

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE FARMACIA
Y BIOQUÍMICA**



Actividad cicatrizante del quitosano extraído del
exoesqueleto de *Cancer spp.* "cangrejo" en ratas
Holtzman. Ayacucho, 2010.

Tesis para optar el Título Profesional de:
QUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR:
Bach. SACCATOMA CONTRERAS, FERNANDO

AYACUCHO-PERÚ
2011

*Con inmenso amor y cariño a mí
madre, hermanos y a la hermana
Benita Crispín.*

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, *Alma mater* forjadora de profesionales competentes de calidad humana al servicio de la sociedad, por brindarme las facilidades para estudiar y hacer realidad mi objetivo de terminar mis estudios de la carrera profesional de Farmacia y Bioquímica.

A la Facultad de Ciencias Biológicas y en especial a la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica por acogerme y brindarme una carrera profesional.

A la plana de profesores de la carrera profesional de Biología, de Farmacia y Bioquímica, por transmitirme sus conocimientos y experiencias en forma incondicional.

A mis asesores con especial agradecimiento, al Mg. Q.F. José Manuel Diez Macavilca y Mg. Q.F. Edwin Carlos Enciso Roca, por su constante colaboración, apoyo profesional y valioso asesoramiento con sus experiencias y conocimientos científicos.

A todas aquellas personas, que directa o indirectamente han contribuido a la materialización del presente trabajo.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. La quitina	5
2.3. Quitosano	6
2.4. Métodos de obtención	7
2.4.1. Fuentes de obtención de quitina	7
2.4.2. Obtención del quitosano	9
2.4.3. Caracterización del quitosano	10
2.4.4. Aplicaciones del quitosano	11
2.4.5. Mecanismos de acción del quitosano	15
2.4.6. Propiedades del quitosano	16
2.5. Cicatrización de las heridas	17
2.6. Diagnóstico de la cicatriz	26
2.7. Tratamiento de la cicatriz	26
III. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1. Ubicación	29
3.2. Materiales	29
3.2.1. Muestra biológica	29
3.3. Diseño metodológico	29
3.3.1. Procedimiento para la obtención de quitina	29
3.3.2. Procedimiento para la obtención de quitosano	31
3.3.3. Identificación y valoración del quitosano	31
3.3.4. Determinación de la actividad cicatrizante del quitosano	32
3.4. Análisis estadístico	35
IV. RESULTADOS	36
V. DISCUSIÓN	47
VI. CONCLUSIÓN	52
VII. RECOMENDACIONES	53
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXOS	59

RESUMEN

Actividad cicatrizante del quitosano extraído del exoesqueleto de *Cancer spp.* “cangrejo” en ratas Holtzman. Ayacucho, 2010.

AUTOR :Bach. Fernando, SACCATOMA CONTRERAS.

**ASESORES :Mg. Q.F. José Manuel, DIEZ MACAVILCA.
Mg. Q.F. Edwin Carlos, ENCISO ROCA.**

El objetivo de la presente investigación es el estudio del efecto cicatrizante del quitosano, obtenido por desacetilación a partir de quitina de los caparazones del cangrejo *Cancer spp.*, bajo la forma de soluciones a diferentes concentraciones. El estudio se realizó en el laboratorio de Farmacia, de la Facultad de Ciencias Biológicas, durante los meses de enero a junio del 2010. Los exoesqueletos (caparazón) del cangrejo fueron recogidos del mercado central de la ciudad de Ayacucho, Provincia de Huamanga Departamento de Ayacucho. Se aisló la quitina de los exoesqueletos (caparazones) de cangrejo, obteniéndose quitosano por desacetilación de la quitina y se determinó el grado de desacetilación mediante titulación potenciométrica y se identificó por su solubilidad, posteriormente se prepararon soluciones a distintas concentraciones. Para la determinación del efecto cicatrizante se utilizó el método descrito por Howes y Col, para lesiones inducidas. Para esta prueba se utilizaron 35 ratas hembras Holtzman de un peso dentro del rango de 27,5 a 41,1 g. con un promedio de edad de cuatro meses, divididos en 7 grupos al azar. Consistió en exponer las heridas de las ratas a cuatro tipos de concentraciones de quitosano, 0,5%, 1%, 3% y 5% aplicándose a las ratas cada 12 horas por un periodo de 72 horas. Después de éste período se evalúa la resistencia que ofrecían las heridas tratadas; comparando los resultados con el grupo control (sin tratamiento) y con el grupo tratado con un medicamento comercial. El quitosano extraído de los exoesqueletos de *Cancer spp.* presenta actividad cicatrizante siendo, el mayor porcentaje de cicatrización 54,28% con la solución al 0,5%.

El presente trabajo de investigación muestra de una manera clara y sencilla la obtención de quitosano de los exoesqueletos (caparazones) de cangrejo. Concluyéndose que en las condiciones de ensayo el quitosano posee un significado efecto cicatrizante.

Palabras Clave: quitosano, actividad cicatrizante.

I. INTRODUCCIÓN

En la naturaleza la quitina es el segundo polisacárido más abundante después de la celulosa (Heller, 1959, citado por Hernández y col, 2009). La principal fuente de quitina son los exoesqueletos de crustáceos y de los insectos, así de las paredes celulares de muchos hongos, levaduras y algas. La quitina es blanca, dura, inelástica y es la mayor fuente de contaminación superficial de las áreas cercanas al mar. Por su parte el quitosano es también un polisacárido que se encuentra en estado natural en las paredes celulares de algunos hongos (Muzzarelli, 1974).

El quitosano es el derivado de la quitina, éste es un polímero con propiedades tales como biocompatibilidad, biodegradabilidad, toxicidad nula, etc (Lemus, 2007, citado por Muzzarelli, 1974).

Estos productos bioquímicos se pueden obtener a partir del tratamiento químico de exoesqueletos de crustáceos entre ellos el cangrejo. El quitosano se obtiene por modificación química de la quitina, la cual es tratada con una solución alcalina concentrada y caliente, el polímero que se obtiene posee ciertas características químicas y físicas de gran interés en la industria farmacéutica.

La búsqueda de nuevos biomateriales con propiedades específicas, es un campo de interés científico y tecnológico que orienta los esfuerzos de muchos centros de investigación. La utilización en la medicina, industria textil, la

agricultura y el tratamiento de aguas como bioremediador, son ejemplos de sus vastas aplicaciones.

El presente trabajo de investigación es una contribución para satisfacer las necesidades de salud de nuestro país mediante la transformación de los desechos de exoesqueletos de cangrejos, tan abundantes en nuestro país. En un compuesto para tratar eficazmente la cicatrización. Valorando de esta manera la importancia de quitosano como un arma importante en la cicatrización de las heridas producidas por diferentes factores que puede llegar a consecuencias graves como las infecciones.

Por lo que se plantea los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Determinar la actividad cicatrizante del quitosano extraído del exoesqueleto de *Cancer spp.* "cangrejo" en ratas Holtzman.

Objetivos específicos:

1. Extraer e identificar el quitosano obtenido del exoesqueleto de *Cancer spp.* "cangrejo".
2. Determinar la concentración que presenta mayor actividad cicatrizante.
3. Comparar la actividad cicatrizante con el estándar "Cicatrin®".

II. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES.

La quitina se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, tanto en el reino animal como el vegetal. De hecho es el segundo polímero natural más abundante, sólo superado por la celulosa, por lo que constituye un importante recurso renovable (Peniche, 2006).

La quitina fue aislada por primera vez en 1811, a partir de hongos superiores, por Braconnot, quien le asignó el nombre de fungina. Posteriormente Ordier, en un artículo sobre insectos reportó que había encontrado en algunos insectos la misma sustancia que forma la estructura de las plantas, llamándola "quitina" (del griego tunic, envoltura). El quitosano fue descubierto por Rouget en 1859, quien encontró que al tratar quitina con una solución caliente de hidróxido de potasio se obtiene un producto soluble en ácidos orgánicos. Esta "quitina modificada", como él le llamó, se tornaba de color violeta en soluciones diluidas de yoduro y ácido, mientras la quitina era verde. En 1894, fue estudiada por Hoppe-Seyler quien sometió a reflujo a 180°C en hidróxido de potasio y observó que el producto que se formaba era bastante soluble en ácido acético y clorhídrico y lo denominó quitosano (Lárez, 2003).

Hidalgo y col. (2008), realizaron la validación de una técnica potenciometrica para determinar el grado de desacetilación del quitosano. El método consistió en

exponer el quitosano a un exceso de disolución de ácido clorhídrico, ocurriendo la protonación del grupo amino libre del quitosano, valorando después esta disolución con hidróxido de sodio. El NaOH reacciona primero con el ácido libre en la disolución y después desplaza de la molécula de quitosano el anión cloruro unido al grupo amino libre en un medio neutro, por lo que puede registrarse la diferencia de pH entre estos dos puntos y se obtiene una curva de pH frente a volumen de NaOH añadido, con dos puntos de inflexión. El primer y segundo punto de inflexión son equivalentes a la titración del exceso de ácido clorhídrico y al de la titración del quitosano protonada, respectivamente. La diferencia de volumen entre estos dos puntos se corresponde con el ácido consumido para la protonación de los grupos aminos y permite la determinación del grado de desacetilación del quitosano.

En Venezuela Lárez (2003), realizó estudios sobre algunos usos de quitosano en sistemas acuosos, formación de policomplejos que tienen características de hidrogeles, motivo por el cual ha sido posible estudiarlos en la liberación controlada de drogas. Determinó también que los hidrogeles preparados a pH ácido logran un grado de hinchamiento máximo; debido a esta característica determinó la máxima repulsión que puede experimentar los grupos cargados y el mínimo apantallamiento que genera la adición de un exceso de ácido.

En Cuba Peniche (2006), realizó estudios sobre quitina y quitosano, determinó el grado de acetilación y desacetilación. Realizó estudios de interacción con metales (Fe^{3+} , Ag^+ , Hg^{2+}), entrecruzamiento con glutaraldehído para la inmovilización de enzimas, para promover la insolubilización del quitosano.

Cárdenas (2006), profesor de la Universidad de Concepción en Santiago de Chile realizó estudios con una piel artificial a base de quitosano para tratar quemadura consecuencia de una explosión de una bomba de gasolina. El tratamiento concluyó como todo un logro. Las cicatrices tratadas con esta nueva

piel resultan más tenues, puesto que el quitosano permite el crecimiento de los fibroblastos, tipo de las células que constituyen parte fundamental de la estructura de soporte de tejidos y órganos, evitando la necesidad de un posterior injerto de epidermis.

Hernández y col (2009), realizó una investigación sobre la obtención y caracterización del quitosano obtenido a partir de los exoesqueletos de camarón, logrando una desacetilación termoalcalina de la quitina, el porcentaje de desacetilización que obtuvo fue de 64%.

2.2. QUITINA.

El segundo compuesto orgánico más abundante en la Tierra es un polisacárido lineal que imparte rigidez a la pared celular de los hongos y al exoesqueleto de un gran número de invertebrados.

El nombre sistemático de la quitina es $\beta(1-4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa. Se encuentra principalmente en las conchas de crustáceos y formando parte del exoesqueleto de los insectos, así como también en las paredes celulares de muchos hongos, levaduras y algas (Muzzarelli, 1974 citado por Lárez, 2003). La quitina es completamente insoluble en agua o en medio ácido. Su estructura química es la siguiente:

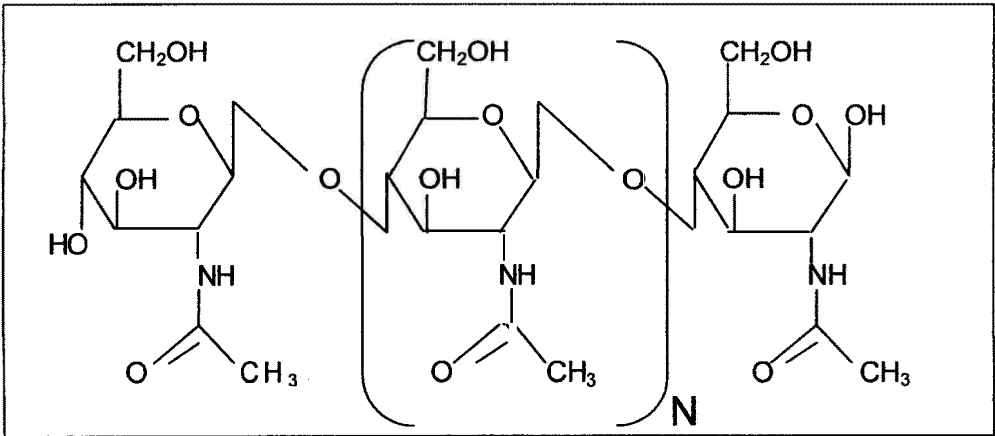


Figura N°1: Estructura molecular de la quitina.

Fuente: Sánchez y col, 2007.

piel resultan más tenues, puesto que el quitosano permite el crecimiento de los fibroblastos, tipo de las células que constituyen parte fundamental de la estructura de soporte de tejidos y órganos, evitando la necesidad de un posterior injerto de epidermis.

Hernández y col (2009), realizó una investigación sobre la obtención y caracterización del quitosano obtenido a partir de los exoesqueletos de camarón, logrando una desacetilación termoalcalina de la quitina, el porcentaje de desacetilización que obtuvo fue de 64%.

2.2. QUITINA.

El segundo compuesto orgánico más abundante en la Tierra es un polisacárido lineal que imparte rigidez a la pared celular de los hongos y al exoesqueleto de un gran número de invertebrados.

El nombre sistemático de la quitina es $\beta(1-4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa. Se encuentra principalmente en las conchas de crustáceos y formando parte del exoesqueleto de los insectos, así como también en las paredes celulares de muchos hongos, levaduras y algas (Muzzarelli, 1974 citado por Lárez, 2003). La quitina es completamente insoluble en agua o en medio ácido. Su estructura química es la siguiente:

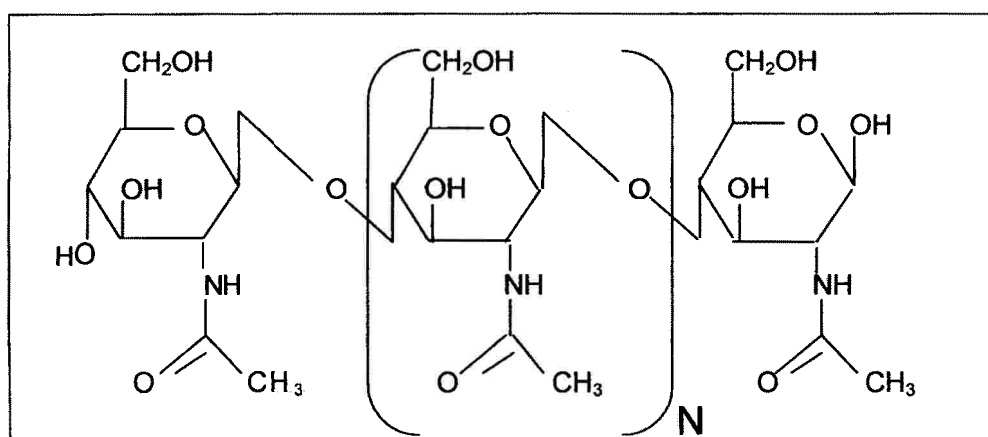


Figura N°1: Estructura molecular de la quitina.

Fuente: Sánchez y col, 2007.

2.3. QUITOSANO.

El quitosano fue descubierto por Rouget en 1859, quien encontró que al tratar quitina con una solución caliente de hidróxido de potasio se obtiene un producto soluble en ácidos orgánicos. Esta "quitina modificada", como él la llamó, se tornaba de color violeta en soluciones diluidas de yoduro y ácido, mientras la quitina era verde. Más tarde, en 1894, fue estudiada por Hoppe-Seyler quién la denominó "quitosano" (Rigola y Lapeña, 1999).

Se encuentra en estado natural en las paredes celulares de algunos hongos; sin embargo, su principal fuente de producción es la hidrólisis de la quitina en medio alcalino, usualmente en soluciones de hidróxido de sodio o de potasio, a altas temperaturas (Lárez, 2003).

El quitosano es un polisacárido lineal que se obtiene por desacetilación extensiva de la quitina y está compuesto por dos tipos de unidades estructurales distribuidas de manera aleatoria a lo largo de la cadena, N-acetil-D-glucosamina y la D-glucosamina, las cuales se encuentran unidas entre sí por enlaces del tipo β (1 $\rightarrow$ 4) glicosídicos. Resulta muy difícil desacetilar totalmente la quitina, y lo que usualmente se conoce como quitosano es una familia de quitinas con diferente grado de desacetilación (Peniche, 2006).

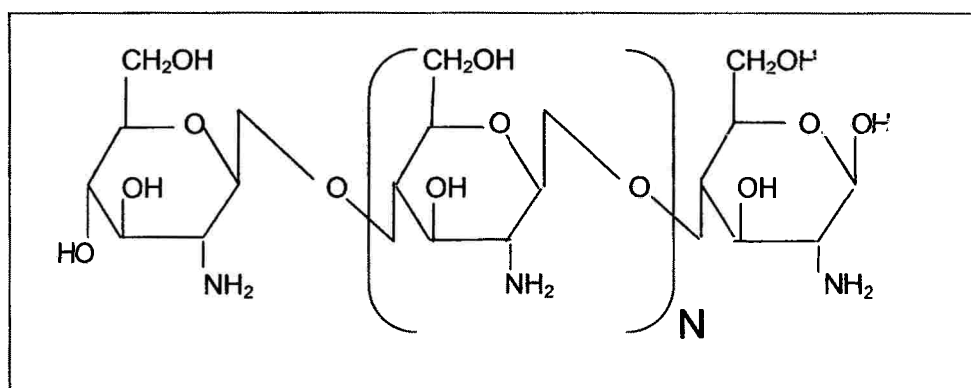


Figura N°2: Estructura molecular del quitosano

Fuente: Sánchez y col, 2007.

La presencia de grupos aminos en la cadena polimérica, ha hecho del quitosano uno de los materiales más versátiles que se estudian desde hace ya algún tiempo, por la posibilidad de realizar una amplia variedad de modificaciones (Peniche, 2006).

2.4. MÉTODOS DE OBTENCIÓN:

2.4.1 FUENTES DE OBTENCION DE QUITINA.

La principal fuente de obtención son los de crustáceos de la industria pesquera, siendo las principales fuentes los caparazones de cangrejo peludo, cangrejo violáceo, camarón, langosta y langostino que se encuentra en mayor cantidad a lo largo de costas del litoral peruano (Parada, 2004).

La mayor parte de las técnicas desarrolladas descansan en procesos químicos de hidrólisis de la proteína y la remoción de la materia prima. En la actualidad se investigan tratamientos enzimáticos como una alternativa promisorio. A tal efecto se han reportado procesos que utilizan extractos enzimáticos o enzimas aisladas y fermentaciones microbiológicas, pero aún sin la eficiencia de los métodos químicos, fundamentalmente en lo que respecta a la eliminación del material inorgánico (Nieto, 1986).

En general los procesos de obtención de quitina se realizan mediante los siguientes pasos consecutivos (Argüelles, 1988).

2.4.1.1 Acondicionamiento de la materia prima.

Consiste en el lavado con agua de los caparazones a procesar y separación de la masa que pueda quedar adherida a los mismos. Posteriormente se seca la muestra hasta peso constante y luego se procede a la molienda hasta el tamaño de partículas adecuado para la extracción, que generalmente es de varios milímetros (Roberts, 1992 citado por Peniche, 2006).

2.4.1.2 Desmineralización.

El principal componente inorgánico de los caparazones de los crustáceos es el

carbonato de calcio (CaCO_3), el cual se suele eliminar empleando soluciones diluidas de ácido clorhídrico (hasta 10%) a temperatura ambiente, aunque también se han utilizado otros ácidos (HNO_3 , H_2SO_4 y CH_3COOH). La concentración del ácido y el tiempo de tratamiento dependen de la fuente, pero deben evitarse los tratamientos a temperaturas más altas, que provocan la degradación del polímero. Un tratamiento alternativo para disminuir la degradación consiste en el empleo del agente acomplejante EDTA (ácido etilendiaminotetracético) (Roberts, 1992 citado por Austin, 1981).

2.4.1.3 Desproteínización.

Consiste en tratar los caparazones de los crustáceos con una solución acuosa diluida de NaOH que varía de 1 – 10% a temperaturas entre 65 – 100°C, con la finalidad de disolver la proteína. El tiempo de tratamiento suele variar entre 0,5 y 72 horas. En ocasiones se prefiere realizar dos tratamientos consecutivos por tiempos cortos. Hay que tener en cuenta que tratamientos por largo tiempo o a temperaturas muy altas pueden provocar ruptura de las cadenas y la desacetilación parcial del polímero. También se han utilizado otros agentes para extraer la proteína, entre los cuales se mencionan los siguientes: Na_2CO_3 , NaHCO_3 , KOH, K_2CO_3 , $\text{Ca}(\text{OH})_2$, Na_2SO_3 , NaHSO_3 , Na_3PO_4 y Na_2S (Roberts, 1992 citado por Peniche, 2006).

El proceso enzimático consiste en la digestión enzimática o fermentación con bacterias proteolíticas con actividad no quitinolítica, por ejemplo, *Pseudomonas maltophilia*. Este proceso presenta la ventaja de que disminuye la degradación química de la quitina y además protegen las condiciones del medio ambiente, sin embargo no se consigue la eliminación completa de la proteína, suele dejar de 1 – 7% (Synowiecki, 2000)(Vilchez, 2005).

2.4.1.4 Decoloración.

La coloración de los caparazones de crustáceos se debe fundamentalmente a la

presencia de pigmentos tales como la astaxantina, la cantaxantina, el astaceno, la luteína y el β -caroteno. Los tratamientos anteriores generalmente no son capaces de eliminar estos pigmentos, los que suelen extraerse a temperatura ambiente con acetona, cloroformo, éter, etanol, acetato de etilo o mezcla de solventes. También se han empleado agentes oxidantes tradicionales, como el H_2O_2 (0,5 - 3%) y el NaClO (0,32%), aunque debe tenerse presente que éstos suelen atacar los grupos aminos libres e introducir modificaciones en el polímero. En caparazones fuertemente coloreados, como el de la langosta común, se ha reportado la utilización exitosa de tratamientos con mezclas de acetona y NaOCl a temperatura ambiente (Acosta, 1993).

2.4.2 OBTENCIÓN DEL QUITOSANO.

La obtención del quitosano se produce por desacetilación de la quitina que se lleva a cabo por hidrólisis de los grupos acetamida en medio fuertemente alcalino, a altas temperaturas. Generalmente la reacción se realiza en fase heterogénea empleando soluciones concentradas de NaOH o KOH (40-50%) a temperaturas superiores a 100°C , preferiblemente en atmósfera inerte o en presencia de sustancias reductoras como el NaBH_4 o el tiofenol para evitar la despolimerización del polímero (Lemus, 2006). No obstante, con un solo tratamiento alcalino, el máximo grado de desacetilación alcanzado no suele sobrepasar del 75 al 85%. Tratamientos prolongados suelen provocar la degradación del polímero sin traducirse en un aumento sensible del grado de desacetilación (Peniche, 1984).

La reacción en condiciones homogéneas permite una modificación más uniforme del polímero, y se realiza sobre álcali quitina. La misma se obtiene sometiendo una suspensión alcalina de quitina a tratamientos de congelación-descongelación hasta producir una solución acuosa de quitina en hidróxido de sodio (Muzzarelli, 1973). La desacetilación homogénea se lleva a cabo a

concentraciones de álcali más moderadas (alrededor del 30%), a 25 - 40°C por tiempos de 12 a 24 horas (Sannan, 1976, citado por Peniche, 2006).

2.4.3 CARACTERIZACIÓN DEL QUITOSANO.

Tanto la composición de las cadenas de estos polímeros como sus dimensiones suelen variar en dependencia del material de partida y de la rigurosidad del método de obtención, por lo que la determinación del grado de acetilación y su masa molecular son dos parámetros de obligatorio conocimiento para caracterizar una muestra de estos polisacáridos, ya que ambas tienen una gran incidencia en sus propiedades (Peniche, 2006).

2.4.3.1 Determinación del grado de desacetilación.

Existen numerosos métodos para determinar el contenido de los grupos aminos presentes en la cadena polimérica, entre las que se pueden mencionar la espectroscopía de infrarojo (IR) (Brugnerotto, 2001 citado por Peniche, 2006), espectroscopía de UV (Liu, 2006), espectroscopia de RMN, potenciometria (Muzzarelli, 1977 citado por Vílchez, 2005) y la conductimetría (Raymond, 1993 citado por Vílchez, 2005).

2.4.3.1.1 Valoración potenciométrica.

El método consiste en exponer el quitosano a un exceso de disolución de ácido clorhídrico, ocurriendo la protonación del grupo amino libre del quitosano, valorando después esta disolución con hidróxido de sodio. El NaOH reacciona primero con el ácido libre en la disolución y después desplaza de la molécula del quitosano el anión cloruro unido al grupo amino libre. El quitosano precipita al quedar libre en un medio neutro, por lo que puede registrarse la diferencia de pH entre estos dos puntos y se obtiene una curva de pH frente a volumen de NaOH añadido, con dos puntos de inflexión. El primer y segundo punto de inflexión son equivalentes a la valoración del exceso de ácido clorhídrico y al de la valoración del quitosano protonado, respectivamente. La diferencia de

volumen entre estos dos puntos se corresponde con el ácido consumido para la protonación de los grupos aminos y permite la determinación del grado de desacetilación del quitosano (Hidalgo y col, 2008).

2.4.3.2 Solubilidad.

La presencia de grupos amino de la cadena de quitosano permite la disolución de esta macromolécula en disoluciones de ácidos diluidos, por medio de la protonación de esos grupos. En medios ácidos diluidos tiene lugar el siguiente equilibrio:

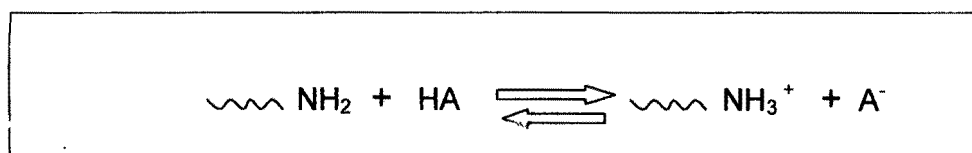


Figura N° 3: Reacción del quitosano frente a un ácido orgánico.

Fuente: Vilchez, 2005.

Cuando la amina adquiere carga positiva, el quitosano aumenta su capacidad hidrofílica y pasa a ser soluble en soluciones ácidas diluidas formando sales ya que el pKa del grupo amino en el quitosano es 6,5 (Tommeraas y Col, 2001 citado por Vilchez, 2005).

En ácidos inorgánicos como el clorhídrico, bromhídrico, iodhídrico, nítrico y perclórico diluidos se puede solubilizar. En cambio es insoluble en ácido sulfúrico diluido. También es insoluble en la gran mayoría disolventes orgánicos. El quitosano, al igual que la quitina, es insoluble en agua (Vilchez, 2005).

2.4.4 APLICACIONES DEL QUITOSANO.

El Quitosano debido a sus propiedades físico-químicas, funcionales y biológicas tiene una gran variedad de aplicaciones que abarcan campos tan diferentes como la medicina, la farmacia, la agricultura, la alimentación y el sector textil entre otros (Vilchez, 2005) (Mesquita, 2005). A continuación se detallan:

a. En la alimentación.

El quitosano representa una alternativa interesante en la formulación de recubrimientos y films comestibles, debido a sus propiedades bioquímicas y formadoras de films. Este polímero ha sido empleado con éxito en estudios realizados sobre tomates, pepinos, calabacines y algunas frutas. Los films con quitosano son resistentes, duraderos, flexibles y muy difíciles de romper, con propiedades mecánicas similares a algunos polímeros comerciales. Tienen una moderada permeabilidad al agua, constituyen buenas barreras para la penetración del oxígeno, disminuyen las tasas de respiración, retrasan el proceso de maduración (debidos al etileno y dióxido de carbono) y además inhiben el desarrollo fúngico (Mathur, 1990).

b. Agente antimicrobiano.

En lo que respecta a la actividad antimicrobiana del quitosano, su espectro de actuación es amplio, afectando a bacterias, mohos y levaduras. Esta propiedad ha sido ampliamente descrita en la literatura científica, sobre todo en estudios basados en experimentos in vitro frente a diversos grupos de microorganismos. Aunque su actividad antimicrobiana depende de diversos factores que pueden limitar su eficacia, los estudios demuestran que se puede considerar un compuesto interesante para su utilización como conservante en alimentos, con un potencial considerable para mejorar la calidad y seguridad de los mismos.

Los mohos y levaduras son el grupo más sensible al quitosano, seguidos de las bacterias Gram positivas y las Gram negativas (Plascencia, 2004).

c. En la industria farmacéutica.

Como aditivo por sus propiedades espesantes, gelificantes, y emulsificantes, el quitosano y sus derivados pueden ser considerados mejoradores de la textura de los alimentos, ya que fijan agua y grasa. También pueden ser utilizados como estabilizantes del color, o como agentes floculantes, utilizándose para la

clarificación de bebidas (vinos, zumos, etc.). Diversos estudios ponen de manifiesto también la efectividad del quitosano como antioxidante secundario, por su habilidad de quelar iones metálicos implicados en la catálisis de las reacciones oxidativas (Mathur, 1990).

La naturaleza catiónica del polímero permite formar complejos con fármacos o excipientes de carga opuesta, con lo cual se modifican algunas de sus características físico-químicas. La reacción del quitosano con aniones polivalentes, da lugar a uniones tanto en medio ácido, básico como neutro, originando con estos contra iones la formación de geles ionotrópicos de quitosano. Se postula el uso del quitosano como cicatrizante de heridas pues se ha comprobado que disminuye la fibrosis y la mortalidad en cirugía genitourinaria, también como antibacteriano y antifúngico (Ochoa y Ruíz, 2004).

Upadrashta y col, citados por Ochoa y Ruíz (2004) han investigado la posible utilización de quitosano como agente aglutinante en comprimidos de maleato de clorfeniramina. Así, al incorporar un 2% de este excipiente a la formulación se obtienen comprimidos con buenas propiedades físicas y un porcentaje de fármaco disuelto del 75% en 5 minutos. Pero al incrementar la proporción de quitosano hasta un 5% se produce un retraso en la cesión del fármaco obteniéndose una disolución del 30% en el mismo período de tiempo.

d. En medicina.

En el campo de la medicina, diversos estudios han demostrado la capacidad del quitosano para reducir de forma efectiva la absorción de grasa de la dieta, reducir la presión sanguínea y disminuir los niveles de colesterol sérico. Esto se produce gracias a un mecanismo de formación de enlaces iónicos con los que se fija a diferentes tipos de aniones tales como ácidos grasos libres, y a su capacidad de formar micelas con el colesterol (Mathur, 1990). Agente cicatrizante en quemaduras, sistemas liberadores de fármacos, liberación de

insulina, transporte de agentes anti cancerígenos, tratamiento de tumores (leucemia), control del virus del SIDA, etc (Lárez, 2003) (Ishihara, 2002).

e. En tratamiento de agua.

El quitosano y sus derivados, pueden ser utilizados para el tratamiento de efluentes de industrias y en plantas de tratamiento de aguas de bebida. Estos compuestos actúan como quelantes de metales de transición y contaminantes ambientales, removedores de iones metálicos (Hg^{+2} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ y Ni^{2+}), floculantes coagulantes y precipitantes de proteínas, aminoácidos, tintes, colorantes, algas, aceites, metales radioactivos (U y Co), partículas en suspensión y pesticidas (Mathur, 1990).

f. En cosmética.

Fabricación de cápsulas para adelgazar, denominadas “atrapagrasas”, aditivo bactericida en jabones, champúes, cremas de afeitar, cremas para la piel, pasta dental, agente hidratante para la piel, debido a que sus geles pueden suministrar agua y evitar la sequedad. Además, el quitosano forma una película que ayuda a dosificar otros principios activos (Lárez, 2006).

g. En biotecnología.

En el campo de la biotecnología, el quitosano actúa en la inmovilización de enzimas como la glucosa isomerasa empleándose en lechos para biorreactores, en la separación de proteínas, en biosensores (monitorizando la oxidación de los lípidos en músculo de pescado y crustáceos), etc. (Mathur, 1990).

Son múltiples las aplicaciones del quitosano en este campo, especialmente como soporte para la inmovilización de enzimas sensibles a un sustrato específico, separación de proteínas, cromatografía, recuperación celular (Lárez, 2006) (Caprile, 2005).

h. En tecnología de membranas.

Para la separación de componentes (filtros moleculares), en columnas cromatográficas, como absorbentes de encapsulación, para el control de permeabilidad, en osmosis inversa, electrodiálisis, quitina magnética y aislamiento de lisozima (Peral, 2009).

i. En agricultura.

En este campo presenta amplias aplicaciones (Peral, 2009) (Lárez, 2006).

- Bioestimulante de plantas en tratamientos de semillas, raíces y hojas.
- En tratamientos post cosecha de frutas y verduras con el fin de aumentar su conservación.
- Recubrimiento de semillas.
- Conservación de frutas.
- Protección frente a plagas y hongos, virucida.
- Estimulante del crecimiento.

j. En industria textil.

Existen tres formas de aplicación: a) producción de fibras, b) auxiliar textil, y c) aplicado en procesos de acabado lo que mejora propiedades de fibras naturales como lana y algodón (Vílchez, 2005) (Peniche, 2006) (Peral, 2009).

2.4.5 MECANISMOS DE ACCIÓN DEL QUITOSANO.

El quitosano es un polímero biocompatible, biodegradable, no tóxico y muco adhesivo, lo que la hace atractiva para aplicaciones en medicina y farmacia. Es degradada por la lisozima y la lipasa. Los productos de la degradación de la lipasa no son tóxicos (Chandi y Charma, 1990).

El quitosano presenta actividad cicatrizante y se ha sugerido que el mecanismo por el cual el quitosano ejerce su acción cicatrizante es mediante la activación de neutrófilos y macrófagos, la migración de polimorfonuclear y células

mononucleares, acelerando la regeneración de tejido conectivo y angiogénesis (Bianco y col, 2000) (Kweon y col, 2003).

2.4.6 PROPIEDADES DEL QUITOSANO.

El quitosano posee varias características que lo hacen un material idóneo para el tratamiento de las heridas, las que se revisaran brevemente en las siguientes secciones.

2.4.6.1 Propiedades bioadhesivas.

El término bioadhesión describe la capacidad de ciertas macromoléculas, sintéticas o biológicas, de adherirse a los tejidos del organismo mediante interrelaciones entre algunas agrupaciones químicas concretas de los polímeros y los tejidos biológicos ó interpenetración de cadenas (Rodríguez, 2000, citado por Cárcamo, 2005). Muchas de las propiedades del quitosano dependen de su naturaleza catiónica. A pH ácido, es un polielectrolito lineal con gran densidad de carga (una carga positiva por cada residuo de $\beta(1\rightarrow4)$ -2-amino-2-desoxi-D-glucopiranos, Glucosamina), por lo que interactúa con moléculas cargadas negativamente, incluidas proteínas, polisacáridos aniónicos y ácidos nucleicos, muchos presentes en la superficie de la piel, confiriendo propiedades de bioadhesión (Lloyd, 1998, citado por Cárcamo, 2005).

2.4.6.2 Regeneración de tejidos.

Se ha demostrado que el quitosano promueve la curación de las heridas y reduce la formación de cicatrices debido a que incrementa la acción de queratinocitos, leucocitos polimorfonucleares, neutrófilos, fibroblastos y macrófagos (Mori y col, 2005) y promueve la síntesis de colágeno (Kojima, 2004, citado por Cárcamo, 2005). Como resultado, el quitosano promueve la formación de tejido de granulación con angiogénesis y la organización, por lo que es beneficioso para la curación de heridas (Ueno, 2001, citado por Cárcamo, 2005).

2.4.6.3 Propiedades hemostáticas.

Esta propiedad del quitosano es independiente de las cascadas de coagulación normales y se debe a su interacción con las membranas celulares de eritrocitos, lo que lo convierte en un adhesivo biológico (Ishiara, 2002).

2.4.6.4 Biocompatibilidad.

Las pruebas clínicas realizadas hasta ahora no han reportado reacciones inflamatorias o alérgicas luego de la implantación, inyección, aplicación tópica o ingestión de quitosano en el cuerpo humano (Chatelet y col., 2001, citado por Cárcamo, 2005). Estas propiedades se deberían a que el quitosano está compuesto de unidades de $\beta(1\rightarrow4)$ -2-amino-2-desoxi-D-glucopiranos, Glucosamina y $\beta(1\rightarrow4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranos, N-acetilglucosamina, las que son constituyentes naturales de los tejidos de mamíferos (Khan y col., 2000, citado por Cárcamo, 2005).

2.4.6.5 Biodegradación.

Varios estudios han demostrado que la quitina y el quitosano son polímeros que se biodegradan in vivo debido a su susceptibilidad a la hidrólisis enzimática de los enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ mediada por lisosima, enzima omnipresente en el organismo humano. Sus productos de degradación son oligosacáridos o monosacáridos, metabolitos naturales que son luego absorbidos y pueden ser incorporados a las rutas metabólicas de glicosaminoglicanos o glicoaminoproteínas, o bien, excretados (Chatelet y col, 2001, citado por Cárcamo, 2005).

2.5 CICATRIZACIÓN DE LAS HERIDAS.

La cicatrización es un proceso dinámico que implica la interacción entre varios tipos celulares y una secuencia de eventos biológicos, físico-químicos continuos, iniciados en el momento del daño tisular, y que se suspenden poco después de completada la reparación de la herida (León, 1995).

2.5.1 Fases o periodos del proceso de cicatrización de heridas.

Independientemente del tipo de la herida de que se trate y de la extensión que abarque la pérdida de continuidad de tejido, cualquier curación de herida discurre en fases que se solapan en el tiempo y no pueden ser disociadas unas de otras. Por lo general la cicatrización se divide en tres etapas, con fines didácticos, pero en realidad ocurren simultáneamente (Hartmann, 1999).

2.5.1.1 La fase inflamatoria/exudativa.

La respuesta inflamatoria es una reacción secuencial a la lesión celular. La inflamación siempre está presente con la infección, pero la infección no siempre está presente con la inflamación (Alvaréz, 2004).

La fase inflamatoria / exudativa se inicia en el momento en que se produce la herida y su duración es aproximadamente de tres días, dependiendo de las condiciones fisiológicas. Las primeras reacciones vasculares y celulares consisten en la coagulación y la hemostasia y concluyen después de haber transcurrido aproximadamente 10 minutos (Hartmann, 1999).

Papel de las plaquetas.

Las plaquetas también expresan glicoproteínas en sus membranas celulares, lo que les permite adherirse una a otra y agregarse formando una masa. La fibrina y fibronectina se enlazan y forman un coágulo que atrapa proteínas y partículas y previene futuras pérdidas sanguíneas. Las células migratorias usan este coágulo como una matriz para avanzar a través de ella, y las plaquetas se adhieren a esta y secretan factores como citoquinas y factores de crecimiento que estimula a las células a acelerar su tasa de división celular. Eventualmente, el coágulo sufre lisis y es reemplazado por tejido de granulación y posteriormente por colágeno. Las plaquetas también secretan una serie de factores proinflamatorios como la serotonina, la bradiquinina, las prostaglandinas, las prostaciclina, el tromboxano y la histamina, los cuales incrementan la proliferación celular y la

migración al área y hacen que los vasos sanguíneos se vuelvan dilatados y porosos (Stadelmann y col, 1998).

Vasoconstricción y vasodilatación.

Inmediatamente después de que el vaso sanguíneo es roto, las células liberan factores inflamatorios como tromboxanos y prostaglandinas que hacen que el vaso entre en espasmo para prevenir la pérdida sanguínea y para concentrar células inflamatorias y factores en el área (Stadelmann y col, 1998). Esta vasoconstricción dura de 5 a 10 minutos y es seguida por vasodilatación, la cual es máxima alrededor de 20 minutos de haberse presentado la herida. La vasodilatación es resultante de factores liberados por las plaquetas y otras células. El principal factor involucrado en la vasodilatación es la histamina. La histamina hace que los vasos sanguíneos se vuelvan porosos, y haciendo que el tejido se ponga edematoso debido a que las proteínas del torrente sanguíneo se fugan al espacio extracelular e incrementan la carga osmótica que atrae agua dentro del área (Dealey, 1999).

Polimorfonucleares neutrófilos.

Alrededor de una hora de haberse presentado la herida, los polimorfonucleares neutrófilos (PMN), llegan a la herida y se convierten en las células predominantes en la misma durante los tres primeros días después del trauma. Son atraídos por la fibronectina, los factores de crecimiento y sustancias como neuropéptidos y cininas. Los neutrófilos fagocitan los detritus y las bacterias y también matan las bacterias por liberar radicales libres; limpian la herida por secretar proteasas que rompen el tejido dañado; usualmente sufren apoptosis una vez han completado sus tareas y son fagocitados y degradados por los macrófagos (Martin y Leibovich, 2005).

Macrófagos.

Los macrófagos son esenciales para la cicatrización (De la Torre y Sholar, 2006).

Reemplazan a los PMN en la herida dos días después del trauma. Son atraídos a la herida por factores de crecimiento liberados por las plaquetas y otras células (Dealey, 1999).

El principal papel del macrófago es fagocitar la bacteria y el tejido dañado, y también desbrida el tejido dañado por liberar proteasas. Los macrófagos también secretan un número de factores de crecimiento y otras citoquinas, especialmente durante el tercer y cuarto día luego del trauma. Estos factores atraen las células involucradas en la etapa de proliferación de la cicatrización de la herida (de la Torre y Sholar, 2006).

2.5.1.2 La fase proliferativa: Reconstitución de los tejidos granulares.

Es caracterizada por angiogénesis, depósito de colágeno, formación de tejido de granulación, epitelización y contracción de la herida. En la angiogénesis, nuevos vasos sanguíneos crecen a partir de las células endoteliales. En la formación de tejido de granulación y fibroplastia, los fibroblastos crecen y forman una nueva matriz extracelular por excretar colágeno y fibronectina, la cual es provisional. Alrededor de dos o tres días luego de que se presenta la herida, los fibroblastos empiezan a ingresar a la herida, incluso antes de que la fase inflamatoria haya terminado completamente (Álvarez, 2004).

Angiogénesis.

También llamada neovascularización. Ocurre al tiempo que los fibroblastos proliferan; las células endoteliales migran a la herida (Hartmann, 1999). Ya que la actividad de los fibroblastos y de las células epiteliales requiere oxígeno, la angiogénesis es imperativa para la cicatrización. El tejido en que la angiogénesis ha ocurrido luce típicamente rojo (eritematoso) debido a la presencia de capilares. Para la formación de nuevos vasos sanguíneos, las células endoteliales de los vasos sanguíneos lesionados desarrollan pseudópodos

(prolongaciones o falsos pies), y avanzan a través de la matriz extracelular a la herida (Álvarez, 2004).

La hipoxia estimula el crecimiento endotelial, así como la presencia de ácido láctico en la herida. En un ambiente bajo en oxígeno, los macrófagos y las plaquetas producen factores angiogénicos que atraen las células endoteliales quimiotácticamente. Cuando el ambiente hipóxico cede, estas células paran de producir factores angiogénicos. Así, cuando el tejido es adecuadamente perfundido, la migración y proliferación de las células endoteliales se reduce, y los vasos sanguíneos que no se requieren mueren por apoptosis (Álvarez, 2004) (Chiappe, 2004).

Fibroplasia y formación del tejido de granulación.

Simultáneamente con el tejido de granulación, los fibroblastos se acumulan en la herida; esto sucede, dos a cinco días luego de la herida y cuando la fase inflamatoria está finalizando y alcanza su mayor población una a dos semanas después de la herida. Al final de la primera semana, los fibroblastos son las células más comunes en la herida (Stadelman y col, 1998); la fibroplasia termina dos a cuatro semanas después de la herida. En los primeros dos días después del trauma, los fibroblastos proliferan y migran desde el tejido normal de los márgenes de la herida; después, se depositan en la matriz colágena en la herida (Lorenz y Longaker, 2003 citado por Alvarez, 2004).

Depósito de colágeno.

Una de las más importantes tareas de los fibroblastos es la producción de colágeno. Esta producción es notable por el segundo y tercer día pos herida, y es máxima en una a tres semanas. La producción de colágeno continua por dos a cuatro semanas y luego de este tiempo, su destrucción se incrementa cesando así su crecimiento (Greenhalgh, 1998 citado por Alvaréz, 2004).

El colágeno es el que incrementa la fuerza de la herida. Antes del depósito de colágeno, lo que sostiene la herida cerrada es el coágulo de fibrina-fibronectina que no da mucha resistencia al traumatismo (Hartmann, 1999).

Epitelización.

En la epitelización las células epiteliales avanzan lentamente a través del lecho de la herida para cubrirla. En la contracción, la herida se hace más pequeña por la acción de los miofibroblastos, los cuales establecen una fijación desde los bordes de la herida y los contraen usando un mecanismo similar al de las células musculares lisas. La fase de reepitelización sigue al tejido de granulación. A medida que las células epiteliales migran a través del nuevo tejido, forman una barrera entre la herida y el medio ambiente. Los queratinocitos basales de la piel del borde de la herida y los apéndices dérmicos como los folículos pilosos, las glándulas sudoríparas y sebáceas son los principales responsables de la fase de epitelización (Romo y Pearson, 2005 citado por Álvarez, 2004).

Contracción.

Alrededor de una semana luego de la herida, los fibroblastos se han diferenciado en miofibroblastos y la herida se comienza a contraer (Chiappe, 2004). El pico máximo de contracción se presenta a los 5 a 15 días de la herida y puede durar varias semanas; incluso, continúa aun cuando la herida ya esta re-epitelizada completamente. Si la contracción continua mucho tiempo puede llevar a desfiguramiento y pérdida de la función. La contracción ocurre para disminuir el tamaño de la herida. Puede disminuirlo en un 40 a 80% inclusive; pero la contracción no es simétrica; generalmente tienen un eje de contracción que permite una mayor organización y alineamiento de las células con el colágeno (Eichler y Carlson, 2005).

Inicialmente, la contracción ocurre con los fibroblastos; luego, estimulados por el factor de crecimiento se diferencian en miofibroblastos, los cuales, son

semejantes a las células del músculo liso e incluso contiene el mismo tipo de actina que el músculo liso y son totalmente responsables por la contracción (Chiappe, 2004).

2.5.1.3 La fase de diferenciación y de reconstitución: maduración.

Aproximadamente entre el 6º y el 10º día comienza la maduración de las fibras de colágeno. La herida se contrae, se reduce cada vez más la presencia vascular y de agua en el tejido granular, que gana en consistencia y se transforma finalmente en el tejido cicatricial. La epitelización cierra el proceso de curación de la herida. Este proceso incluye la reconstitución de las células epidermales a través de la mitosis y la migración celular, principalmente desde los bordes de la herida (Hartmann, 1999).

La fase de maduración puede durar un año o más, dependiendo del tamaño de la herida y si esta inicialmente fue cerrada o dejada abierta. Durante la maduración, el colágeno tipo III, que es prevalente durante la proliferación, se degrada gradualmente y a cambio se deposita colágeno tipo I, que es más fuerte (Dealey, 1999). Así, la fuerza tensil de la herida se incrementa a un 50% del tejido normal por los tres meses de la herida y al final alcanza una fuerza tensil hasta un 80% del tejido normal. Como la actividad se reduce, la cicatriz entonces, pierde su apariencia eritematosa ya que los vasos sanguíneos son removidos por apoptosis (Greenhalgh, 1998 citado por Álvarez, 2004).

2.5.2 Tipos de cicatrización.

La cicatrización de la herida se caracteriza a menudo en tres tipos de cierre o intenciones de cierre: primario, secundario y terciario. Según el tiempo transcurrido, desde la lesión, grado de contaminación y desvitalización tisular, esta clasificación dirige la elección del método de cierre (Fondon, 2009; Jiménez, 2010).

a. Primera intención.

El cierre primario es aconsejable en los cortes relativamente limpios con mínima contaminación y mínima pérdida o desvitalización tisular. Estas heridas están causadas con más frecuencia por fuerzas de corte. Pueden cerrarse con suturas, cintas adhesivas o grapas (Fondon, 2009).

La reparación de las heridas es óptima cuando se lleva a cabo en el plazo de 6 a 8 horas (denominado con frecuencia el “periodo de oro”) desde la lesión. En la práctica este periodo puede variar entre 6 y 24 horas según la región corporal, grado de contaminación y grado de desvitalización tisular. El riesgo de infección en la mano o el pie aumenta significativamente después de 4 a 6 horas, mientras que las heridas faciales no complicadas pueden diferirse de 24 a 36 horas, después de la lesión. Por lo que podemos decir que toda herida que pueda convertirse en una herida con aspecto reciente hemorragia leve, no desvitalizada, sin contaminación o restos de visibles tras una limpieza, lavado y desbridamiento agresivo es candidada al cierre primario (Fondon, 2009; chiappe, 2004).

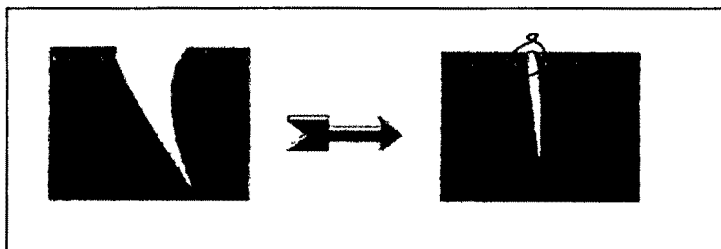


Figura Nº 3: Cierre de la herida por primera intención.

Fuente: Jiménez y César, 2010.

b. Cierre secundario.

Lesiones profundas en las que la extensión del tejido perdido es demasiado grande como para que los bordes se puedan aproximar o cicatrice de manera espontánea. Requiere la formación de una nueva matriz del tejido conectivo que reemplace el original y rellene el espacio que este ocupaba. Este tipo de cierre

es aconsejable en heridas que cursan con alguna complicación, como infección, compresión de los bordes y en heridas como úlceras cutáneas, mordeduras de animales pequeños sin relevancia estética, ya que cicatrizan mejor por segunda intención (Fondon, 2009).

No se cierran con suturas y se permite su cicatrización gradual por granulación y finalmente epitelización. Después de un tratamiento apropiado de la herida, pueden convertirse en candidatas a cobertura cutánea diferida, si es necesario con injertos (Larez, 2006).

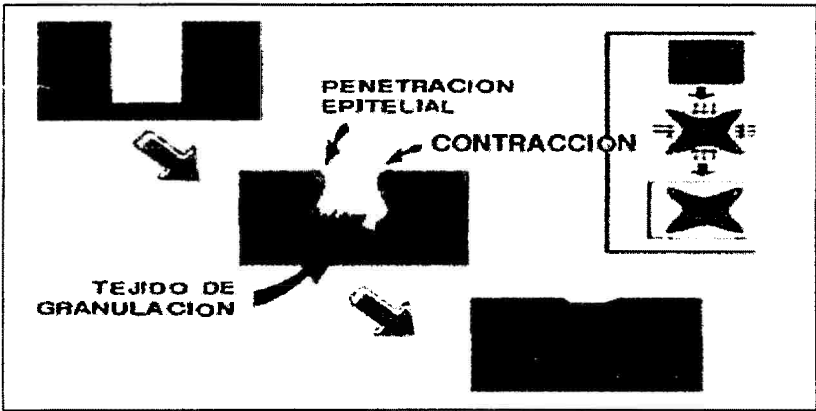


Figura Nº 4: Cierre de la herida por segunda intención.

Fuente: Jiménez y César, 2010.

c. Cierre terciario (cierre primario diferido).

Ciertas heridas son candidatas al cierre tras limpieza, desbridamiento y observación durante 4 a 6 días, se trata de heridas demasiado contaminadas para un cierre primario, pero lo que no presentan una pérdida o desvitalización tisular relevante las heridas de este tipo suelen ser antiguas con contaminación excesiva por tierra, heces, saliva o secreciones vaginales, causadas por mordedura de animal o humano o como consecuencia de proyectiles de alta velocidad, como las balas. Las heridas creadas tras la exploración para localizar y extraer cuerpos extraños también son candidatas (Fondon, 2009) (Jiménez y César, 2010).

2.6. DIAGNÓSTICO DE LA CICATRIZ.

Una cicatriz puede ser de origen quirúrgico como de origen traumático o inflamatorio, grande o pequeña, reciente o de los primeros días de la vida, externa o interna, molesta o no (Arquero, 2007).

El tejido de la cicatriz funciona de modo diferente a como funciona el tejido normal. La condición eléctrica del tejido cicatrizal es diferente a la del tejido normal. Por los tejidos normales la información circula constantemente sin interrupción. De ese modo el sistema nervioso sabe qué es lo que está ocurriendo en cada instante y en cada lugar del organismo y a su vez puede responder manteniendo a todo el sistema en un equilibrio saludable (Koval, 2007). Muchas veces un dolor o un trastorno funcional que apareció después de una cirugía o de un accidente y que persiste meses o años se resuelven con el correcto tratamiento de la cicatriz (Arquero, 2007).

2.7. TRATAMIENTO DE LA CICATRIZ.

Existen varios tratamientos para cicatrices pigmentadas desde medicamentos que pueden adquirir en la farmacia hasta tratamientos clínicos. La medicina para la autoorganización mediante la inyección de lidocaína en los sitios adecuados puede restablecer el funcionamiento normal del tejido cicatrizal. Este medicamento inyectado localmente normaliza la actividad eléctrica de la cicatriz integrándola al resto de los tejidos y permitiendo el flujo normal de información. (Koval, 2007).

Cuando existen muchas cicatrices se recomiendan exfoliaciones químicas (peels químicos). Estas exfoliaciones pueden ser hechas con varios productos entre ellos ácido glicólico. Dependiendo de la intensidad pueden ser hechas por un dermatólogo o una esteticista. Las esteticistas pueden hacer exfoliaciones usando concentraciones hasta de un 35% los dermatólogos usan hasta un 70%.

Entre más alta la concentración del ácido glicólico más potente es la exfoliación.
(Koval, 2007)

2.7.1 Fármacos que favorece la cicatrización.

Cicatrin®

Esta preparación contiene dos ingredientes activos, Sulfato de Neomicina 3300 unidades y 250 unidades de Bacitracina de Zinc en cada gramo, además contiene L-Cisteína 2 mg, Glicina 10 mg-dl y Threonina 1 mg (Díaz, 2007).

2.7.1.1 Bacitracina.

Es un antibiótico polipeptídico con actividad bactericida, principalmente contra organismos grampositivos. Se usa en forma tópica, de una a cinco veces al día. La bacitracina se usa principalmente para prevenir o tratar infecciones superficiales de la piel (Uriarte y Trejo, 2003).

Mecanismo de acción.

Este fármaco es una mezcla de polipéptidos derivados del *Bacillus subtilis*. Inhibe el crecimiento bacteriano previniendo la formación de cadenas de los peptidoglucanos necesarios para la síntesis de la pared bacteriana, lo que altera su permeabilidad de membrana y causa lisis bacteriana. (Uriarte y Trejo, 2003).

2.7.1.2 Sulfato de neomicina.

Sal sulfato de sustancias antibióticas producidas por *Streptomyces fradiae* (familia Streptomycetaceae). La neomicina consiste casi enteramente en un par de efímeros $C_{23}H_{46}N_6O_{13}$ designados con los nombres neomicina B y neomicina C. La neomicina se utiliza como antibiótico tópico en una amplia variedad de infecciones locales causadas por bacterias gramnegativas aerobias comunes de la familia Enterobacteriaceae y algunos cocos grampositivos, como dermatosis, quemaduras, heridas o úlceras infectadas; impétigo, furunculosis. En general se

combina con otros antibióticos sobre todo el sulfato de polimixina B, la Bacitracina cinc y la gramicidina (Gennaro, 2003).

Mecanismo de acción

La neomicina es bactericida, actúa inhibiendo la síntesis de proteínas uniéndose a la subunidad 30s del ARN ribosomal de la bacteria, produciendo con ello una lectura equivocada del código genético bacteriano (Díaz, 2007).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 UBICACIÓN.

El presente trabajo de investigación se realizó en los ambientes del Laboratorio de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de enero a junio del 2010.

3.2 MATERIALES.

3.2.1 Muestra biológica.

5 g de quitosano extraído de exoesqueletos de *Cancer spp.*, “cangrejos”, provenientes del terminal pesquero de Pisco, recolectados en el Mercado F. Vivanco de la provincia de Huamanga, Departamento de Ayacucho. La extracción e identificación del quitosano se realizó en los Laboratorios de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Departamento de Ayacucho.

3.3 DISEÑO METODOLÓGICO.

3.3.1 Procedimiento para la obtención de quitina.

a. Acondicionamiento.

Se adquirió los cangrejos del mercado Carlos F. Vivanco de la ciudad de Huamanga, provenientes del terminal pesquero de Pisco. Los exoesqueletos de los cangrejos fueron lavados minuciosamente con abundante agua y

desprovistos de toda materia orgánica presente. Posteriormente se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5%, se enjuagaron y se llevaron a secar en una estufa por 48 horas a 50°C hasta obtener peso constante. Posteriormente se procedió a reducir su tamaño de partícula con ayuda de un molino manual, el polvo resultante se almacenó en un frasco color ámbar cerrado herméticamente.

b. Desmineralización.

El polvo obtenido fue sometido al proceso de desmineralización para lo cual se pesó 200 g y se incorporó a un balón de 10 L, adicionando lentamente 6L de ácido clorhídrico 2N, para evitar pérdida de muestra por efervescencia. Pasado 1 hora se agitó constantemente a temperatura ambiente por dos horas. (Fernández, 2004) (Parada, 2004). Se dejó en reposo por espacio de 24 horas, se decantó y procedió al lavado de muestra con abundante agua hasta neutralidad, luego se procedió a secar en una estufa por 12 horas a 50°C.

c. Desproteínización.

La muestra obtenida del proceso anterior fue sometida a desproteínización con 2L de hidróxido de sodio 2N, primero a temperatura ambiente durante 24 horas y luego a 60°C en baño maría por espacio de 4 horas con agitación constante. Inmediatamente se lavó la muestra con abundante agua hasta neutralidad, luego se enjuagó con alcohol y finalmente se llevó a secar por 12 horas en una estufa a 50°C.

d. Decoloración.

Finalmente la muestra obtenida se sometió a decoloración adicionando 500 mL de agua destilada y se llevó a baño maría por 15 minutos, luego a esto se agregó 500 mg de permanganato de potasio y se mantuvo en calentamiento por 10 minutos más, seguidamente se adicionó 2g de ácido oxálico con agitación constante hasta total decoloración, se dejó enfriar la muestra y se lavó hasta

neutralidad. Finalmente secado en una estufa con flujo de aire a 60°C por 12 horas. El producto resultante es la quitina (Fotografía N°3).

3.3.2 Procedimiento para la obtención de quitosano.

Para lograr extraer quitosano se sometió la quitina obtenida al proceso de desacetilación, para lo cual se pesó **22 g** de quitina y se colocó en un equipo de reflujo con 500 mL de hidróxido de sodio al 75% y a 110 +/- 5°C de temperatura con agitación constante durante cuatro horas. Luego se filtró la muestra para ser lavado con abundante agua hasta neutralidad y finalmente se secó en una estufa a 60°C durante **24 horas** para así obtener el quitosano (Fotografía N°5).

3.3.3 Identificación y valoración del quitosano.

3.3.3.1 Solubilidad.

Se identificó el quitosano cualitativamente haciendo uso de los ensayos de solubilidad que consistió en: distribuir en 5 tubos de ensayo 100 mg de quitosano al que se añadió 5 mL del solvente respectivo (agua, etanol, ácido acético, ácido oxálico y ácido clorhídrico), se homogenizó y dejó en reposo por 24 horas, observándose los resultados transcurrido ese tiempo.

3.3.3.2 Determinación del grado de desacetilación (dga).

El grado de desacetilación fue determinado por valoración titulométrica de los grupos aminos mediante el siguiente procedimiento:

Se disolvió 0,1g de quitosano en 20 mL de ácido clorhídrico 0,3M. Luego se tituló con una solución de hidróxido de sodio 0,1M, lentamente y con agitación constante para lograr una homogenización adecuada y evitar errores por precipitación del polímero. La valoración se realizó por triplicado.

La diferencia entre los dos puntos de inflexión en la curva de titulación corresponde a la cantidad de ácido requerido para protonar los grupos amino del quitosano, la concentración de estos se determina utilizando la siguiente fórmula (Parada, 2004).

$$\%NH_2 = \frac{16,1 (Y-X)F}{W}$$

Donde:

“Y” = Punto de inflexión mayor (expresado en mL).

“X” = Punto de inflexión menor (expresado en mL).

“F” = Molaridad de la solución de NaOH.

“W” = Peso de la muestra en gramos.

16,1 = valor relacionado con el peso equivalente del quitosano.

3.3.3.3 Preparación de la solución de quitosano.

Se prepararon soluciones de quitosano con ácido acético al 1% de las siguientes concentraciones: 0,5%, 1,0%, 3,0% y 5,0%. Estas soluciones de quitosano se neutralizaron con gotas de hidróxido de sodio 1N, homogenizando hasta obtener un pH cercano al de la piel (pH=6.5).

Una vez preparadas las soluciones a diferentes concentraciones de quitosano, se procedió a envasar en frascos de 10mL de color ámbar y luego fueron rotulados.

3.3.4 Determinación de la actividad cicatrizante del quitosano por método de la fuerza de tensión (Método de Howes y col).

Fundamento:

El método de la Fuerza de Tensión mide la fuerza necesaria para abrir una herida incisa de 1 cm de largo, realizada en el tercio anterior del lomo y perpendicular al eje longitudinal de una rata.

- **Ambientación o acondicionamiento.**

Primero se obtuvieron las 35 ratas Holtzman hembras de 3 meses de nacidas del Bioterio de la Universidad Nacional Agraria la Molina, las cuales fueron distribuidas al azar en 7 grupos de 5 ratas cada grupo y colocadas en jaulas

individuales. Se mantuvieron en observación por un periodo de un mes, verificándose la condición óptima de las ratas para el estudio. Para ello se les acondicionó un espacio en el bioterio de la E.F.P. de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. (Fotografía N° 7)

- **Depilación.**

Después de un mes de ambientación las ratas Holtzman al lugar de trabajo, se procedió a depilarlos con crema depilatoria Veet® en el primer tercio dorsal anterior en un área aproximada de 2 cm². La depilación se realizó previa humectación de la zona a depilar, luego se agregó la crema depilatoria Veet® la cual se dejó actuar por 3 minutos para ejercer su efecto. Finalmente con ayuda de una gasa y chorro de agua se retiró la crema. Posteriormente a la depilación, las ratas se colocaron en sus respectivas jaulas individuales provistas de bebida y comida. La depilación se realizó 24 horas antes del procedimiento quirúrgico a fin de descartar cualquier reacción alérgica a la crema depilatoria.

- **Incisiones y sutura.**

Después de 24 horas de la depilación, se procedió a anestesiarse a las ratas, administrándoles una dosis de 50 mg/Kg de halatal (Pentobarbital Sódico de uso veterinario), vía subcutánea (tercio superior del lomo). Se colocó la rata sobre el área de trabajo desinfectado. Se marcó 2 puntos equidistantes en 1 cm en el lomo depilado perpendicular al eje longitudinal de la rata. Se realizó el corte con ayuda de un bisturí, se unieron los bordes con un punto de sutura (cicatrización de primera intención) con hilo en la parte central del corte. (Fotografía N° 8)

- **Aplicación.**

Obtenido el punto de sutura, se administró en forma tópica la primera dosis del tratamiento sobre la incisión con la ayuda de un hisopo, logrando obtener una distribución homogénea. Se aplicaron según:

Cuadro Nº 2 Distribución de los grupos experimentales.

Método	Grupos experimentales						
	% de quitosano en solución				Control		Blanco
	0.5%	1.0%	3.0%	5.0%	Acido acético 2% (pH≈6.5)	Cicatrin®	
Tensiométrico	5	5	5	5	5	5	5
Total de ratas	5	5	5	5	5	5	5

Las aplicaron las soluciones de quitosano, el ácido acético 2% (pH≈6.5) y el Cicatrin® en sus respectivos grupos, mientras que el blanco no recibió tratamiento. Se repitió el tratamiento cada 12 horas en un lapso de 72 horas. (Fotografía Nº 9).

- **Determinación de la fuerza de tensión.**

Pasadas las 72 horas de tratamiento, se procedió a realizar la medición de la fuerza de tensión en el equipo de tensión. (Fotografía Nº 11) Para ello las ratas Holtzman, fueron previamente anestesiadas con una dosis de 100 mg/Kg de Halatal (Pentobarbital Sódico), vía intraperitoneal. Luego se colocaron en el área de trabajo y se procedió a marcar los puntos donde se engancharan las agujas del equipo de tensión, a 0.5 cm de ambos extremos del punto de sutura. Se retiró con mucho cuidado el punto de sutura y colocó al animal en posición de cúbito ventral sobre el aparato de tensión, luego se insertó las agujas. Enseguida se abrió la bureta para dejar caer el agua hasta que se generó la fuerza de tensión capaz de abrir la herida en toda su longitud, finalmente se anotó el nivel de agua requerido. (Fotografía Nº 10)

Usando los datos obtenidos por el Método de Fuerza de Tensión según Howes y col, se determinó el porcentaje de efecto cicatrizante utilizando la siguiente fórmula:

(%) Eficacia de Cicatrización	=	$\frac{(\text{gramos necesarios para abrir la cicatriz tratada}) \times 100}{(\text{gramos necesarios para abrir la piel intacta})}$
-------------------------------	---	--

Fuente: Vaisberg y col., 1929 citado por Fabiola y col., 2005.

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para el análisis estadístico se procesaron en cuadros mediante el análisis de varianza (ANOVA). Los cuales fueron elaborados utilizando los resultados experimentales obtenidos en la presente investigación con un nivel de confianza de un 95%. Para esto se usó el programa SPSS 15.0.

IV. RESULTADOS

Cuadro N° 3. Rendimiento del quitosano obtenido por método químico a partir de los exoesqueletos de *Cancer spp.* “cangrejos” Ayacucho, 2010.

Masa de exoesqueleto de cangrejo	Quitina	Quitosano	Porcentaje de quitosano	Porcentaje en relación a la quitina
100 g	11,54	7,46	7,46%	64,64%

Cuadro N° 4. Ensayo de solubilidad para identificación del quitosano, Ayacucho – 2010.

Muestra	Solventes	Resultados
100 mg de quitosano	agua	-
100 mg de quitosano	etanol 96°	-
100 mg de quitosano	ácido acético 2%	+++
100 mg de quitosano	ácido oxálico 2%	++
100 mg de quitosano	ácido clorhídrico 2%	++

Leyenda: (+++) Soluble, (++) Medianamente soluble, (-) Insoluble



Fotografía 1: Prueba de identificación cualitativa del quitosano frente a ácido acético 2% (formación de gel).

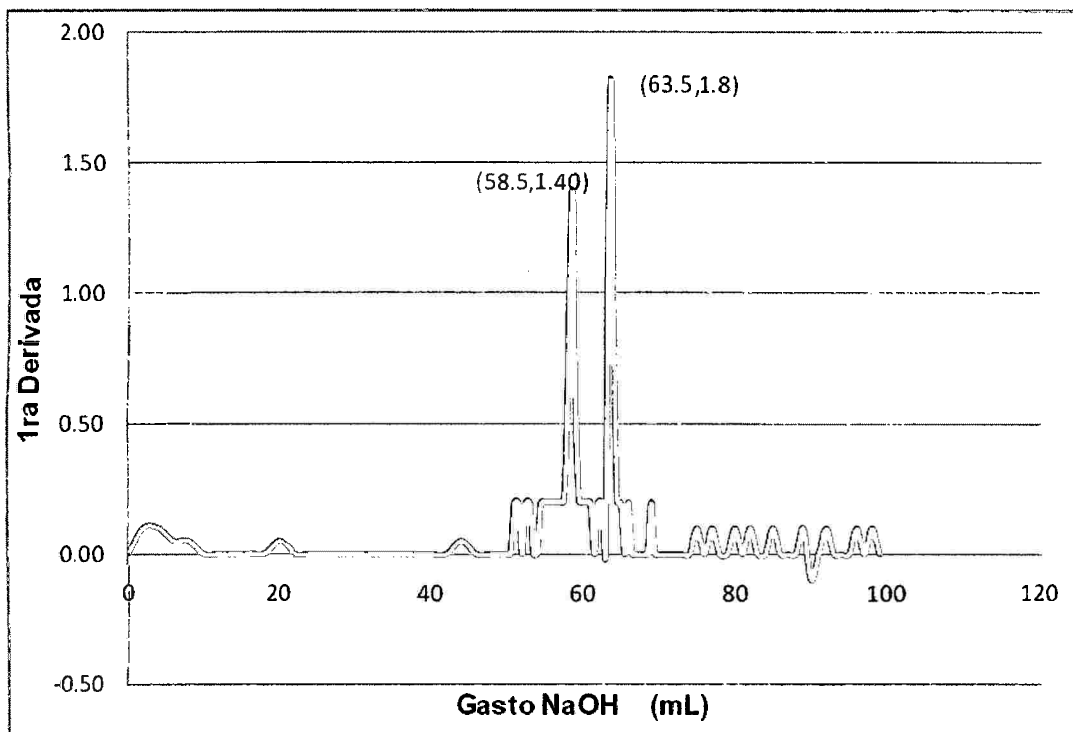


Gráfico 1. Primer derivada de la valoración potenciométrica de la muestra 1 de quitosano extraído de los exoesqueletos de *Cancer spp.* “cangrejo” en función al volumen de hidróxido de sodio. Ayacucho, 2010.

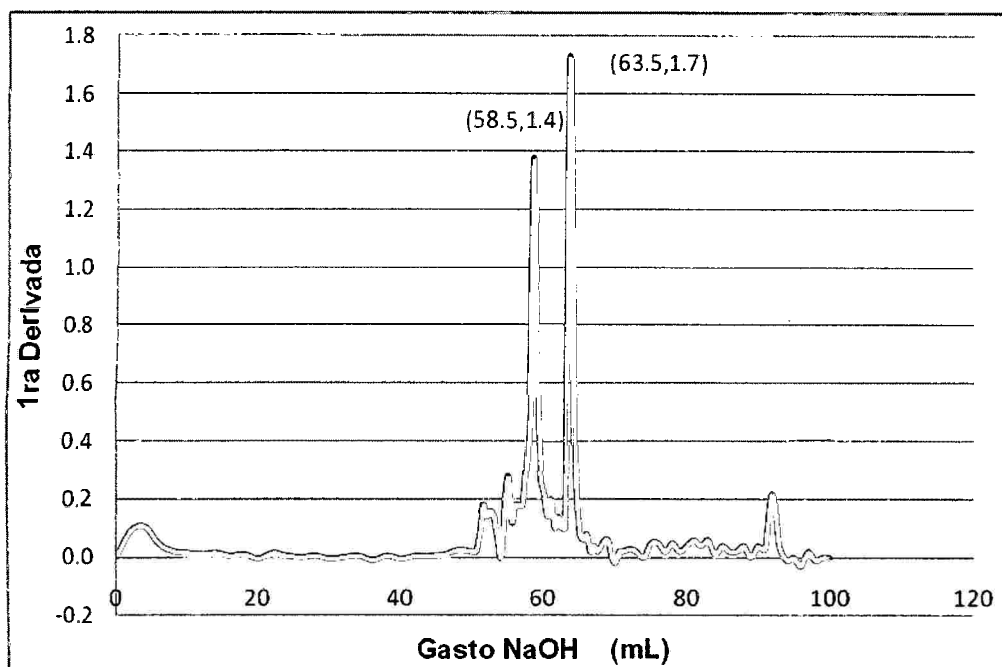


Gráfico 2. Primera derivada de la valoración potenciométrica de la muestra 2 de quitosano extraído de los exoesqueletos de *Cancer spp.* "cangrejo" en función al volumen de hidróxido de sodio. Ayacucho, 2010.

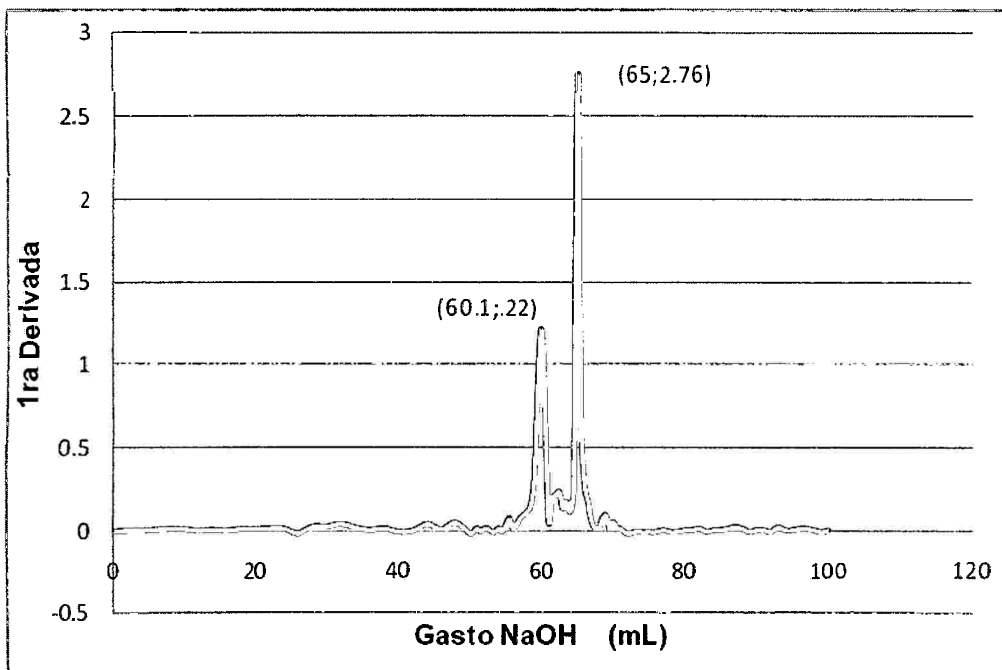


Gráfico 3. Primera derivada de la valoración potenciométrica de la muestra 3 de quitosano extraído de los exoesqueletos de *Cancer spp.* "cangrejo" en función al volumen de hidróxido de sodio. Ayacucho, 2010.

Cuadro 5. Porcentajes de desacetilación y puntos de inflexión de las diferentes muestras de quitosano valorados potenciométricamente. Ayacucho - 2010.

Muestra	Factor	P.I * Mayor (mL)	P.I * Menor (mL)	Peso Muestra (g)	Porcentaje de desacetilación (%)
Muestra 1	0,096	63,5	58,5	0,1012	76,36
Muestra 2	0,096	63,5	58	0,1091	77,92
Muestra 3	0,096	65	60	0,1002	77,13
Promedio					77,14

Fuente:(*) punto de inflexión.

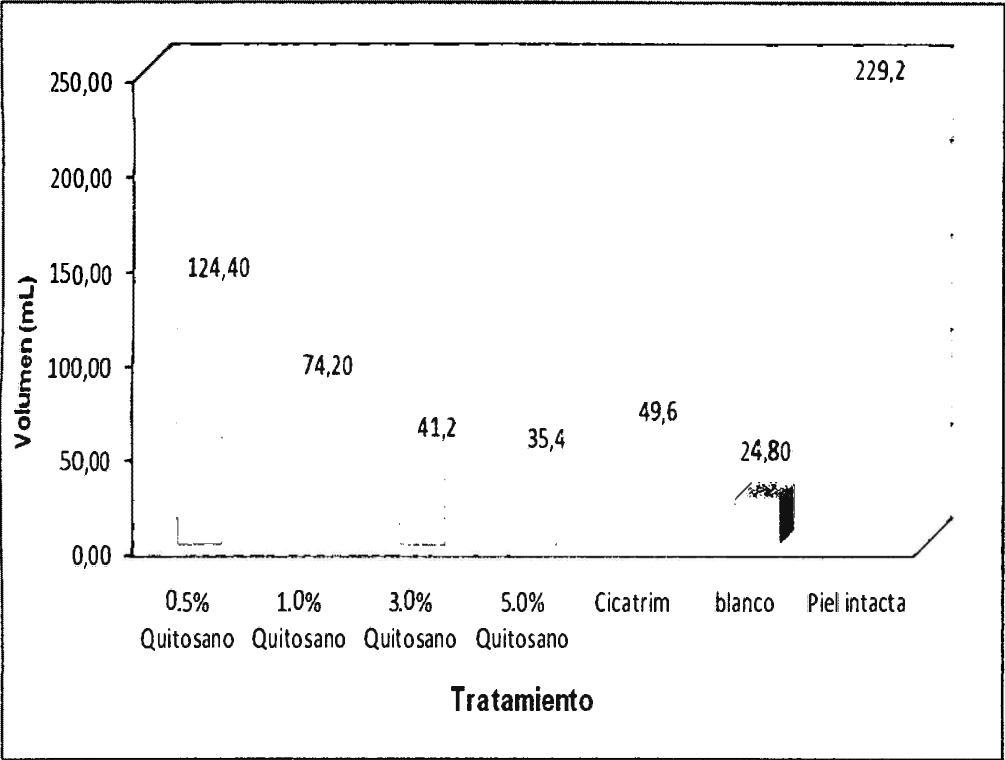


Gráfico 4. Volumen promedio en mL de la fuerza de tensión al determinar la actividad cicatrizante del quitosano extraído del exoesqueleto de *Cancer spp.* “cangrejo”. Ayacucho, 2010.

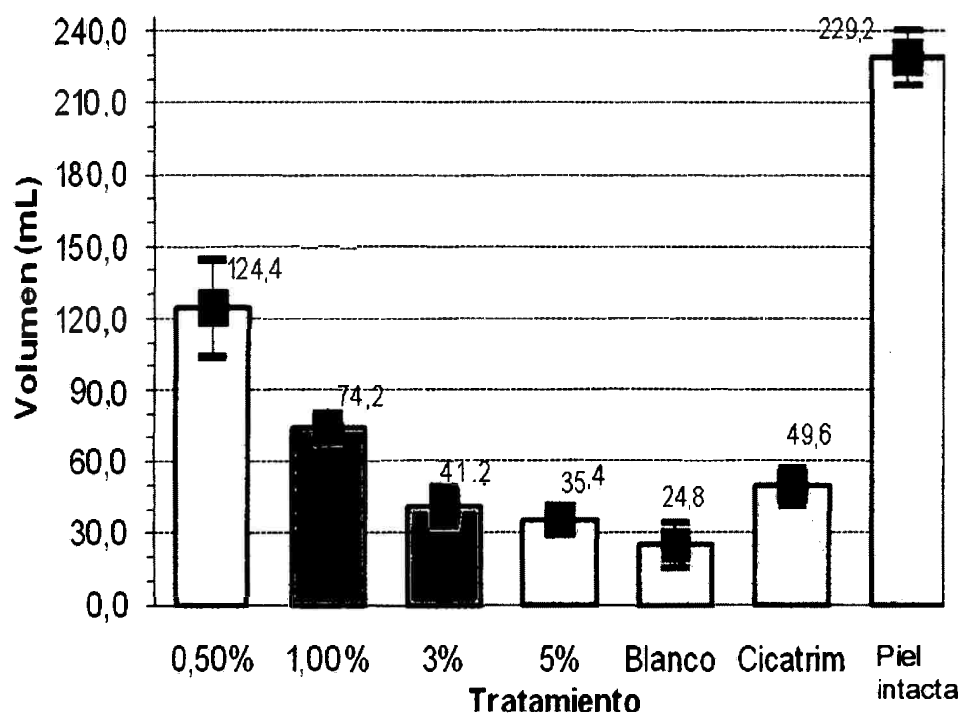


Gráfico 5. Variación del promedio en mL de la fuerza de tensión al determinar la actividad cicatrizante del quitosano extraído del exoesqueleto de *Cancer spp.* “cangrejo”. Ayacucho, 2010.

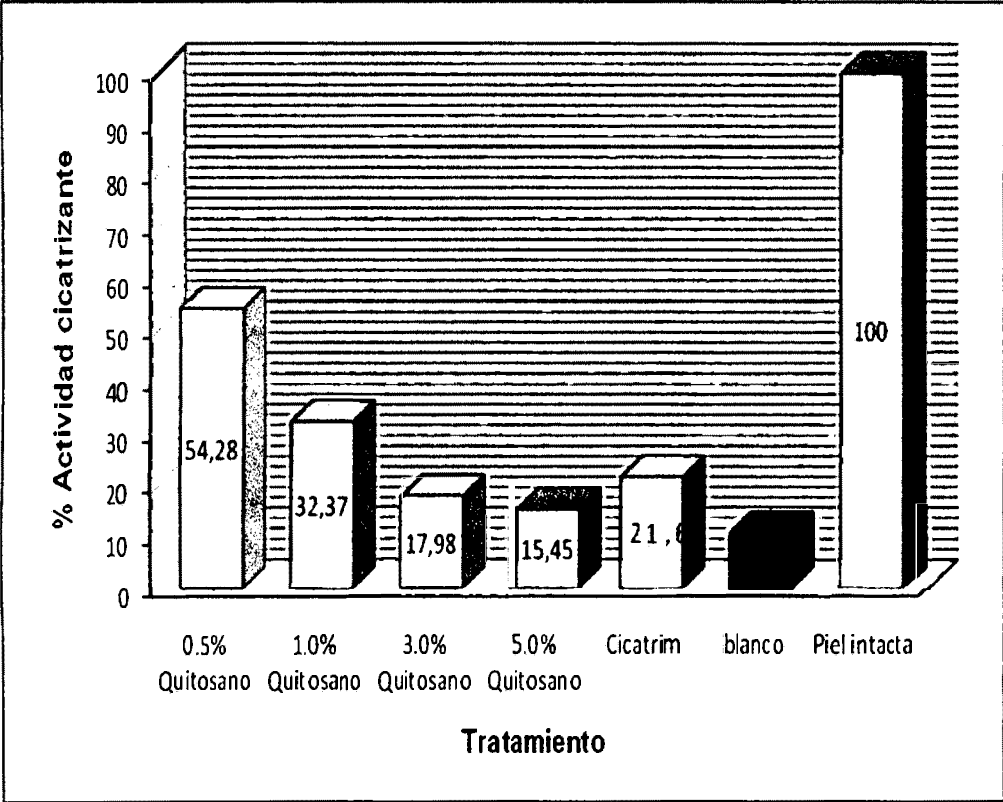


Gráfico 6. Porcentaje promedio de la actividad cicatrizante del quitosano extraído del exoesqueleto de *Cancer spp.* “cangrejo” en ratas Holtzman. ($p<0.05$). Ayacucho, 2010.

V. DISCUSIÓN

La industria latinoamericana genera grandes cantidades de desechos de crustaceos en sus plantas procesadoras, lo que constituye un contaminante rico en proteína y quitina, que puede ser valorizado si se diseña y aplica un método de extracción de estos componentes de los caparazones para su posterior utilización en diversas esferas de actividad (Castro, 2000).

Como paso previo a la caracterización del quitosano y su disolución en varias concentraciones, se efectuó el aislamiento de la quitina a partir de los caparazones de *Cancer spp.* "cangrejo" y obtención de quitosano a partir de ella. Los exoesqueletos fueron recogidos en la provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho (anexo N° 01).

En la obtención del quitosano (fotografía 5), por el método químico, se obtuvo un rendimiento global de 7,76% a partir la muestra y 64,70% con respecto a la quitina (cuadro N° 03) rendimiento mayor comparado al 51,94% obtenido según Hernández y col. (2009) de la obtención de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón, así como el 60% obtenido por Lárez (2006) en México. Sin embargo, resulta muy difícil desacetilar totalmente la quitina, y lo que usualmente se conoce como quitosano es una familia de quitinas con diferente grado de desacetilación, generalmente superior a 45%. La capacidad del quitosano de

disolverse en soluciones acuosas diluidas de ácidos orgánicos es el criterio comúnmente aceptado para diferenciarla de la quitina (Peniche, 2006).

La caracterización del quitosano se realizó por la prueba de solubilidad (Fotografía 1), la misma que nos permite confirmar las características propias del quitosano. En este ensayo (Cuadro N° 4) se observó que el quitosano es insoluble en agua pero presenta solubilidad en ácidos orgánicos (ácido acético, ácido oxálico) y ligeramente soluble en ácido inorgánico (ácido clorhídrico) debido a la protonación de los grupos aminos ($-NH_2$) en amonio ($-NH_3^+$) (Vilchez, 2005). Es insoluble a pH alcalino y neutro, siendo soluble sólo en ácidos, sobre todo en ácidos orgánicos, presentando solubilidad limitada en ácidos inorgánicos (Upadrasta, 1992).

En el gráfico 1, 2 y 3, se muestra la curva de titulación potenciométrica de las muestras de quitosano. El método consiste en exponer el quitosano a un exceso de disolución de ácido clorhídrico, ocurriendo la protonación del grupo amino libre del quitosano, valorando después esta disolución con hidróxido de sodio (Suárez y col, 2008). Donde se produce una curva de titulación con dos puntos de inflexión cuyos valores se determinaron según el criterio de la primera derivada (Anexo 7, 8 y 9). Observándose que la proporción de los grupos aminos libres corresponde a las especificaciones del quitosano que lo nombran así a partir de una desacetilación mayores al 50% (Lárez, 2006). Obteniéndose un porcentaje promedio de desacetilación de 77,14% (Cuadro 5); Parada (2004) obtuvo un 80,37% de desacetilación de quitosano obtenido a partir de camarones también Lárez (2006) obtuvo quitosano con un grado de desacetilación del 60%. A pesar de la diversidad de métodos reportados para la determinación del grado de N-acetilación del quitosano, la potenciometría continua siendo uno de los métodos más simples, rápido y de bajo costo,

requiriendo equipamiento y reactivos fácilmente disponibles en cualquier laboratorio (Suárez y col, 2008).

Para la preparación de las soluciones de quitosano de 0.5%, 1.0% y 3.0% y 5% se utilizó ácido acético al 2% corrigiéndose el pH a 6,5 aproximadamente con NaOH.

El cuadro Nº 9, representa los volúmenes de la fuerza de tensión al determinar la actividad cicatrizante del quitosano a concentraciones 0,5%, 1,0%, 3,0% y 5,0%. Teniendo como grupo control: Cicatrin® y un grupo con piel intacta y finalmente el grupo blanco tratados con la solución de ácido acético 2% (pH≈6.5). Como se observa en el cuadro, el gasto de mayor volumen de agua para la prueba de la fuerza de tensión fue del grupo de piel intacta seguidos por 0,5%, 1,0%, Cicatrin®, 3,0%, 5,0% y ácido acético respectivamente. Este efecto podría deberse a la capacidad del quitosano de enlazarse agresivamente a una gran variedad de células, propiedad de enlazado con las membranas celulares, parece estar relacionada con la naturaleza cationica de la estructura de éste polielectrolito (Hernández y col, 2009). A pH ácido, es un polielectrolito lineal con gran densidad de carga (una carga positiva por cada residuo de $\beta(1\rightarrow4)$ -2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa, Glucosamina), por lo que interactúa con moléculas cargadas negativamente, incluidas proteínas, polisacáridos aniónicos y ácidos nucleicos, muchos presentes en la superficie de la piel, confiriendo propiedades de bioadhesión (Lloyd, 1998, citado por Cárcamo, 2005). El quitosano permite el crecimiento de los fibroblastos, tipo de células que constituyen parte fundamental de la estructura de soporte de tejidos y órganos, evitando la necesidad de un posterior injerto de epidermis (Cárdenas, 2006).

En el gráfico 5 ($p<0.05$:significativo) se observa la variación del volumen en mL de la fuerza de tensión por lo que podemos afirmar que: por lo menos un

promedio del porcentaje del efecto cicatrizante es diferente del resto. El cual esta corroborado por el cuadro N° 11.

El gráfico 6 representa el porcentaje promedio de la actividad cicatrizante en relación a la piel intacta. Se ve claramente que a 0,5% de quitosano posee 54,28% de actividad cicatrizante. Esto se debe que en disolución, los grupos amino del polímero se protonan dando como resultado un polisacárido soluble cargado positivamente ($R-NH_3^+$) y como tal se enlaza a las membranas celulares, para cumplir la actividad cicatrizante. La solubilidad también se encuentra influenciada por la adición del quitosano a la solución, viéndose que al aumentar la fuerza iónica del medio, menor es la solubilidad. Esto se debe, a que el quitosano en solución, tiene una conformación extendida al repelerse las cargas (+) desacetiladas de cada unidad, de las unidades de glucosamina vecinas. Al adicionar electrolitos se reduce este efecto, dando una conformación en espiral al azar (Upadrasa, 1992). A 5,0% la actividad cicatrizante es menor. Esto se debe a que el quitosano se encuentra saturado y su carga positiva es en menor proporción y por lo tanto no hay un buen enlace con las membranas celulares.

Del cuadro 11, del resultado de la prueba de Duncan de las comparaciones múltiples de la fuerza de tensión al determinar la actividad cicatrizante del quitosano extraído del exoesqueleto de *Cancer spp.* "cangrejo" en ratas Holtzman; administrados en sus distintas concentraciones, se refiere que los grupos son similares entre sí; mas los grupos de 3,0% y 5,0% se aproximan más al grupo blanco, los grupos 1,0%, 0,5% y el grupo de piel intacta son entre sí diferentes en comparación a los grupos mencionados.

En el análisis de varianza de los valores descriptivos del volumen promedio del agua por la actividad cicatrizante como resultado de la fuerza de tensión en "ratas" Holtzman tratadas con las soluciones de quitosano, compara las medias

de los 7 grupos experimentales definidos por las diferentes concentraciones de quitosano, obteniéndose un $p < 6,49 \times 10^{-11}$; con lo cual podemos afirmar que hay diferencia significativa entre las medias de los grupos tratados a diferentes concentraciones de quitosano (Cuadro N° 13).

En el cuadro 12 se demuestra estadísticamente que todas las concentraciones de quitosano poseen actividad cicatrizante. La administración a una concentración de 0,5% de quitosano posee mayor actividad cicatrizante en comparación del grupo control (Cicatrín®). Este fármaco inhibe la síntesis de proteínas en las células bacterianas y por consiguiente lisis celular (Gennaro, 2003). La actividad antimicrobiana del quitosano puede deberse a la interacción electrostática entre los grupos amino del quitosano y los sitios aniónicos de las paredes celulares bacterianas con restos de ácidos carboxílicos y fosfolípidos. En el caso de *E. coli*, la acción bactericida del quitosano se explica por la unión de los policationes del polímero con los aniones de la superficie bacteriana, alterando la permeabilidad de la membrana de la glucosa y lactato deshidrogenasa (Upadrasta, 1992).

Estadísticamente se observó que los niveles de resistencia a la tensión alcanzados con todos los tratamientos de quitosano, presentan una diferencia significativa al ser comparados con el tejido no tratado.

VI. CONCLUSIONES

1. Las soluciones del quitosano administrados tópicamente en las heridas de las ratas Holtzman por un periodo de 72 horas presentan actividad cicatrizante externo, a las concentraciones de 0,5% con una eficacia 54,28% respecto a la piel sana seguido por la concentración 1,0% con 32,37, la concentración a 3,0% con 17,98% y por la concentración de 5,0% con 15,45%.
2. Mediante una técnica ya elaborada se logró obtener satisfactoriamente el quitosano con una desacetilación de 77,14%. el cual se caracteriza por ser altamente soluble en ácidos orgánicos.
3. La concentración de quitosano que presenta mayor actividad cicatrizante es a 0,5% con una eficacia de 54,28% respecto a la piel intacta.
4. El estudio demuestra que el quitosano presenta mayor actividad cicatrizante en relación al control (Cicatrín®); 54,28% a 21,64% de actividad cicatrizante con respecto a la piel intacta.

VII. RECOMENDACIÓN

1. Promover el estudio de su adecuada obtención y sus derivados para direccionar usos en enfermedades dermatológicas.
2. Realizar estudios de investigación para formulación de un producto farmacéutico de aplicación tópica.
3. Medir el nivel de toxicidad del extracto de quitosano a diferentes concentraciones.
4. Realizar estudios sobre las propiedades beneficiosas del quitosano.
5. Evaluar la estabilidad del quitosano obtenido haciendo uso de equipos adecuados como la cromatografía líquida de alta performance (HPLC) y espectro infrarrojo.
6. Continuar con el estudio y evaluación de la actividad cicatrizante de quitosano obtenido dando otras formas de de aplicación tópica como, laminas o films de quitosano, geles de quitosano, etc.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Acosta, N. 1993.** Extracción and characterization of chitin from crustaceans. *Biomass and Bioenergy*. Vol. 5. Cuba.
2. **Alvarez, H. 2004.** Etapas de la cicatrización. Escuela Universitaria de Enfermería. Universidad de Barcelona. Madrid. España.
3. **Arquero, P. 2007.** Tratamiento de las Cicatrices Madrid España. URL: http://www.clinicaarquero.com/04_cicatrices.htm.
4. **Austin, P. 1981.** Chitin: new facets of research. *Science*. 212(4496). México.
5. **Argüelles, W. 1988.** Química Aplicada. Aprovechamiento integral de los desechos de langosta. Universidad de la Habana Facultad de Química. Cuba. Tomo II.
6. **Bianco, I. Balsinde, J. Beltramo, D. 2000.** Chitosan-induced phospholipase A2 activation and arachidonic acid mobilization in P388D1 macrophages. *FEBS Letters*. 466. Russian.
7. **Castro, P. 2000.** Propiedades de la quitina y el quitosano. *Periodismo de Ciencia y Tecnología*. México.
8. **Caprile, D. 2005.** Obtención y utilización de Quitina y Quitosano a partir de desechos de crustáceos. España.
9. **Cárcamo, C. 2005.** Preparación de films de complejo polielectrolito Quitosano – Alginato y comparación de sus propiedades mecánicas y biológicas con films de Quitosano. Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico. Universidad de Chile.
10. **Cárdenas, M. 2006.** Piel artificial. *Revista Ercilla*. Universidad de Concepción. Netline Telecomunicaciones & Mambo. Chile.
11. **Chandi, T. y Charma, C. 1990.** Chitosan as a biomaterial. *Artif. Cells. Org.* 18(1). Cuba.
12. **Chiappe, A. 2004.** Artículos de Recomendados de Cirugía Plástica Colombia. URL: http://www.susmedicos.com/art_cicatrices_Chiaappe.htm.
13. **Dealey, C. 1999.** The care of wounds: A guide for nurses. Oxford; Malden, Mass. Blackwell Science. Electronic book. URL: <http://blog.utp.edu.co/cirugia/files/2010/10/biologiadelasheridasyelprocesodecicatrizaciondocumento.pdf>.
14. **De la Torre, J. y Sholar, A. 2010.** Wound healing: Chronic wounds. *Emedicine.com*. accessed January 20.

15. **Díaz, L. 2007.** Efecto cicatrizante del extracto hidroalcohólico de las hojas y raíces de *Gamochaeta americana* (Mill) Wedd. "qeto qeto" en ratones. Ayacucho - 2007, [Tesis para optar Título Profesional de Químico Farmacéutico] Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho.
16. **Eichler, M. And Carlson, A. 2005.** Modeling dermal granulation tissue with the linear fibroblast-populated collagen matrix: A comparison with the round matrix model. Journal of dermatological Science, 41(2).
17. **Fabiola, G. Bonilla, P. y Arroyo, J. 2005.** Efecto cicatrizante del tallo subterráneo de *Peperomia scutellaeifolia* R. et P. en geles aplicados a *Ratus Norvergicus*. Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM. Folia dermatol. 16(1). Perú.
18. **Fernandez, S. 2004.** Physicochemical and functional properties of crawfish chitosan as affected by different processing protocols. A Thesis Submitted to the Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in The Department of Food Science. Cuba.
19. **Fondon, R. 2009.** Heridas y suturas en urgencia. Enfermero de urgencias del Hospital Nuestra Señora de Montaña. Cáceres. España.
20. **Gennaro, A. 2003.** Remington Farmacia, tomo II, 20^{va} edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina.
21. **Guillermo, R. 2002.** Comprobación del efecto Cicatrizante de *Peperona scutellaeifolia*, Aspectos Etnofarmacológicos, Botánicos y estudio Químico. Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico. UNMSM. Lima. Peru.
22. **Hartmann, V. 1999.** Las heridas y su tratamiento. Cicatrización. URL: <http://xn-icer-as-oya.net/monograficos/cicatrizacion.htm>.
23. **Hernández H. y col. 2009.** Obtención y caracterización de Quitosano a partir de exoesqueleto de camarón. Revista Superficies y vacío 22(3)57-60. México.
24. **Hidalgo C. y col. 2008.** Validación de una técnica potenciométrica para determinar el grado de desacetilación de la quitosana. Dpto. Tecnológico y Control de Los medicamentos, Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana. Edición 49(3). Cuba.

25. **Ishihara, M. 2002.** Photocrosslinkable Chitosan Hydrogel as a Wound Dressing and a Biological Adhesive. *Trends In Glycoscience and Glycotechnology*. Japan.
26. **Jiménez, J. y Cesar, E. 2010.** Terapia de presión negativa: una nueva modalidad terapéutica en el manejo de heridas complejas, experiencias clínica con 87 casos y revisión de la literatura. Bogotá-Colombia. Citado el 08/04/2010. Disponible en: www.enfermeria5pujheridas.blogspot.com/.
27. **Kweon, D. Song, S. Park, Y. 2003.** Preparation of water-soluble chitosan/heparin complex and its application as wound healing accelerator. *Biomaterials*1. Japan.
28. **Koval, P. 2007.** Medicinaq del dolor – pain. URL: <http://www.dolor-pain.com/cx.html>. Mexico.
29. **Lárez, C. 2003.** Algunos Usos del Quitosano en sistemas Acuicos. *Revista Iberoamericana de Polímeros* Vol. 4(2). Venezuela. Recuperado en: <http://www.ehu.es/revibepol/pdf/ABR03/Cristobal2003.pdf>.
30. **Lárez, C. 2006.** Quitina y Quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Revista Avances en Química* col 1(2).
31. **Lemus, J, Martínez, L, Navarro, M, Posadas, A. 2006.** Obtención y uso de Quitosano para tratamientos dérmicos a partir exoesqueletos de camarón. *Boletín Electrónico N° 7 de la Universidad Rafael Landívar – Facultad de Ingeniería*.
32. **Liu, D. 2006.** Dermination of the degree of acetylation of chitosan by UV spectrophotometry using dual standards. *Carbohydrate Research*. 341(6). Japan.
33. **León, P. 1995.** Estudio Clínico del Efecto antiinflamatorio y cicatrizante de *Plantago major* L. (Llantén) trabajo de aptitud profesional para optar el título de Químico Farmacéutico. UNMSM. Lima.
34. **Martín, P. y Leibovich B. 2005.** Inflammatory cells during wound: the good, the bad and the ugly. *Trends in cell Biology*. 15(11). Russian.
35. **Mathur, N. 1990.** Polímeros. *Revista iberoamericana de polímeros*. 5va volumen. URL: <http://www.textoscientificos.com/polimeros/introduccion>. Cuba.
36. **Mesquita, L. 2005.** Píntese e estudio de Derivados do Quitosano con Potencial Interesse Biológico e Ambiental. Departamento de Química facultade de Ciencias da Universidade do Porto. Brasil.

37. **Mori, T. Murakami, M. Okumura, M. Kadosawa, T. UEDE, T. Fujinaga, T. 2005.** Mechanism of macrophage activation by chitin derivates. J Vet Med Sci 67(1). Mexico.
38. **Muzzarelli, R. 1973.** Natural Chelating Polymers, New York. Pergamon Press, URL: <<http://www.textoscientificos.com/polimeros/introduccion>>. Estados Unidos.
39. **Muzzarelli, R. 1974.** Chitin. Editorial pergamon Press. Primera edición, New York. Estados Unidos.
40. **Nieto, J. 1986.** La adsorción de mercurio por la quitosana de langosta. V Conferencia Científica de Ciencias Naturales. Universidad de la Habana. Cuba.
41. **Ochoa, V. Ruíz, C. 2004.** El Quitosano: usos farmacéuticos y Biológicos. Revista OFIL(Organización de farmacéuticos Ibero Americanos). Edición 2004. España.
42. **Parada, A. 2004.** Caracterización de Quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. Revista Iberoamericana de polímeros. 5(1). Cuba.
43. **Plascencia, M. 2004.** Estudio de la Actividad antifungica del quitosano en solución y en películas. México Universidad Autonoma Metropolitana. URL: <http://investigacion.izt.uam.mx/smk/RESUMENPlascencia.pdf>.
44. **Peniche, C. 1984.** Influencia de algunos parámetros en la obtención de Quitosana y sus Características. Cuba. Bioorg. Khimia. Vol. 1.
45. **Peniche, C. 2006.** Estudios sobre Quitina y Quitosana. Trabajo presentado para optar el grado científico de Doctor en Ciencias. Universidad de la Habana. Facultad de Química. Cuba.
46. **Peral, I. 2009.** Elementos Valiosos en los residuos de industrias transformadoras del producto de la pesca: Quitina – Quitosano y sus Aplicaciones.
47. **Rigola, M. y Lapeña, C. 1999.** Tratamiento de aguas industriales, México. Alfaomega marcomb. URL: <http://www.textoscientificos.com/polimeros/introduccion>.
48. **Sánchez, A. y col. 2007.** Síntesis y caracterización de hidrogeles de Quitosano obtenido a partir de camarón langostino (*Pleuroncodes planipes*) con potenciales aplicaciones biomédicas. Revista Iberoamericana de Polímeros vol. 8(4). Cuba.

49. **Suárez, Y. y col. 2008.** Validación de una técnica potenciométrica para poder determinar el grado de desacetilación del quitosano. Edit. Ars Pharm. Universidad de la Habana. Cuba.
50. **Stadelmann, D. Digenis, A. and Tobin G. 1998.** Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. The American Journal of Surgery. 176(2). URL: <http://blog.utp.edu.co/cirugia/files/2010/10/biologiadelasheridasyelproceso decicatrizaciondocumento.pdf>.
51. **Synowiecki, W. 2000.** The recovery of protein hydrolyzate during enzymatic isolation of chitin from shrim Crangon processing discard. Food Chem. Russian.
52. **Upadrashta, M. 1992.** Chitosan as a tablet binder. Drug Dey Ind. Pharm 18(1701-1708). India.
53. **Uriarte, V y Trejo, S. 2003.** Farmacología Clínica, primera edición. Editorial Trillas. México.
54. **Vilchez, S. 2005.** Nuevos tratamientos de lana con enzimas (Tesis para optar al grado de Doctor). Barcelona-España: Universidad de Barcelona.

IX. ANEXOS

ANEXO Nº 1

EL QUE SUSCRIBE, DOCENTE DEL ÁREA ACADÉMICA DE RECURSOS NATURALES Y ECOLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANAGA

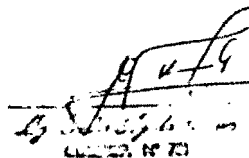
HACE CONSTAR:

Que, don Fernando SACCATOMA CONTRERAS, Bachiller en Farmacia y Bioquímica de la UNSCH, presento ante esta Area Académica dos ejemplares de "Cangrejo" procedente del litoral peruano, para su identificación taxonómica, habiéndose establecido o ubicado en la categoría taxonómica siguiente:

REINO	:	Animal
SUBREEVO	:	Metazooario
PHYLUM	:	Artrópoda
SUBPHYLUM	:	Crustacea
CLASE	:	Malacostraca
ORDEN	:	Decápoda
FAMILIA	:	Cancridae
GENERO	:	Cancer
ESPECIE	:	Cancer spp.
NOMBRE CIENTICO	:	Cáncerspp.
NOMBRE COMÚN	:	"Cangrejo".

Se le expide la presente constancia a solicitud del interesado, para los fines que estime pertinente.

Ayacucho, 10 de Noviembre del 2010.

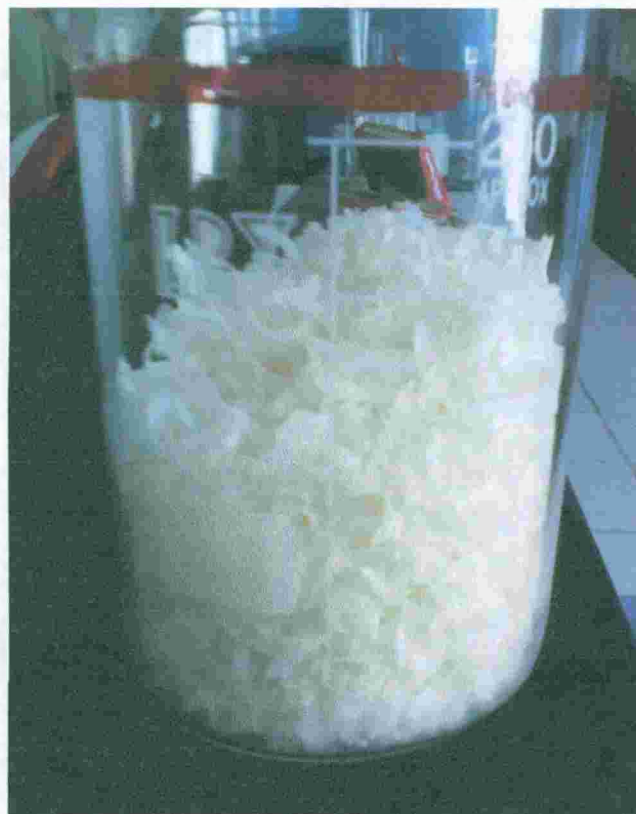

FERNANDO SACCATOMA CONTRERAS

ANEXO N° 2



Fotografía 2: Muestra de los exoesqueletos de “cangrejos” *Cancer spp.*
Ayacucho, 2010.

ANEXO N° 3



Fotografía 3: Muestra de quitina obtenida de los exoesqueletos de “cangrejos” *Cancer spp.* Ayacucho, 2010.

ANEXO N° 4



Fotografía 4: Equipo utilizado para la obtención de quitosano por método químico. Proceso de desacetilación de la quitina obtenida de los exoesqueletos de “cangrejos” *Cancer spp.* Ayacucho, 2010.

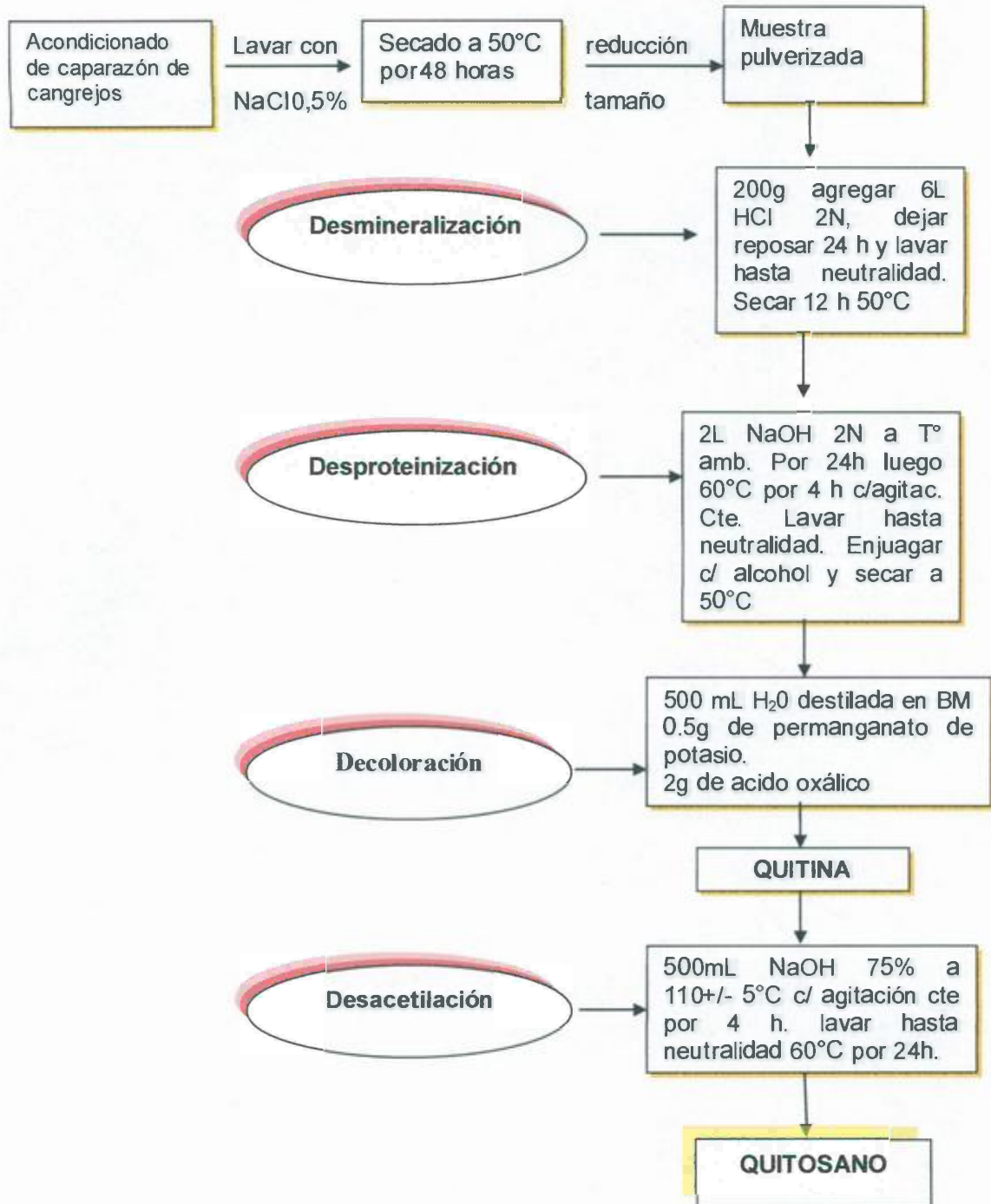
ANEXO N° 5



Fotografía 5: Muestra de quitosano obtenido de los exoesqueletos de “cangrejos” *Cancer spp.* Ayacucho 2010.

ANEXO Nº 6

Diagrama de la obtención de quitosano.



ANEXO N° 7

Cuadro N° 6. Resultados de la titulación potenciométrica de la muestra 1
(quitosano). Peso 0.1012 g. Solución valorante NaOH 0.1 N (F=0.096).

Gasto NaOH (mL)	pH	Primera derivada	Gasto NaOH (mL)	pH	Primera derivada
0	2.9	0	61.5	6.5	0
2	3.1	0.10	62.0	6.6	0.20
4	3.3	0.10	62.5	6.7	0.20
6	3.4	0.05	63.0	6.7	0.00
8	3.5	0.05	63.5	7.6	1.80
10	3.5	0.00	64.0	8.1	1.00
12	3.5	0.00	64.5	8.2	0.20
14	3.5	0.00	65.0	8.3	0.20
16	3.5	0.00	65.5	8.3	0.00
18	3.5	0.00	66.0	8.4	0.20
20	3.6	0.05	66.5	8.4	0.00
22	3.6	0.00	67.0	8.4	0.00
24	3.6	0.00	67.5	8.4	0.00
26	3.6	0.00	68.0	8.4	0.00
28	3.6	0.00	68.5	8.4	0.00
30	3.6	0.00	69.0	8.5	0.20
32	3.6	0.00	69.5	8.5	0.00
34	3.6	0.00	70.0	8.5	0.00
36	3.6	0.00	70.5	8.5	0.00
38	3.6	0.00	71.0	8.5	0.00
40	3.6	0.00	72.0	8.5	0.00
42	3.6	0.00	73.0	8.5	0.00
44	3.7	0.05	74.0	8.5	0.00
46	3.7	0.00	75.0	8.6	0.10
48	3.7	0.00	76.0	8.6	0.00
50	3.7	0.00	77.0	8.7	0.10
50.5	3.7	0.00	78.0	8.7	0.00
51	3.8	0.20	79.0	8.7	0.00
51.5	3.9	0.20	80.0	8.8	0.10
52	3.9	0.00	81.0	8.8	0.00
52.5	4	0.20	82.0	8.9	0.10
53	4.1	0.20	83.0	8.9	0.00
53.5	4.1	0.00	84.0	8.9	0.00
54	4.1	0.00	85.0	9.0	0.10
54.5	4.2	0.20	86.0	9.0	0.00
55	4.3	0.20	87.0	9.0	0.00
55.5	4.4	0.20	88.0	9.0	0.00
56	4.5	0.20	89.0	9.1	0.10
56.5	4.6	0.20	90.0	9.0	-0.10
57	4.7	0.20	91.0	9.0	0.00
57.5	4.8	0.20	92.0	9.1	0.10
58	5.1	0.60	93.0	9.1	0.00
58.5	5.8	1.40	94.0	9.1	0.00
59	6.1	0.60	95.0	9.1	0.00
59.5	6.2	0.20	96.0	9.2	0.10
60	6.3	0.20	97.0	9.2	0.00
60.5	6.4	0.20	98.0	9.3	0.10
61	6.5	0.20	99.0	9.3	0.00

ANEXO N° 9

Cuadro N° 8. Resultados de la titulación potenciométrica de la muestra 3 (quitosano). Peso 0.1002 g. Solución valorante NaOH 0.1N (F=0.096).

Gasto NaOH (mL)	pH	1ra derivada	Gasto NaOH (mL)	pH	1ra derivada
0	3.58	0	62	6.56	0.22
2	3.59	0.005	62.5	6.68	0.24
4	3.6	0.005	63	6.75	0.14
6	3.62	0.01	63.5	6.84	0.18
8	3.65	0.015	64	6.9	0.12
10	3.68	0.015	64.5	7.02	0.24
12	3.69	0.005	65	8.4	2.76
14	3.71	0.01	65.5	8.74	0.68
16	3.72	0.005	66	8.88	0.28
18	3.75	0.015	66.5	8.97	0.18
20	3.78	0.015	67	9	0.06
22	3.82	0.02	67.5	9.01	0.02
24	3.86	0.02	68	9.02	0.02
26	3.84	-0.01	68.5	9.06	0.08
28	3.9	0.03	69	9.11	0.1
30	3.96	0.03	69.5	9.12	0.02
32	4.05	0.045	70	9.15	0.06
34	4.1	0.025	70.5	9.16	0.02
36	4.12	0.01	71	9.17	0.02
38	4.16	0.02	72	9.16	-0.01
40	4.16	0	73	9.16	0
42	4.17	0.005	74	9.16	0
44	4.26	0.045	75	9.16	0
46	4.29	0.015	76	9.16	0
48	4.4	0.055	77	9.17	0.01
50	4.38	-0.01	78	9.17	0
50.5	4.38	0	79	9.17	0
51	4.39	0.02	80	9.18	0.01
51.5	4.39	0	81	9.19	0.01
52	4.4	0.02	82	9.21	0.02
52.5	4.41	0.02	83	9.21	0
53	4.41	0	84	9.22	0.01
53.5	4.41	0	85	9.23	0.01
54	4.42	0.02	86	9.25	0.02
54.5	4.42	0	87	9.28	0.03
55	4.44	0.04	88	9.3	0.02
55.5	4.48	0.08	89	9.3	0
56	4.49	0.02	90	9.31	0.01
56.5	4.51	0.04	91	9.32	0.01
57	4.55	0.08	92	9.32	0
57.5	4.6	0.1	93	9.35	0.03
58	4.66	0.12	94	9.36	0.01
58.5	4.74	0.16	95	9.37	0.01
59	4.9	0.32	96	9.39	0.02
59.5	5.35	0.9	97	9.41	0.02
60	5.96	1.22	98	9.42	0.01
60.5	6.32	0.72	99	9.42	0
61	6.35	0.06	100	9.43	0.01
61.5	6.45	0.2			

ANEXO N° 10



Fotografía 6: Soluciones a base de quitosano extraído de los exoesqueletos de *Cancer* spp., “cangrejo”.

ANEXO N° 11



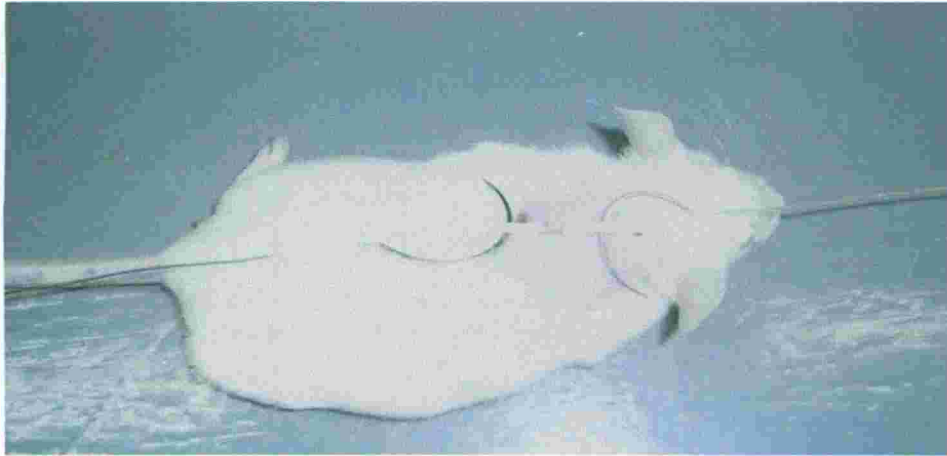
Fotografía 7: ambientación de los grupos experimentales.

ANEXO N° 12



Fotografía 8: Incisión y sutura del lomo de las ratas Holtzman.

ANEXO N° 14



Fotografía 10: Determinación de la fuerza de tensión.

ANEXO N° 15



Fotografía 11: Equipo de tensión con agua.

ANEXO N° 13



Fotografía 9: Aplicación de las soluciones de quitosano, Cicatrin® y solución base (ácido acético pH≈6.5).

ANEXO N° 16

Cuadro N° 9. Volúmenes en mL de la fuerza de tensión al determinar la actividad cicatrizante del quitosano extraído del exoesqueleto de *Cancer* spp. “cangrejo”. Ayacucho, 2010.

Volumen (mL) necesario para abrir la cicatriz.							
Ratas	% de Quitosano en solución				Blanco	control	
	0.5%	1.0%	3.0%	5.0%	*AcAc2% (pH≈6.5)	Cicatrin®	Piel intacta
1	119	69	40	41	30	49	240
2	150	74	34	33	25	39	230
3	115	71	50	30	34	55	215
4	130	81	36	38	15	53	233
5	108	76	46	35	20	52	228
Promedio	124.4	74.2	41.2	35.4	24.8	49.6	229.2
D.S.	16.4	4.7	6.7	4.3	6.3	7.6	9.1

Fuente: (*) Ácido acético.

ANEXO N° 17

Cuadro N° 10. Porcentaje de la actividad cicatrizante del quitosano extraído del exoesqueleto de *Cancer spp.* “cangrejo” frente al grupo control y blanco en ratas Hoztlman. Ayacucho, 2010.

	Tratamiento	Volumen (mL)	% Efecto cicatrizante*
Blanco	Vehículo	24.8	10.82
	0.25% quitosano	124.4	54.28
Muestras	1.0% quitosano	74.2	32.37
	3.0% quitosano	41.2	17.98
	5.0% quitosano	35.4	15.45
	Cicatrin®	21.64	21.64
control	Piel intacta	229.2	100.0

ANEXO N° 18

Cuadro 11. Resultado de la prueba de Duncan de las comparaciones múltiples de la fuerza de tensión al determinar la actividad cicatrizante del quitosano extraído del exoesqueleto de *Cancer spp.* “cangrejo en ratas Hoztlman. Ayacucho, 2010.

Tratamiento	N	Sub conjuntos homogéneos					
		1	2	3	4	5	6
Blanco	5	24,80					
5,0%	5	35,40	35,40				
3,0%	5		41,20	41,20			
Cicatrim	5			49,60			
1,0%	5				74,20		
0,5%	5					124,40	
Agua	5						229,20
Sig.		0,07	0,30	0,14	1,00	1,00	1,00

ANEXO N° 19

Cuadro 12. Valores descriptivos del volumen promedio del agua por la actividad cicatrizante como resultado de la fuerza de tensión en “ratas” Holtzman. Ayacucho, 2010.

Tratamiento					Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
	N	Media	Desviación típica	Error típico	Límite inferior	Límite superior		
0,5%	5	124,40	16,38	7,33	104,06	144,74	108,00	150,00
1,0%	5	74,20	4,66	2,08	68,42	79,98	69,00	81,00
3,0%	5	41,20	6,72	3,01	32,85	49,55	34,00	50,00
5,0%	5	35,40	4,28	1,91	30,09	40,71	30,00	41,00
Blanco	5	24,80	7,60	3,40	15,37	34,23	15,00	34,00
Cicatrin	5	49,60	6,31	2,82	41,77	57,43	39,00	55,00
Piel intacta	5	229,20	9,15	4,09	217,84	240,56	215,00	240,00
Total	35	82,69	68,72	11,62	59,08	106,29	15,00	240,00

ANEXO 20.

Cuadro 13. Análisis de varianza de los valores descriptivos del volumen promedio de agua por efecto cicatrizante como resultado de la fuerza de tensión en “ratas” Holtzman. Ayacucho, 2010.

	Suma de cuadrados	g.l.	Media de cuadrados	F	Sig.
Entre grupos	158404,74	6	26400,79	345,62	6,49 e-11
Dentro de grupos	2138,80	28	76,39		
Total	160543,54	34			

ANEXO N° 15

Matriz de consistencia

Título	Problema	Objetivos	Marco teórico	Hipótesis	Variables	Metodología
Actividad cicatrizante del quitosano extraído del exoesqueleto de <i>Cancer spp.</i> "cangrejo" en ratas Holtzman. Ayacucho, 2010.	¿Tendrá actividad cicatrizante el quitosano extraído del exoesqueleto de <i>Cancer spp.</i> "cangrejo" en ratas Holtzman?	Objetivo general: - Determinar la actividad cicatrizante del quitosano extraído del exoesqueleto de <i>Cancer spp.</i> "cangrejo" en ratas Holtzman. Objetivos específicos: - Extraer e identificar el quitosano extraído del exoesqueleto de <i>Cancer spp.</i> "cangrejo". - Determinar la concentración que presenta mayor actividad cicatrizante. - Comparar la actividad cicatrizante con el estandar Cicatrin®.	• Antecedentes Generales. • Quitina, es un polisacárido, compuesto de unidades de acetilglucosamina (exactamente, n-acetil-D-glucos-2-amina). • Quitosano, el quitosano es un polisacárido lineal que se obtiene por desacetilación extensiva de la quitina y está compuesto por dos tipos de unidades estructurales distribuidas de manera aleatoria a lo largo de la cadena, N-acetil-D-glucosamina y la D-glucosamina, las cuales se encuentran unidas entre sí por enlaces del tipo β (1$\rightarrow$4) glicosídicos. • Métodos de obtención. • Fuentes de obtención de quitina. • Obtención de quitosano. • Caracterización del quitosano. • Aplicaciones del quitosano. • Mecanismos de acción del quitosano. • Propiedades del quitosano. • Cicatrización de las heridas. • Diagnóstico de la cicatriz. • Tratamiento de la cicatriz.	El quitosano extraído de exoesqueleto de <i>Cancer spp.</i> "cangrejo" tiene actividad cicatrizante en ratas Holtzman.	Variable Independiente: Quitosano extraído de los exoesqueletos de <i>Cancer spp.</i> "cangrejo". Indicadores: Concentraciones de quitosano: 0,5%, 1%, 3% y 5%. Variable dependiente: Actividad cicatrizante en ratas Holtzman. Indicadores: Porcentaje de cicatrización. Medición de los gramos necesarios para abrir cada herida cicatrizada con un tensiómetro siguiendo el método de Vaisberg y col.	Población: Quitosano extraído de exoesqueletos de <i>Cancer spp.</i> "cangrejos" en la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Departamento de Ayacucho. Muestra: 5 g de quitosano extraído de exoesqueletos de <i>Cancer spp.</i> "cangrejo", en la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Departamento de Ayacucho. Unidad experimental: ratas Holtzman (35). Procedimiento Experimental Se empleará el método de Vaisberg y col (Medición de gramos necesarios para abrir la herida cicatrizada con un tensiómetro).

ACTA DE SUTENTACION DE TESIS

R.D. N° 211-2011-FCB-D

Bach. Fernando Saccatoma Contreras

En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro de la tarde del día jueves cuatro de agosto del dos mil once, en el Auditorio del Departamento Académico de Ciencias biológicas, bajo la presidencia del Mg. José Diez Macavilca y con la asistencia de los docentes: Mg. Maricela López Sierralta y Mg. Edwin Enciso Roca, quien además actúa como secretario docente (e), para recibir la tesis: *Actividad cicatrizante del quitosano extraído del exoesqueleto de Cancer spp "cangrejo" en ratas Holtzman*, Ayacucho 2010, presentado por el Bach. Fernando Saccatoma Contreras, quien pretende optar el título profesional de Químico Farmacéutico.

El presente Jurado Calificador inicia el acto de sustentación solicitando al secretario docente la revisión de los documentos en mesa y la lectura de la Resolución Decanal N° 211-2011-FCB-D, para luego indicar al sustentante aspectos relacionados a la sustentación, haciendo hincapié que debe cumplir un tiempo de sustentación máximo de cuarenta y cinco minutos, lo cual fue cumplido por el sustentante.

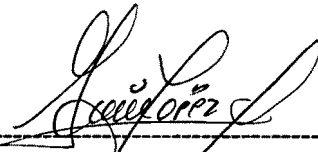
El presidente del jurado de sustentación de tesis inicia la segunda parte del acto de sustentación en lo cual los miembros del jurado calificador, realizan las observaciones y preguntas que crean conveniente para la evaluación correspondiente. Seguidamente el presidente solicita al sustentante y público en general que abandonen el auditorio para que el jurado calificador pueda deliberar y emitir la calificación correspondiente como sigue:

JURADO CALIFICADOR	EXPOSICIÓN	RPTAAPREG.	PROMEDIO
Mg. José Diez Macavilca	18	18	18
Mg. Maricela López Sierralta	17	17	17
Mg. Edwin Enciso Roca	18	18	18
PROMEDIO			18

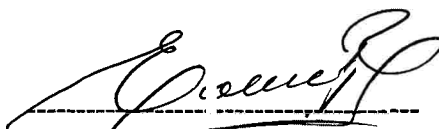
De la evaluación realizada el sustentante obtuvo la calificación promedio de dieciocho (18) de lo cual dan fe los miembros estampando su firma al pie del presente. Culmina el acto de sustentación siendo las seis y quince de la noche.



Mg. José Díez Macavilca
Asesor- Presidente (e)



Mg. Maricela López Sierralta
Miembro



Mg. Edwin Enciso Roca
Miembro-Secretario docente (e)