 nm, y por lo tanto demostrando la especificidad del método de estudio.

3.5 Ensayos de funcionalidad

3.5.1 Estudio del comportamiento mucoadhesivo de las películas

La mucoadhesión reviste de importancia en esta investigación, por cuanto brinda información de la fuerza requerida para separar los polímeros de la capa mucosa sobre la cual serán aplicados, simulando la situación *in vivo* (Suknuntha *et al.,* 2011). La mucosa epitelial contiene una capa delgada, continua y adherente de una secreción viscosa conocida como mucus, el cual actúa como una capa protectora de los tejidos, se compone de 1 – 5% de glicoproteínas de alto peso molecular llamadas mucinas, en conjunto con un 95 -99% de agua y otros componentes en cantidades más pequeñas, como sales inorgánicas, proteínas, enzimas, líquidos y ácidos nucléicos (Bonferoni *et al.,* 2009).

Tabla 11. Parámetros para la determinación del trabajo de adhesión

Película	Fuerza máxima (N)	Distancia máxima (mm)	Trabajo de adhesión (N.mm)
Bajo peso molecular en ácido acético	0.1598 ± 0.0545	3.4717 ± 0.9165	0.5548
Bajo peso molecular en ácido acético con fármaco	0.4836 ± 0.1759	3.1346 ± 0.8443	1.5159
Mediano peso molecular en ácido acético	0.2381 ± 0.0810	3.4992 ± 0.9453	0.8331
Mediano peso molecular en ácido acético	0.3502 ± 0.1196	2.8177 ± 0.7288	0.9868
Bajo peso molecular en ácido láctico	0.0784 ± 0.0261	7.5923 ± 2.1434	0.5952
Bajo peso molecular en ácido láctico con fármaco	0.1965 ± 0.0572	7.0667 ± 2.0256	1.3886
Mediano peso molecular en ácido láctico	0.0472 ± 0.0149	7.4569 ± 2.1006	0.3519
Mediano peso molecular en ácido láctico con fármaco	0.2609 ± 0.0818	7.5900 ± 2.1717	1.9802

Todas las preparaciones contienen PVP; cada valor representa la media de diez réplicas; el símbolo ± indica la desviación estándar

A partir de los datos obtenidos en la tabla 11 y soportados por la figura 20, de los cuales se infiere que la película de quitosán de mediano peso molecular con fármaco, presentó el mayor trabajo de adhesión, lo cual se traduce en que su fijación a la superficie lesionada será más firme puesto que no se retiraría con facilidad, manteniendo la liberación del fármaco durante más tiempo. Este resultado se explica en función del peso molecular del polímero, porque entre mayor sea la masa molecular del quitosán, éste tendrá múltiples sitios para la fijación con la mucina mejorando las propiedades de mucoadhesión (Bonferoni *et al.,* 2009).

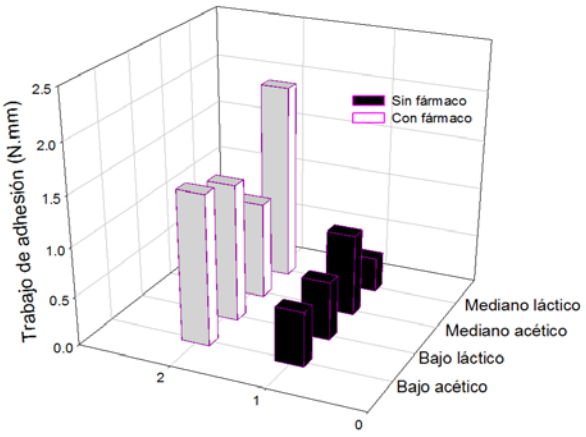


Figura 20. Trabajo de adhesión de las películas estudiadas

El incremento en las cadenas poliméricas permite un mayor entrecruzamiento con las cadenas de la mucina dando como resultado un aumento en la fuerza de adhesión (Llabot *et al.,* 2006). Sin embargo, esta consideración no siempre sigue una relación directa, como se observa en la tabla los polímeros de bajo peso molecular con fármaco presentan también altos trabajos de adhesión, lo cual puede atribuirse a que cadenas más cortas tienen la posibilidad de difundirse más fácilmente dentro de la mucina llevando a una mejor interpenetración (Bonferoni *et al.,* 2009). La masa molecular óptima para hablar de una mejor mucoadhesión, está ligada con el grado de flexibilidad y la conformación de las cadenas poliméricas, de tal manera que la elección del polímero, como es usual deberá considerar la intención de su aplicación.

Gracias a la naturaleza catiónica del quitosán, este tiene la habilidad de interactuar fuertemente con las cargas eléctricas aniónicas de las glicoproteínas presentes en el mucus, las interacciones electrostáticas entre las cargas positivas del polímero y las cargas aniónicas de los ácidos siálicos de la mucina dan como resultado una fuerte mucoadhesión, adicional a esto, el efecto se potencializa con la incorporación del PVP como agente adhesivo (Bonferoni *et al.,* 2009; Labarre *et al.,* 2011). En estudios previos se demostró que el comportamiento mucoadhesivo de mezclas de quitosán/PVP exhibía la propiedad de mucoadhesión con mejores resultados que al evaluarlos por separado. (Suknuntha *et al.,* 2011).

El modelo hámster - *L. panamensis* ha sido usado para evaluar la respuesta al tratamiento con antimoniales en diferentes esquemas terapéuticos. En este modelo se obtienen lesiones crónicas similares a las observadas en humanos que responden al tratamiento con antimoniales (Hernán *et al.,* 2004).

Dentro del alcance tecnológico propuesto en el estudio llevado a cabo, las películas evaluadas se aplicaron sobre úlceras de leishmaniasis cutánea en hámsters dorados que presentaban la lesión tras haber sido infectados con fines experimentales, por miembros del grupo de investigación en Inmunotoxicología. La película de quitosán de mediano peso molecular en ácido láctico con antimoniato de meglumina, fue aquella que presentó mejor adherencia sobre la úlcera de leishmaniasis cutánea en el hámster dorado, tal como se muestra en la figura 21.

Dada la conformación de la piel y las características de elasticidad de la película, ésta última tiende a formar ligeros pliegues al acomodarse sobre la piel intacta.

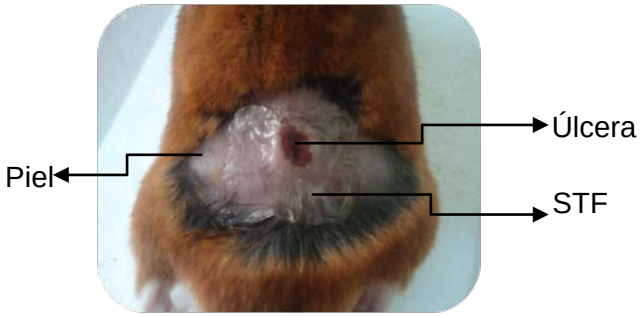


Figura 21. Adherencia del sistema terapéutico farmacéutico (STF de la película de quitosán de mediano peso molecular con fármaco sobre úlcera de leishmaniasis cutánea en modelo animal de hámster dorado.

El diseño inicial de la película obtenida, se ajusta a las características funcionales esperadas para aplicación dirigida directamente sobre la úlcera cutánea. Parte del perfeccionamiento de la tecnología aplicada, consiste en lograr avances posteriores en los cuales se consiga la adhesión de la película sobre la piel alrededor de la úlcera.

Este acercamiento de la funcionalidad adherente de la película sobre el modelo animal, es una importante característica que hace apto el diseño al ser aplicado sobre la lesión ulcerada en mención.

3.5.2 Liberación *in vitro* del fármaco

Las mezclas entre quitosán y PVP han sido utilizadas como sistemas de liberación de fármacos con baja solubilidad en agua, no obstante, el antimoniato de meglumina es soluble en agua (>300 mg/ml), de tal manera que mejoraría aún más su biodisponibilidad al ser incorporado en este tipo de mezclas polímero natural – polímero sintético (Frézard *et al.,* 2009; Sionkowska, 2011).

De acuerdo con los resultados obtenidos en los diferentes ensayos llevados a cabo durante el presente estudio, considerando tanto las propiedades mecánicas, así como de hinchamiento y mucoadhesión, se optó por evaluar el perfil de liberación del fármaco a partir de la película de quitosán de mediano peso molecular en ácido láctico. Partiendo de los resultados experimentales preliminares realizados en el Grupo de Inmunotoxicología del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional, en los cuales se emplea una dosis de 8 mg/200 µl para tratamiento intralesional de úlceras de leishmaniasis cutánea, se optó por incorporar una cantidad de 16 mg de antimoniato de meglumina en la película de 2 cm x 2 cm.

Las condiciones de temperatura, velocidad de agitación y pH empleadas en esta prueba, se seleccionaron de manera que fuera posible simular las características para evaluación sobre piel. El antimoniato de meglumina alcanzó un máximo del 60% de liberación desde las películas de quitosán de mediano peso molecular en ácido láctico, a las 24 horas del estudio, tal como se observa en la figura 22, probablemente no se logró un mayor grado de liberación dados los entrecruzamientos que pueden existir a nivel polímero – fármaco

(Aguero Luztonó *et al.,* 2011). Sin embargo, el aumento en la carga inicial de fármaco en la película favoreció el alcance de la dosis efectiva reportada a nivel intralesional.

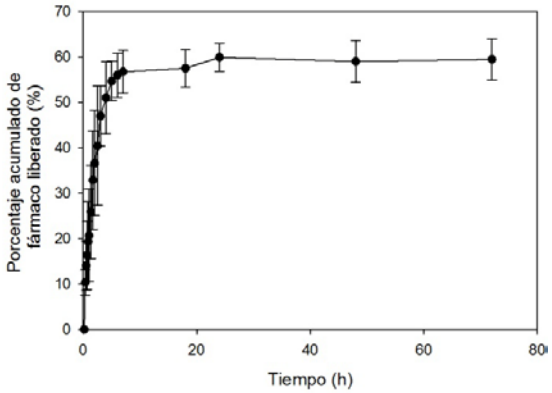


Figura 22. Perfil de liberación del antimoniato de meglumina desde la película de quitosán de mediano peso molecular en ácido láctico. Cada valor representa la media de tres réplicas. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

La incorporación de fármacos en polímeros biocompatibles ha mostrado ventajas frente a otros sistemas convencionales de liberación, dada su fácil preparación, vida útil más amplia, cesión prolongada y alta estabilidad en fluidos biológicos (Langer, 1998; Piñero *et al.,* 2006). Al evaluar la cinética de liberación del fármaco, esta se acopla dentro de un proceso de liberación sostenida de orden cero al presentar una variación en el tiempo, según se muestra en la figura 23.

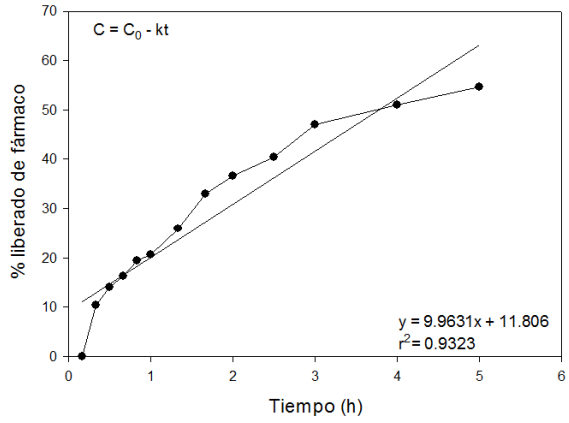


Figura 23. Cinética de liberación del fármaco desde la película de mediano peso molecular en ácido láctico.

El mecanismo de liberación sugerido para el diseño desarrollado, se ajusta a un modelo en el cual el fármaco ingresa a través de la piel mediante procesos de difusión y transporte activo. Vale la pena destacar que en los sistemas controlados por difusión, el dispositivo de entrega del fármaco es fundamentalmente estable en el ambiente biológico y no cambia su tamaño a través del hinchamiento (Escobar *et al.,* 2002). Tales consideraciones son consistentes con los resultados obtenidos en este estudio para dicha propiedad de transporte.

La liberación del fármaco será un proceso gradual en el cual éste se irá separando de la red conformacional del polímero, ayudado por el proceso de biodegradación que experimenta la película de quitosán, el cual es llevado a cabo a partir de reacciones enzimáticas.

El antimoniato se considera como un profármaco, puesto que es incorporado en la película polimérica en su forma pentavalente Sb^{V}, la cual es transformada mediante una reducción *in vivo* a su forma trivalente Sb^{III}, que es más eficaz, al entrar en contacto con el sistema biológico (Eric *et al.,* 2007; Santander, 2010).

En un estudio farmacocinético se demostró que tras la administración intramuscular del antimonio pentavalente en adultos voluntarios, el metabolismo del fármaco disminuyó su concentración 2 horas después de la administración, con una conversión sistémica a antimonio trivalente de un 23.3% que se mantuvo durante 12 horas (Vásquez *et al.,* 2006) esto sugiere una aproximación hipotética frente al posible comportamiento que se esperaría con una acción localizada, en la que posiblemente el cambio a la forma trivalente se daría en un porcentaje más elevado y en un tiempo menor, llevando a resultados promisorios en terapia leishmanicida.

3.6 Determinación morfológica por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Teniendo en cuenta el criterio de selección acogido para el ensayo de liberación, esta determinación se realizó únicamente sobre las películas de mediano peso molecular en ácido láctico.

Las primeras cuatro micrografías de la figura 24, corresponden a una observación hecha en corte transversal de las películas control y muestra, en dos aumentos diferentes.

La película presenta una morfología suave y uniforme tanto en el control como en la película con el antimoniato de meglumina.

En la observación de las películas vistas desde la superficie de la figura 25, para todas las muestras se observa una distribución suave y sin fluctuaciones, lo cual sugiere que no se generan incompatibilidades (Yeh *et al.,* 2006). Por otro lado, la estructura no porosa de la mezcla quitosán/PVP podría atribuirse a su interacción extremadamente fuerte y su miscibilidad a nivel molecular (Zeng *et al.,* 2011), por tanto en la micrografía la distribución homogénea hace alusión a la ausencia de poros. Tanto la observación del corte transversal, así como aquella superficial indican que no hubo separación de fases.

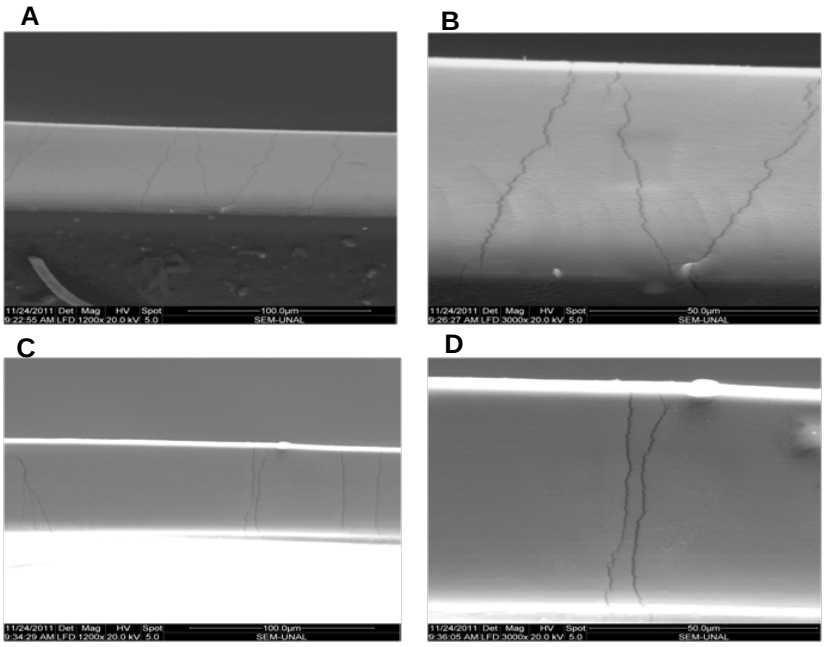


Figura 24. Micrografías en corte transversal de las películas de quitosán de mediano peso molecular en ácido láctico. A y B corresponden a las micrografías de las películas control en menor (1200x) y mayor (3000x) aumento, respectivamente; C y D son las micrografías de las películas con antimoniato de meglumina, igualmente en menor y mayor aumento de izquierda a derecha.

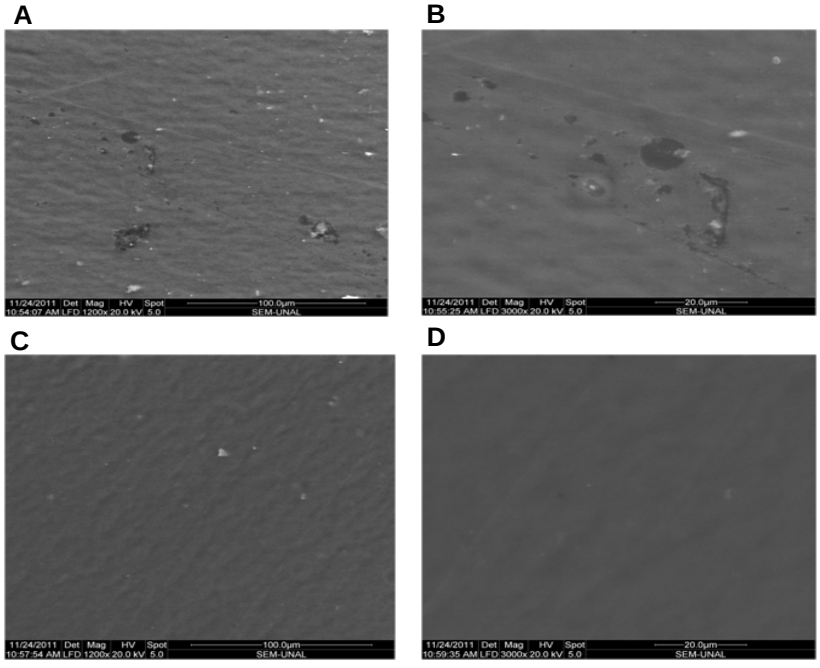


Figura 25. Micrografías con vista superficial de las películas de quitosán de mediano peso molecular en ácido láctico. A y B corresponden a las micrografías de las películas control en menor (1200x) y mayor (3000x) aumento, respectivamente; C y D son las micrografías de las películas con antimoniato de meglumina, igualmente en menor y mayor aumento de izquierda a derecha.

Conclusiones

El alcance del presente estudio nos convierte en pioneros en este desarrollo, al incorporar un fármaco leishmanicida dentro de un sistema de tipo polimérico biodegradable, generando una propuesta alternativa terapéutica frente a las formas convencionales de tratamiento de úlceras de leishmaniasis cutánea, la cuales son vías de administración agresivas y por ende generan rechazo por parte del paciente. Cada ensayo evaluado individualmente trajo consigo una respuesta particular a nivel de las propiedades físicas, mecánicas, de transporte y funcionales, para analizar el comportamiento que habría de potencializar en uno solo la elección de la película con las características más cercanas a la idealidad para el objetivo propuesto. Adicionalmente, la inclusión del PVP en las películas favoreció el resultado de los ensayos aplicados en éstas, al destacar sus propiedades adhesivas y su carácter hidrofílico. El prototipo de película polimérica con mejores características para el transporte del fármaco leishmanicida, fue aquel de mediano peso molecular preparado en ácido láctico, dada su elasticidad a nivel mecánico, su posibilidad del paso de agua del medio ambiente a través de ella sin ser excesivo ni insuficiente, su nivel de hinchamiento en el cual no se destruye pero si facilita la liberación gradual del fármaco, como se demostró en los ensayos de liberación, así como también debido a su capacidad de adhesión sobre la lesión ulcerada, y su fácil manipulación. De este modo al reunir todas las características evaluadas en un único diseño de película polimérica de quitosán para transporte de antimoniato de meglumina, se abren las oportunidades para el paciente de leishmaniasis cutánea, ya que este podría evitar las implicaciones de la terapia sistémica, adaptándose al uso de la película como sistema terapéutico farmacéutico alternativo frente al tratamiento intralesional, logrando el cumplimiento completo del esquema terapéutico.

Recomendaciones

Incorporar la polivinilpirrolidona (PVP) en un rango de concentraciones más amplio, que permita evaluar su incidencia en las películas por su carácter hidrofílico.

Considerar otros métodos de liberación *in vitro* diferentes a las celdas de Franz, para evaluación de perfiles de liberación.

Emplear técnicas como la cromatografía y la espectroscopia infrarroja, para tener un mayor acercamiento de las interacciones dadas con el polímero al incorporar el fármaco.

En posteriores ensayos evaluar el transporte de gases (oxígeno y dióxido de cabono) para dar soporte a los ensayos de permeabilidad.

Bibliografía

Aggarwal, G. y S. Dhawan. 2009. Development, fabrication and evaluation of transdermal drug delivery system: A review. Latest Rev.7.

Aguero Luztonó, L., D. Zaldivar Silva y J.L. Escobar Ivirico. 2011. Liberación de cefalexina a partir de hidrogeles de poli (acrilamida-co-ácido metacrílico).

Aldana, A.A., M. Martinelli y M. Strumia. 2008. Desarrollo de un sistema mucoadhesivo empleando quitosán como matriz. Su posible aplicación en lesiones de la mucosa bucal. Segundo encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencia y Tecnología de Materiales. Universidad Nacional de Córdoba

Antonov, SF, EV Kryzhanovskaya, Y.I. Filippov, SM Shinkarev y MA Frolova. 2008. Study of wound-healing properties of chitosan. Russian Agricultural Sciences 34.426-27.

Araya, A. y L. Meneses. 2011. Influencia de algunos ácidos orgánicos sobre las propiedades físicoquímicas de películas de quitosano obtenidas a partir de desechos de cangrejo. Revista Tecnológica-ESPOL 23.

Arias, J., F. Beltrán, P. Desjeux y B. Walton. 1996. Epidemiología y control de la leishmaniasis en las Américas, por país o territorio. OPS cuaderno técnico 44.

Ariza, A.M. 2004. Sistemas transdérmicos: Influencia del tipo de membrana en la transferencia del ácido salicílico a través de la piel. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.

Askeland, D.R. y P.P. Phulé. 2004. Ciencia e ingeniería de los materiales: Cengage Learning Latin America.

ASTM. 2005. Standard test methods for water vapor transmission of materials Annual book of ASTM standards. Designation E 96/E 96M - 05.1-11.

Becerra-Bracamontes, F., JC Sánchez-Díaz, J. Arellano-Ceja, A. González-Álvarez y A. Martínez-Ruvalcaba. 2009. Efecto del pH y la concentración del fosfato dibásico de sodio en las propiedades de hinchamiento de hidrogeles de quitosana. Revista mexicana de ingeniería química 8.121-26.

Boateng, J.S., K.H. Matthews, H.N.E. Stevens y G.M. Eccleston. 2008. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. Journal of Pharmaceutical Sciences 97.2892 - 923.

Bonferoni, M.C., G. Sandri, S. Rossi, F. Ferrari y C. Caramella. 2009. Chitosan and its salts for mucosal and transmucosal delivery.

Brindis, E.A. 2002. Propiedades básicas de los polímeros.

Cárcamo, C.A. 2005. Preparación de films de complejo polielectrolito quitosano-alginato y comparación de sus propiedades mecánicas y biológicas con films de quitosano Santiago de Chile: Universidad de Chile.

Cárdenas, G., P. Anaya, C. Von Plessing, C. Rojas y J. Sepúlveda. 2008. Chitosan composite films. Biomedical applications. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 19.2397-405.

Crompton, T.R. 1993. Practical polymer analysis: Plenum Press New York.

Czichos, H., T. Saito y L. Smith. 2006. Springer handbook of materials measurement methods: Springer Verlag.

Dodane, V. y V.D. Vilivalam. 1998. Pharmaceutical applications of chitosan. Pharmaceutical Science y Technology Today 1.246-53.

Dutton, M. 2011. Orthopaedics for the Physical Therapist Assistant: Jones y Bartlett Learning.

Eric, S., L.C. Cunha, A.L.S. Gonçalves, A.R. Souza y A.C.V. Negrón. 2007. Importancia de los compuestos inorgánicos en el tratamiento de la leishmaniasis. Latin American Journal of Pharmacy 26.454-61.

Escobar, JL, DM García, D. Zaldivar y I. Katime. 2002. Hidrogeles. Principales características en el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos. Revista Iberoamericana 3.3.

Fang, L. y SH Goh. 2000. Miscible chitosan/tertiary amide polymer blends. Journal of applied polymer science 76.1785-90.

Fernández, I.J. *Polímeros en solución y aplicación de los polímeros en la industria petrolera*.

Frézard, F., C. Demicheli y R.R. Ribeiro. 2009. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. Molecules 14.2317-36.

Fuentes, L.B. y A. Pastor. 2009. Preparación, caracterización y evaluación de películas de quitosano proveniente de calamar gigante" Dosidicus gigas" para uso médico. Rev. Soc. Quím. Perú 75.3-11.

Gutiérrez, M.A. 2000. Biomecánica: la física y la fisiología: Instituto de ciencia de materiales, Consejo superior de investigaciones científicas.

Gutiérrez, P. 2010. Informe final del evento Leishmaniasis, año 2010. Bogotá, D.C.: Instituto Nacional de Salud.

Henao, H.H., Y. Osorio, N.G. Saravia, A. Gómez y B. Travi. 2004. Eficacia y toxicidad de los antimoniales pentavalentes (Glucantime® y Pentostam®) en un modelo animal de leishmaniasis cutánea americana: aplicación de la luminometría. Biomédica 24.393-402.

Heredia, P. 2001. Guía para la validación de métodos bioanalíticos aplicación a la toxicología forense. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.

Hernán, H., Y. Osorio, N. Gore, A. Gómez y B. Travi. 2004. Eficacia y toxicidad de los antimoniales pentavalentes (Glucantime® y Pentostam®) en un modelo animal de leishmaniasis cutánea americana: aplicación de la luminometría. Biomédica.393-402.

Hernandez, F.R. 2009. Aplicacion de peliculas comestibles a base de quitosano y mucilago de nopal en fresa (Fragaria ananassa) almacenada en refrigeracion.

Huang, S. y X. Fu. 2010. Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration. Journal of Controlled Release 142.149-59.

Jayakumar, R., M. Prabaharan, PT Kumar, SV Nair y H. Tamura. 2011. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. Biotechnology advances.

Jayakumar, R., M. Prabaharan, SV Nair y H. Tamura. 2010. Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications. Biotechnology advances 28.142-50.

Kalut, S. 2008. Enhancement of degree of deacetylation of chitin in chitosan production. Malaysia: Universiti Malaysia Pahang.

Kavitha, K., TS Keerthi y T.T. Mani. 2011. Chitosan polymer used as carrier in various pharmaceutical formulations: Brief review. 2.249-58.

Khan, T.A., K.K. Peh y H.S. Ch'ng. 2000. Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. J. Pharm. Pharmaceut. Sci 3.303-11.

Khanafari, A., R. Marandi y S. Sanatei. 2008. Recovery of chitin and chitosan from shrimp waste by chemical and microbial methods. Iranian Journal of Environmental Health Science y Engineering 5.

Kharenko, EA, NI Larionova y NB Demina. 2008. Mucoadhesive drug delivery systems: quantitative assessment of interaction between synthetic and natural polymer films and mucosa. Pharmaceutical Chemistry Journal 42.392-99.

Khoushab, F. y M. Yamabhai. 2010. Chitin research revisited. Marine drugs 8.1988-2012.

Kil'deeva, NR, GA Vikhoreva, LS Gal'braikh, AV Mironov, GA Bonartseva, PA Perminov y AN Romashova. 2006. Preparation of biodegradable porous films for use as wound coverings. Applied Biochemistry and Microbiology 42.631-35.
Kumar, M.N.V.R., RAA Muzzarelli, C. Muzzarelli, H. Sashiwa y AJ Domb. 2004. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. Chemical Reviews 104.6017-84.
Kurita, K. 2006. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. Marine Biotechnology 8.203-26.
Labarre, D.J.P., G. Ponchel y C. Vauthier. 2011. Biomedical and Pharmaceutical Polymers: Pharmaceutical Press.
Langer, R. 1998. Drug delivery and targeting. Nature 392.5.
Lárez, C. 2006. Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. Avances en Química, Venezuela 1.15-21.
León, K. y J. Santiago. 2007. Propiedades antimicrobianas de películas de quitosano-alcohol polivinílico embebidas en extracto de sangre de grado. Rev. Soc. Quím. Perú 73.158-65.
Li, J. 2008. Characterization and performance improvement of chitosan films as affected by preparation method, synthetic polymers, and blend ratios.
Li, J., S. Zivanovic, PM Davidson y K. Kit. 2010. Characterization and comparison of chitosan/PVP and chitosan/PEO blend films. Carbohydrate Polymers 79.786-91.
Llabot, J.M., S.D. Palma y D.A. Allemandi. 2006. Tendencias tecnológicas en la administración de fármacos: sistemas bioadhesivos. Nuestra Farmacia 47.
López, M.L. 2008. Recuperación Termoquímica de Quitina de Camarón por Tecnología Limpia y su Caracterización Fisicoquímica. Saltillo, Coahuila, México: Universidad autónoma de Coahuila.
Marsano, E., S. Vicini, J. Skopińska, M. Wisniewski y A. Sionkowska. 2004. Chitosan and poly (vinyl pyrrolidone): compatibility and miscibility of blends. 218.251-60.
Mehregan, D.R., A.H. Mehregan y D.A. Mehregan. 1999. Histologic diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Clinics in dermatology 17.297-304.
Menon, G.K. 2002. New insights into skin structure: scratching the surface. Advanced drug delivery reviews 54.S3-S17.
Mezzana, P. 2008. Clinical efficacy of a new chitin nanofibrils-based gel in wound healing. Acta chirurgiae plasticae 50.81.
Minodier, P. y P. Parola. 2007. Cutaneous leishmaniasis treatment. Travel medicine and infectious disease 5.150-58.
Mitrus, M., A. Wojtowicz y L. Moscicki. 2010. Biodegradable polymers and their practical utility. Thermoplastic Starch.1-33.
Montero, J, M Paredes y M Rivera. 2010. Utilización de quitosana para la remoción de arsénico (As) del agua. Superficies y Vacío 23.136-39.
Mortimer, D. 2000. Moist wound dressings and pressure relieving surfaces.
Muzzarelli, R.A.A. 2009. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. Carbohydrate Polymers 76.167-82.
Park, SY, KS Marsh y JW Rhim. 2002. Characteristics of different molecular weight chitosan films affected by the type of organic solvents. Journal of Food Science 67.194-97.
Peñuela, M. y A. Sánchez. 2007. Una Mirada a la epidemiología y al control de la Leishmaniasis zoonótica en Colombia. Biosalud 6.99-111.
Pillai, CKS, W. Paul y C.P. Sharma. 2009. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. Progress in Polymer Science 34.641-78.
Pillai, O. y R. Panchagnula. 2001. Polymers in drug delivery. Current opinion in chemical biology 5.447-51.

Piñero, J., R.M. Temporal, A.J. Silva-Gonçalves, IA Jiménez, I.L. Bazzocchi, A. Oliva, A. Perera, L.L. Leon y B. Valladares. 2006. New administration model of *trans*-chalcone biodegradable polymers for the treatment of experimental leishmaniasis. Acta tropica 98.59-65.

Qurashi, MT, HS Blair y SJ Allen. 1992. Studies on modified chitosan membranes. II. Dialysis of low molecular weight metabolites. Journal of Applied Polymer Science 46.263-69.

Ravi Kumar, M.N.V. 2000. A review of chitin and chitosan applications. Reactive and functional polymers 46.1-27.

Reithinger, R., J.C. Dujardin, H. Louzir, C. Pirmez, B. Alexander y S. Brooker. 2007. Cutaneous leishmaniasis. The Lancet infectious diseases 7.581-96.

Rinaudo, M. 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. Progress in Polymer Science 31.603-32.

Roberts, G.A.F. 2008. Thirty years of progress in chitin and chitosan. Progress on Chemistry and Application of Chitin 13.8.

Rodríguez, AT, MA Ramírez, D. Rivero, E. Bosquez, LL Barrera y S. Bautista. 2009. Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos. Revista Chapingo. Serie horticultura.307-17.

Rodríguez, IC, A. Cerezo y II Salem. 2000. Sistemas de liberación bioadhesivos. Ars Pharmaceutica 41.115-28.

Rojas, J.H., N. Sierra, E. Arboleda, M. Bello y L. ABJPharma. 2008a. Desarrollo y validación de un método de determinación por espectrofotometría visible de antimoniato de meglumina en inyectables. Rev Col Cienc Quím Farm 36.50-61.

Rojas, M.G., B.M. Vallejo Díaz y J.E. Perilla. 2008b. Los biopolímeros como materiales para el desarrollo de productos en aplicaciones farmacéuticas y de uso biomédico. Ingeniería e Investigación 28.57-71.

Rowe, R.C., P.J. Sheskey, S.C. Owen, American Pharmacists Association y R2 Library. 2003. Handbook of pharmaceutical excipients: Pharmaceutical press London.

Ruiz, J. 2011. Descubren por qué el humano es vulnerable a la leishmaniasis (ed.) U. Periódico. Bogotá, D.C: Unidad de Medios de Comunicación - Unimedios.

Santander, S.C. 2010. Evaluación in vitro del efecto tóxico de una formulación de glucantime en nanoemulsión contra parásitos protozoarios del género leishmania. Sangolquí, Ecuador: Escuela politécnica del ejército.

Sezer, A.D., F. Hatipoglu, E. Cevher, Z. Oğurtan, A.L. Bas y J. Akbuğa. 2007. Chitosan film containing fucoidan as a wound dressing for dermal burn healing: preparation and in vitro/in vivo evaluation. AAPS PharmSciTech 8.94-101.

Shih, C.M., Y.T. Shieh y Y.K. Twu. 2009. Preparation and characterization of cellulose/chitosan blend films. Carbohydrate polymers 78.169-74.

Shilpa, K. y SS Poddar. Design of mucoadhesive vaginal metronidazole films.

Shilpa, K. y SS Poddar. 2010. Design of mucoadhesive vaginal metronidazole films. Acta Pharmaceutica Sciencia 52.181-89.

Siewert, M., J. Dressman, C.K. Brown, V.P. Shah, J.M. Aiache, N. Aoyagi, D. Bashaw, C. Brown, W. Brown y D. Burgess. 2003. FIP/AAPS guidelines to dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms. AAPS PharmSciTech 4.43-52.

Sionkowska, A. 2011. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review. Progress in polymer science 36.1254-76.

Soto, J. y P. Soto. 2006. Estado actual y futuro de la terapia anti-leishmaniásica en Colombia. Biomédica.194-206.

Suknuntha, K., V. Tantishaiyakul, N. Worakul y W. Taweepreda. 2011. Characterization of muco-and bioadhesive properties of chitosan, PVP, and chitosan/PVP blends and release of amoxicillin from alginate beads coated with chitosan/PVP. Drug Development and Industrial Pharmacy 37.408-18.

Swartz, M. y I. Krull. 2008. Developing and Validating Dissolution Procedures.

Thacharodi, D. y K.P. Rao. 1995. Development and *in vitro* evaluation of chitosan - based transdermal drug delivery systems for the controlled delivery of propranolol hydrochloride. Biomaterials 16.145-48.

Tortora, G.J. y B. Derrickson. 2008. Principles of anatomy and physiology: Wiley.

Trejo, V., N. Aragón y P. Miranda. 2001. Estimación de la permeabilidad al vapor de agua en películas a base de quitosán. Journal of the Mexican Chemical Society.1-5.

Vachon, D.J. 2005. Sulfonated styrene polymers for medical articles and barrier web constructs: Google Patents.

Vallejo, B. 2010. Estudio del fenómeno de adhesión a superficies biológicas de películas obtenidas a partir de biopolímeros, para aplicación en el área de la salud: Universidad Nacional de Colombia Tesis Doctoral.

Vásquez, L., J.V. Scorza Dagert, J.V. Scorza, N. Vicuña-Fernández, Y.P. de Peña, S. López, H. Bendezú, E. Rojas y B. Pérez. 2006. Pharmacokinetics of experimental pentavalent antimony after intramuscular administration in adult volunteers. Current Therapeutic Research 67.193-203.

Veiga, MD y R Ruiz. 2004. El Quitosano: usos farmacéuticos y biológicos. Rev. O.F.I.L. 14.33-42.

Velilla, T. 2002. Propiedades termodinámicas de macromoléculas en solución; caso de estudio: polivinilpirrolidona. Curso IQ761 Termodinámica avanzada.

Villarino, N.F. y M.F. Landoni. 2006. Administración transdérmica de fármacos: Una alternativa terapéutica. Analecta Veterinaria 26.28-37.

Wiles, JL, PJ Vergano, FH Barron, JM Bunn y RF Testin. 2000. Water vapor transmission rates and sorption behavior of chitosan films. Journal of food science 65.1175-79.

Wolff, K. y R.A. Johnson. 2009. Fitzpatrick's color atlas and synopsis of clinical dermatology: McGraw-Hill Medical.

Wu, P., EA Nelson, WH Reid, CV Ruckley y JDS Gaylor. 1996. Water vapour transmission rates in burns and chronic leg ulcers: influence of wound dressings and comparison with *in vitro* evaluation. Biomaterials 17.1373-77.

Yeh, J.T., C.L. Chen, KS Huang, YH Nien, JL Chen y PZ Huang. 2006. Synthesis, characterization, and application of PVP/chitosan blended polymers. Journal of Applied Polymer Science 101.885-91.

Yi, H., L.Q. Wu, W.E. Bentley, R. Ghodssi, G.W. Rubloff, J.N. Culver y G.F. Payne. 2005. Biofabrication with chitosan. Biomacromolecules 6.2881-94.

Zeng, M., H. Xiao, X. Zhang, X. Sun, C. Qi y B. Wang. 2011. A Novel Chitosan/Polyvinyl Pyrrolidone (CS/PVP) Three-Dimensional Composite and Its Mechanism of Strength Improvement. Journal of Macromolecular Science, Part B 50.1413-22.

Anexos

Anexo 1. Estadístico ensayo mecánico fuerza (N) vs distancia (mm) de la película de quitosán de bajo peso molecular en ácido acético

Sistema SAS
Procedimiento GLM
Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
REP	3	1 2 3
TRAT	2	1 2
DIST	2	0 1.662

Número de observaciones 12

Variable dependiente: TENS

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	7	1527.565586	218.223655	110.04	0.0002
Error	4	7.932456	1.983114		
Total correcto	11	1535.498042			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	TENS Media
0.994834	12.49469	1.408231	11.27063

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para TENS

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4
Error de cuadrado medio	1.983114
Valor crítico del rango estudentizado	3.92649
Diferencia significativa mínima	2.2574

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	11.7744	6	2
A			
A	10.7669	6	1

Tukey Agrupamiento	Media	N	DIST
A	22.5023	6	1.662
B	0.0390	6	0

Nivel de TRAT	Nivel de DIST	N	TENS Media	TENS Dev std
1	0	3	0.0206333	0.00273008
1	1.662	3	21.5131000	2.42967832
2	0	3	0.0573667	0.01334329
2	1.662	3	23.4914333	1.41831259

Anexo 2. Estadístico ensayo mecánico fuerza (N) vs distancia (mm) de la película de quitosán de bajo peso molecular en ácido láctico

Sistema SAS
Procedimiento GLM
Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
REP	3	1 2 3
TRAT	2	1 2
DIST	2	0 20

Número de observaciones 12

Variable dependiente: TENS

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	7	4.03823858	0.57689123	110.82	0.0002
Error	4	0.02082243	0.00520561		
Total correcto	11	4.05906101			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	TENS Media
0.994870	14.54953	0.072150	0.495892

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para TENS

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4
Error de cuadrado medio	0.005206
Valor crítico del rango estudentizado	3.92649
Diferencia significativa mínima	0.1157

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	0.74160	6	1
B	0.25018	6	2

Tukey Agrupamiento	Media	N	DIST
A	0.96500	6	20
B	0.02678	6	0

Nivel de TRAT	Nivel de DIST	N	TENS Media	TENS Dev std
1	0	3	0.04130000	0.02225826
1	20	3	1.44190000	0.12908327
2	0	3	0.01226667	0.00246847
2	20	3	0.48810000	0.09517190

Anexo 3. Estadístico ensayo mecánico fuerza (N) vs distancia (mm) de la película de quitosán de mediano peso molecular en ácido acético

Sistema SAS
Procedimiento GLM
Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
REP	3	1 2 3
TRAT	2	1 2
DIST	2	0 1.552

Número de observaciones 12

Variable dependiente: TENS

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	7	2724.510990	389.215856	37.26	0.0018
Error	4	41.784190	10.446047		
Total correcto	11	2766.295180			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	TENS Media
0.984895	21.84778	3.232035	14.79343

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para TENS

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4
Error de cuadrado medio	10.44605
Valor crítico del rango estudentizado	3.92649
Diferencia significativa mínima	5.1809

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	17.018	6	2
A			
A	12.569	6	1

Tukey Agrupamiento	Media	N	DIST
A	29.428	6	1.552
B	0.159	6	0

Nivel de TRAT	Nivel de DIST	N	TENS Media	TENS Dev std
1	0	3	0.0485333	0.01878546
1	1.552	3	25.0886000	4.17813519
2	0	3	0.2698333	0.10122378
2	1.552	3	33.7667333	4.91881829

Anexo 4. Estadístico ensayo mecánico fuerza (N) vs distancia (mm) de la película de quitosán de mediano peso molecular en ácido láctico

Sistema SAS

Procedimiento GLM

Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
REP	3	1 2 3
TRAT	2	1 2
DIST	2	0 20

Número de observaciones 12

Variable dependiente: TENS

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	7	5.39915089	0.77130727	285.40	<.0001
Error	4	0.01081032	0.00270258		
Total correcto	11	5.40996121			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	TENS Media
0.998002	8.863951	0.051986	0.586492

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para TENS

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4
Error de cuadrado medio	0.002703
Valor crítico del rango estudentizado	3.92649
Diferencia significativa mínima	0.0833

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	0.85427	6	1
B	0.31872	6	2

Tukey Agrupamiento	Media	N	DIST
A	1.14450	6	20
B	0.02848	6	0

Nivel de TRAT	Nivel de DIST	N	TENS Media	TENS Dev std
1	0	3	0.03993333	0.01855326
1	20	3	1.66860000	0.06902311
2	0	3	0.01703333	0.00720023
2	20	3	0.62040000	0.08452698

Anexo 5. Estadístico ensayo mecánico tensión (N/mm2) vs deformación de la película de quitosán de bajo peso molecular en ácido acético

Sistema SAS
Procedimiento GLM
Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
REP	3	1 2 3
TRAT	2	1 2
DIST	2	0 0.0237

Número de observaciones 12

Variable dependiente: TENS

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	7	6151.343316	878.763331	34.97	0.0020
Error	4	100.506554	25.126638		
Total correcto	11	6251.849869			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	TENS Media
0.983924	26.40090	5.012648	18.98666

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para TENS
NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4
Error de cuadrado medio	25.12664
Valor crítico del rango estudentizado	3.92649
Diferencia significativa mínima	8.0352

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	27.573	6	2
B	10.400	6	1

Tukey Agrupamiento	Media	N	DIST
A	37.898	6	0.0237
B	0.075	6	0

Nivel de TRAT	Nivel de DIST	N	TENS Media	TENS Dev std
1	0	3	0.0194000	0.00383536
1	0.0237	3	20.7814333	4.74330322
2	0	3	0.1305000	0.04305706
2	0.0237	3	55.0153000	8.86173744

Anexo 6. Estadístico ensayo mecánico tensión (N/mm2) vs deformación de la película de quitosán de bajo peso molecular en ácido láctico

Sistema SAS
Procedimiento GLM
Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
REP	3	1 2 3
TRAT	2	1 2
DIST	2	0 0.2857

Número de observaciones 12

Variable dependiente: TENS

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	7	2.09434436	0.29919205	83.76	0.0004
Error	4	0.01428836	0.00357209		
Total correcto	11	2.10863272			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	TENS Media
0.993224	15.42705	0.059767	0.387417

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para TENS
NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4
Error de cuadrado medio	0.003572
Valor crítico del rango estudentizado	3.92649
Diferencia significativa mínima	0.0958

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	0.53047	6	1
B	0.24437	6	2

Tukey Agrupamiento	Media	N	DIST
A	0.75427	6	0.2857
B	0.02057	6	0

Nivel de TRAT	Nivel de DIST	N	TENS Media	TENS Dev std
1	0	3	0.02920000	0.01483947
1	0.2857	3	1.03173333	0.08632626
2	0	3	0.01193333	0.00217332
2	0.2857	3	0.47680000	0.08932418

Anexo 7. Estadístico ensayo mecánico tensión (N/mm2) vs deformación de la película de quitosán de mediano peso molecular en ácido acético

Sistema SAS
Procedimiento GLM
Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
REP	3	1 2 3
TRAT	2	1 2
DIST	2	0 0.0222

Número de observaciones 12

Variable dependiente: TENS

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	7	6301.758288	900.251184	33.17	0.0022
Error	4	108.574513	27.143628		
Total correcto	11	6410.332801			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	TENS Media
0.983063	25.80170	5.209955	20.19229

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para TENS
NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4
Error de cuadrado medio	27.14363
Valor crítico del rango estudentizado	3.92649
Diferencia significativa mínima	8.3515

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	27.977	6	2
B	12.407	6	1

Tukey Agrupamiento	Media	N	DIST
A	40.139	6	0.0222
B	0.246	6	0

Nivel de TRAT	Nivel de DIST	N	TENS Media	TENS Dev std
1	0	3	0.0488667	0.0206730
1	0.0222	3	24.7654000	2.8950921
2	0	3	0.4429667	0.1507126
2	0.0222	3	55.5119333	10.0242694

Anexo 8. Estadístico ensayo mecánico fueza (N) vs distancia (mm) de la película de quitosán de mediano peso molecular en ácido láctico

Sistema SAS
Procedimiento GLM
Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
REP	3	1 2 3
TRAT	2	1 2
DIST	2	0 0.2857

Número de observaciones 12

Variable dependiente: TENS

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	7	4.84180561	0.69168652	383.11	<.0001
Error	4	0.00722180	0.00180545		
Total correcto	11	4.84902741			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	TENS Media
0.998511	7.741984	0.042491	0.548833

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para TENS

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4
Error de cuadrado medio	0.001805
Valor crítico del rango estudentizado	3.92649
Diferencia significativa mínima	0.0681

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	0.80865	6	1
B	0.28902	6	2

Tukey Agrupamiento	Media	N	DIST
A	1.07143	6	0.2857
B	0.02623	6	0

Nivel de TRAT	Nivel de DIST	N	TENS Media	TENS Dev std
1	0	3	0.03680000	0.00964365
1	0.2857	3	1.58050000	0.00149332
2	0	3	0.01566667	0.00752152
2	0.2857	3	0.56236667	0.08897058

Anexo 9. Estadístico ensayo de transporte cambio de masa (g) vs tiempo (h) de la película de quitosán de bajo peso molecular en ácido acético

Sistema SAS
Procedimiento GLM

Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
REP	3	1 2 3
TRAT	2	1 2
TIME	2	0 60

Número de observaciones 12

Variable dependiente: PERME

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	7	6.04561839	0.86365977	55.51	0.0008
Error	4	0.06222921	0.01555730		
Total correcto	11	6.10784760			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	PERME Media
0.989812	17.87908	0.124729	0.697625

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para PERME

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4
Error de cuadrado medio	0.015557
Valor crítico del rango estudentizado	3.92649
Diferencia significativa mínima	0.1999

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	0.77488	6	2
A			
A	0.62038	6	1

Tukey Agrupamiento	Media	N	TIME
A	1.39525	6	60
B	0.00000	6	0

Nivel de TRAT	Nivel de TIME	N	----------PERME---------- Media	Dev std
1	0	3	0.00000000	0.00000000
1	60	3	1.24075000	0.16505000
2	0	3	0.00000000	0.00000000
2	60	3	1.54975000	0.18705000

Anexo 10. Estadístico ensayo de transporte cambio de masa (g) vs tiempo (h) de la película de quitosán de bajo peso molecular en ácido láctico

Sistema SAS
Procedimiento GLM
Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
REP	3	1 2 3
TRAT	2	1 2
TIME	2	0 60

Número de observaciones 12

Variable dependiente: PERME

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	7	6.54152666	0.93450381	16.22	0.0086
Error	4	0.23042580	0.05760645		
Total correcto	11	6.77195247			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	PERME Media
0.965974	33.23078	0.240013	0.722263

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para PERME

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4
Error de cuadrado medio	0.057606
Valor crítico del rango estudentizado	3.92649
Diferencia significativa mínima	0.3847

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	0.7684	6	2
A			
A	0.6761	6	1

Tukey Agrupamiento	Media	N	TIME
A	1.4445	6	60
B	0.0000	6	0

Nivel de TRAT	Nivel de TIME	N	----------PERME---------- Media	Dev std
1	0	3	0.00000000	0.00000000
1	60	3	1.35220000	0.11700000
2	0	3	0.00000000	0.00000000
2	60	3	1.53685000	0.46555000

Anexo 11. Estadístico ensayo de transporte cambio de masa (g) vs tiempo (h) de la película de quitosán de mediano peso molecular en ácido acético

Sistema SAS
Procedimiento GLM
Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
REP	3	1 2 3
TRAT	2	1 2
TIME	2	0 60

Número de observaciones 12

Variable dependiente: PERME

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	7	7.68543795	1.09791971	56.48	0.0008
Error	4	0.07776303	0.01944076		
Total correcto	11	7.76320098			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	PERME Media
0.989983	17.68015	0.139430	0.788625

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para PERME
NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4
Error de cuadrado medio	0.019441
Valor crítico del rango estudentizado	3.92649
Diferencia significativa mínima	0.2235

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	0.86623	6	2
A			
A	0.71103	6	1

Tukey Agrupamiento	Media	N	TIME
A	1.57725	6	60
B	0.00000	6	0

Nivel de TRAT	Nivel de TIME	N	----------PERME---------- Media	Dev std
1	0	3	0.00000000	0.00000000
1	60	3	1.42205000	0.21495000
2	0	3	0.00000000	0.00000000
2	60	3	1.73245000	0.17765000

Anexo 12. Estadístico ensayo de transporte cambio de masa (g) vs tiempo (h) de la película de quitosán de mediano peso molecular en ácido láctico

Sistema SAS
Procedimiento GLM
Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
REP	3	1 2 3
TRAT	2	1 2
TIME	2	0 60

Número de observaciones 12

Variable dependiente: PERME

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	7	14.72978112	2.10425445	19.93	0.0058
Error	4	0.42237301	0.10559325		
Total correcto	11	15.15215414			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	PERME Media
0.972125	33.85040	0.324951	0.959963

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para PERME

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4
Error de cuadrado medio	0.105593
Valor crítico del rango estudentizado	3.92649
Diferencia significativa mínima	0.5209

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	1.3279	6	2
B	0.5920	6	1

Tukey Agrupamiento	Media	N	TIME
A	1.9199	6	60
B	0.0000	6	0

Nivel de TRAT	Nivel de TIME	N	PERME Media	PERME Dev std
1	0	3	0.00000000	0.00000000
1	60	3	1.18405000	0.29965000
2	0	3	0.00000000	0.00000000
2	60	3	2.65580000	0.57670000

Anexo 13. Estadístico ensayo de hinchamiento en buffer de acetatos pH 5.5, índice de hinchamiento vs tiempo (min) de la película de quitosán de bajo peso molecular en ácido acético

Sistema SAS
Procedimiento GLM

Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
REP	3	1 2 3
TRAT	2	1 2
TIME	2	0 60

Número de observaciones 12

Variable dependiente: HINCHA_UNO

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	7	397.3025495	56.7575071	515.86	<.0001
Error	4	0.4401007	0.1100252		
Total correcto	11	397.7426502			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	HINCHA_UNO Media
0.998894	7.790739	0.331700	4.257625

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para HINCHA_UNO

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4
Error de cuadrado medio	0.110025
Valor crítico del rango estudentizado	3.92649
Diferencia significativa mínima	0.5317

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	6.9912	6	1
B	1.5241	6	2

Tukey Agrupamiento	Media	N	TIME
A	8.5153	6	60
B	0.0000	6	0

Nivel de TRAT	Nivel de TIME	N	----------HINCHA_UNO---------- Media	Dev std
1	0	3	0.0000000	0.00000000
1	60	3	13.9823333	0.59227049
2	0	3	0.0000000	0.00000000
2	60	3	3.0481667	0.29885850

Anexo 14. Estadístico ensayo de hinchamiento en buffer de acetatos pH 5.5, índice de hinchamiento vs tiempo (min) de la película de quitosán de bajo peso molecular en ácido láctico

Sistema SAS

Procedimiento GLM

Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
REP	3	1 2 3
TRAT	2	1 2
TIME	2	0 60

Número de observaciones 12

Variable dependiente: HINCHA_UNO

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	7	335.0439588	47.8634227	94.06	0.0003
Error	4	2.0355124	0.5088781		
Total correcto	11	337.0794712			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	HINCHA_UNO Media
0.993961	15.96282	0.713357	4.468867

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para HINCHA_UNO

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4
Error de cuadrado medio	0.508878
Valor crítico del rango estudentizado	3.92649
Diferencia significativa mínima	1.1435

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	6.4412	6	1
B	2.4966	6	2

Tukey Agrupamiento	Media	N	TIME
A	8.9377	6	60
B	0.0000	6	0

Nivel de TRAT	Nivel de TIME	N	----------HINCHA_UNO---------- Media	Dev std
1	0	3	0.0000000	0.00000000
1	60	3	12.8823333	1.35925106
2	0	3	0.0000000	0.00000000
2	60	3	4.9931333	0.43353081

Anexo 15. Estadístico ensayo de hinchamiento en buffer de acetatos pH 5.5, índice de hinchamiento vs tiempo (min) de la película de quitosán de mediano peso molecular en ácido acético

Sistema SAS
Procedimiento GLM
Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
REP	3	1 2 3
TRAT	2	1 2
TIME	2	0 60

Número de observaciones 12

Variable dependiente: HINCHA_UNO

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	7	385.7914967	55.1130710	93.54	0.0003
Error	4	2.3568887	0.5892222		
Total correcto	11	388.1483854			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	HINCHA_UNO Media
0.993928	18.28284	0.767608	4.198517

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para HINCHA_UNO
NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4
Error de cuadrado medio	0.589222
Valor crítico del rango estudentizado	3.92649
Diferencia significativa mínima	1.2305

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	6.8748	6	1
B	1.5222	6	2

Tukey Agrupamiento	Media	N	TIME
A	8.3970	6	60
B	0.0000	6	0

Nivel de TRAT	Nivel de TIME	N	----------HINCHA_UNO--------- Media	Dev std
1	0	3	0.0000000	0.00000000
1	60	3	13.7496667	1.53470000
2	0	3	0.0000000	0.00000000
2	60	3	3.0444000	0.03980716

Anexo 16. Estadístico ensayo de hinchamiento en buffer de acetatos pH 5.5, índice de hinchamiento vs tiempo (min) de la película de quitosán de mediano peso molecular en ácido láctico

Sistema SAS

Procedimiento GLM

Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
REP	3	1 2 3
TRAT	2	1 2
TIME	2	0 60

Número de observaciones 12

Variable dependiente: HINCHA_UNO

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	7	887.7734523	126.8247789	55.09	0.0008
Error	4	9.2079233	2.3019808		
Total correcto	1	896.9813757			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	HINCHA_UNO Media
0.989735	22.08858	1.517228	6.868833

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para HINCHA_UNO

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4
Error de cuadrado medio	2.301981
Valor crítico del rango estudentizado	3.92649
Diferencia significativa mínima	2.4321

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	10.4767	6	1
B	3.2610	6	2

Tukey Agrupamiento	Media	N	TIME
A	13.7377	6	60
B	0.0000	6	0

Nivel de TRAT	Nivel de TIME	N	----------HINCHA_UNO--------- Media	Dev std
1	0	3	0.0000000	0.00000000
1	60	3	20.9533333	3.01402793
2	0	3	0.0000000	0.00000000
2	60	3	6.5220000	0.35150960

Anexo 17. Estadístico ensayo de hinchamiento en buffer de acetatos pH 7.4, índice de hinchamiento vs tiempo (min) de la película de quitosán de bajo peso molecular en ácido acético

Sistema SAS
Procedimiento GLM
Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
REP	3	1 2 3
TRAT	2	1 2
TIME	2	0 60

Número de observaciones 12

Variable dependiente: HINCHA_DOS

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	7	5.53812491	0.79116070	21.30	0.0051
Error	4	0.14860659	0.03715165		
Total correcto	11	5.68673151			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	HINCHA_DOS Media
0.973868	28.77403	0.192748	0.669867

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para HINCHA_DOS
NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4
Error de cuadrado medio	0.037152
Valor crítico del rango estudentizado	3.92649
Diferencia significativa mínima	0.309

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	0.6841	6	2
A			
A	0.6556	6	1

Tukey Agrupamiento	Media	N	TIME
A	1.3397	6	60
B	0.0000	6	0

Nivel de TRAT	Nivel de TIME	N	----------HINCHA_DOS--------- Media	Dev std
1	0	3	0.00000000	0.00000000
1	60	3	1.31126667	0.37492186
2	0	3	0.00000000	0.00000000
2	60	3	1.36820000	0.08966711

Anexo 18. Estadístico ensayo de hinchamiento en buffer de acetatos pH 7.4, índice de hinchamiento vs tiempo (min) de la película de quitosán de bajo peso molecular en ácido láctico

Sistema SAS
Procedimiento GLM

Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
REP	3	1 2 3
TRAT	2	1 2
TIME	2	0 60

Número de observaciones 12

Variable dependiente: HINCHA_DOS

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	7	13.78736951	1.96962422	43.30	0.0013
Error	4	0.18194362	0.04548590		
Total correcto	11	13.96931313			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	HINCHA_DOS Media
0.986975	20.03233	0.213274	1.064650

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para HINCHA_DOS

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4
Error de cuadrado medio	0.045486
Valor crítico del rango estudentizado	3.92649
Diferencia significativa mínima	0.3419

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	1.0770	6	2
A			
A	1.0523	6	1

Tukey Agrupamiento	Media	N	TIME
A	2.1293	6	60
B	0.0000	6	0

Nivel de TRAT	Nivel de TIME	N	----------HINCHA_DOS--------- Media	Dev std
1	0	3	0.00000000	0.00000000
1	60	3	2.10456667	0.35475610
2	0	3	0.00000000	0.00000000
2	60	3	2.15403333	0.23683691

Anexo 19. Estadístico ensayo de hinchamiento en buffer de acetatos pH 7.4, índice de hinchamiento vs tiempo (min) de la película de quitosán de mediano peso molecular en ácido acético

Sistema SAS
Procedimiento GLM

Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
REP	3	1 2 3
TRAT	2	1 2
TIME	2	0 60

Número de observaciones 12

Variable dependiente: HINCHA_DOS

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	7	33.61030190	4.80147170	61.15	0.0007
Error	4	0.31408741	0.07852185		
Total correcto	11	33.92438931			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	HINCHA_DOS Media
0.990742	17.66086	0.280218	1.586658

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para HINCHA_DOS

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4
Error de cuadrado medio	0.078522
Valor crítico del rango estudentizado	3.92649
Diferencia significativa mínima	0.4492

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	1.9453	6	1
B	1.2281	6	2

Tukey Agrupamiento	Media	N	TIME
A	3.1733	6	60
B	0.0000	6	0

Nivel de TRAT	Nivel de TIME	N	----------HINCHA_DOS---------- Media	Dev std
1	0	3	0.00000000	0.00000000
1	60	3	3.89053333	0.53700328
2	0	3	0.00000000	0.00000000
2	60	3	2.45610000	0.16035863

Anexo 20. Estadístico ensayo de hinchamiento en buffer de acetatos pH 7.4, índice de hinchamiento vs tiempo (min) de la película de quitosán de mediano peso molecular en ácido láctico

Sistema SAS
Procedimiento GLM
Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
REP	3	1 2 3
TRAT	2	1 2
TIME	2	0 60

Número de observaciones 12

Variable dependiente: HINCHA_DOS

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	7	55.64301475	7.94900211	209.99	<.0001
Error	4	0.15141728	0.03785432		
Total correcto	11	55.79443204			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	HINCHA_DOS Media
0.997286	9.276852	0.194562	2.097283

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para HINCHA_DOS
NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4
Error de cuadrado medio	0.037854
Valor crítico del rango estudentizado	3.92649
Diferencia significativa mínima	0.3119

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	2.4332	6	1
B	1.7614	6	2

Tukey Agrupamiento	Media	N	TIME
A	4.1946	6	60
B	0.0000	6	0

Nivel de TRAT	Nivel de TIME	N	----------HINCHA_DOS--------- Media	Dev std
1	0	3	0.00000000	0.00000000
1	60	3	4.86643333	0.09061663
2	0	3	0.00000000	0.00000000
2	60	3	3.52270000	0.37842557