



UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS AMÉRICAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE FARMACIA

Diseño de un suero tópico de hidratación para la piel a base de ácido hialurónico extraído de las membranas testáceas de las cáscaras de huevo, en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas, como aporte a los cuidados dermocosméticos de usuarios adultos jóvenes en Costa Rica durante el tercer cuatrimestre del 2022

Sustentante

Jose María Calderón Argüello

Tutor

Dra Melissa Mata Calvo

Modalidad de tesis para optar por el grado de Licenciatura en Farmacia

IV. Contenido

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN	12
1.1 Planteamiento del problema.....	12
1.2 Objetivos.....	14
1.2.1 Objetivo General	14
1.2.2 Objetivos Específicos.....	14
1.3 Justificación.....	14
1.4 Antecedentes.....	16
1.4.1 Antecedentes Históricos.....	16
1.4.2 Antecedentes Internacionales.....	17
1.4.3 Antecedentes Nacionales.....	19
CAPÍTULO II- MARCO TEÓRICO	20
2.1 Características generales de la piel	21
2.2 Composición de la piel.....	21
2.2.1. Epidermis	23
2.2.2 Dermis	28
2.2 Proceso de envejecimiento.....	30
2.3 La gallina	32
2.3.1 Proceso de formación del huevo.....	35
2.3 Huevo de gallina.....	39
2.3.1 Características generales del huevo.....	39
2.3.2 Composición química del huevo	40
2.4 Membranas testáceas.....	42
2.5 Ácido hialurónico.....	46
2.5.1 Propiedades y estructura química	48
2.5.2 Vida media, síntesis y metabolismo	49
2.5.3 Usos clínicos	51
2.5.4 Cosmético	62
2.5.5 Suero Tópico	64
2.6 Métodos de extracción de ácido hialurónico	69
2.6.1 Extracción enzimática.....	69
2.6.3 Extracción con microorganismos.....	71
2.6.2 Extracción con disolución de cloruro de sodio	71

2.7 Métodos de análisis.....	72
2.7.1 HPLC.....	72
2.7.2 Infrarrojo.....	75
2.8 Verificación de calidad en productos cosméticos.....	80
CAPÍTULO III- MARCO METODOLÓGICO.....	83
3.1 Enfoque.....	84
3.2. Tipo de investigación.....	84
3.3. Fuentes de Información.....	85
3.4. Población y muestra.....	85
3.5. Criterios de búsqueda de la información.....	86
3.6. Criterios de Inclusión y exclusión.....	87
3.7. Clasificación de la información según nivel de evidencia.....	88
3.8. Variables de la Investigación.....	92
3.9. Descripción del procedimiento de recolección y análisis de datos.....	94
3.9.1 Recolección de datos.....	94
3.9.2 Materia prima y tratamiento preliminar.....	95
3.10. Descripción de instrumentos y técnicas.....	98
3.11. Materiales, equipos y condiciones.....	98
3.12. Componentes reactivos.....	103
CAPÍTULO IV- ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	104
4.1 Extracción de ácido hialurónico a partir de membranas testáceas de cáscaras de huevo de gallina utilizando un método enzimático y otro con disolución de NaCl 0,5 M.....	105
4.1.1 Extracción enzimática con pepsina.....	106
4.1.2 Extracción con cloruro de sodio (NaCl).....	109
4.2 Desarrollar la formulación un suero tópico de hidratación para la piel a base de ácido hialurónico extraído de las membranas testáceas de las cáscaras de huevo en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas.....	125
4.3 Determinar características generales del suero tópico desarrollado y sus posibles aplicaciones como aporte a los cuidados dermocosméticos de usuarios adultos jóvenes.....	141
CAPÍTULO V- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	149
5.1 Conclusiones.....	150
5.2 Recomendaciones.....	151

CAPÍTULO VI- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 152

V. Lista de Tablas.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de las gallinas.....	33
Tabla 2. Funciones generales del ácido hialurónico.	47
Tabla 3. Criterios de búsqueda de información de la investigación.	86
Tabla 4. Criterios de inclusión y exclusión.....	87
Tabla 5. Información según nivel de evidencia (tabla Sackett).....	88
Tabla 6. Operacionalización de variables.	92
Tabla 7. Equipos utilizados en el proceso experimental.	99
Tabla 8. Condiciones de HPLC	103
Tabla 9. Masa de las membranas que se utilizaron para la extracción enzimática utilizando balanza analítica marca Nimbus ($\pm 0,0001$ g).	105
Tabla 10. Masa de las membranas que se utilizaron para la extracción con solución de cloruro de sodio utilizando balanza analítica marca Nimbus ($\pm 0,0001$ g).	106
Tabla 11. Condiciones de las diferentes variables para optimizar el proceso de extracción con disolución de cloruro de sodio (NaCl).....	109
Tabla 12. Secuencia de análisis utilizada para la lectura de muestras.	118
Tabla 13. Tiempos de retención correspondiente a las muestras del proceso enzimático utilizando equipo HPLC marca YL.....	121
Tabla 14. Tiempos de retención correspondiente a las muestras del proceso con disolución de cloruro de sodio al 0,5 M utilizando equipo HPLC marca YL.	121
Tabla 15. Área del pico del ácido hialurónico presente en las muestras del proceso enzimático y el de disolución con NaCl 0,5 M.....	122
Tabla 16. Datos utilizados para generar la curva de calibración.....	123
Tabla 17. Miligramos de ácido hialurónico presentes en los extractos enzimáticos. .	124
Tabla 18. Miligramos de ácido hialurónico presentes en los extractos con disolución de cloruro de sodio 0,5 M.....	125
Tabla 19. Materiales específicos, porcentaje y cantidades utilizadas para realizar la formulación de 200 gramos.....	127
Tabla 20. Propiedades fisicoquímicas de la glicerina.....	128
Tabla 21. Propiedades fisicoquímicas del ácido hialurónico	129
Tabla 22. Propiedades fisicoquímicas del metilparabeno.....	131
Tabla 23. Propiedades fisicoquímicas del Carbopol 940.....	132

Tabla 24. Propiedades fisicoquímicas de la trietanolamina	134
Tabla 25. Propiedades fisicoquímicas del cloruro de sodio	135
Tabla 26. Materiales utilizados y su respectiva función en la formulación.	137
Tabla 27. Características organolépticas de la formulación farmacéutica (suero). ...	142
Tabla 28. Pruebas físicas, pH, densidad y viscosidad del suero.	143
Tabla 29. Cálculo de densidad.....	143

VI. Lista de Figuras.

Figura 1. Capas de la piel y elementos presentes en cada una de ellas.....	22
Figura 2. Factores que influyen en el envejecimiento cutáneo.	32
Figura 3. Partes de la estructura del huevo de gallina.....	40
Figura 4. Componentes del huevo de gallina y masa respectiva.	41
Figura 5. Valor nutricional del huevo de gallina.	41
Figura 6. Representación y fotografía de las estructuras de la cascara del huevo de gallina.....	44
Figura 7. Porcentaje de cada uno de los aminoácidos presentes en las membranas testáceas del huevo.....	45
Figura 8. Estructura química del ácido hialurónico.	48
Figura 9. Fotografía de inyección interarticular de ácido hialurónico.....	53
Figura 10. Disminución de arrugas en zona ocular después del proceso de microimplante con ácido hialurónico.	55
Figura 11. Resultados del tratamiento con microimplante de ácido hialurónico.....	55
Figura 12. Representación gráfica del funcionamiento de diferentes sistemas en los que se involucra AH.....	58
Figura 13. Presentación farmacéutica del ácido hialurónico en ampolla.....	61
Figura 14. Administración interdental de ácido hialurónico.	62
Figura 15. Comparación de papila interdental. A) papila antes de infiltraciones de AH. B) papila al finalizar 4 filtraciones de AH.....	62
Figura 16. Mediciones de hidratación con sensor. (a mayor coloración azul, mayor grado de hidratación)	66
Figura 17. Porcentaje de hidratación con respecto al paso de las semanas de estudio.....	67
Figura 18. Disminución del eritema, utilizando filtros fotográficos.	68
Figura 19. Fotografía donde se evidencia la disminución de arrugas en zona periocular.	68
Figura 20. Fotografía donde se evidencia la disminución de arrugas en mejilla y zona periocular inferior.	69
Figura 21. Diagrama básico de un cromatógrafo de alta resolución.	73
Figura 22. Diagrama del funcionamiento de un espectrofotómetro infrarrojo por transformada de Fourier.....	77
Figura 23. Espectro infrarrojo de la miel de abeja.	78
Figura 24. Representación de la banda característica del grupo funcional carbonilo en espectro infrarrojo.....	80

Figura 25. Especificaciones de limites microbianos para productos cosméticos.	82
Figura 26. Especificación de microorganismos patógenos.....	82
Figura 27. Diagrama de flujo del proceso de extracción del ácido hialurónico por utilizando extracción enzimática.	96
Figura 28. Diagrama de flujo del proceso de extracción del ácido hialurónico por disolución con cloruro de sodio 0,5 M.	97
Figura 29. Representación gráfica de los pasos correspondientes al proceso enzimático.	108
Figura 30. Representación gráfica de los pasos correspondientes al proceso con disolución de cloruro de sodio.	111
Figura 31. Estructura molecular y enlaces presentes en la estructura del ácido hialurónico.....	114
Figura 32. Espectro infrarrojo del estándar de ácido hialurónico utilizando equipo de espectroscopia infrarroja marca Agilent.....	115
Figura 33. Espectro infrarrojo de la muestra extraída por proceso enzimático utilizando equipo de espectroscopia infrarroja marca Agilent.	115
Figura 34. Superposición del espectro infrarrojo del estándar contra dos lecturas del proceso enzimático utilizando equipo de espectroscopia infrarroja marca Agilent. .	116
Figura 35. Superposición del espectro infrarrojo del estándar contra un espectro del proceso con cloruro de sodio 0,5 M utilizando equipo de espectroscopia infrarroja marca Agilent.....	116
Figura 36. Espectro HPLC de la muestra obtenido por extracción enzimática	118
Figura 37. Espectro HPLC de la muestra obtenida por extracción con disolución de cloruro de sodio.....	118
Figura 38. Espectro de ácido hialurónico.....	119
Figura 39. Grafica correspondiente a las concentraciones de estándar contra las áreas generadas en el espectro.....	123
Figura 40. Diagrama de flujo del proceso de formulación con Carbopol 940.	138
Figura 41. Proceso de formulación de suero.	139
Figura 42. Etiqueta del envase primario de suero de ácido hialurónico.	141
Figura 43. Espectro infrarrojo del gel con ácido hialurónico.....	144
Figura 44. Superposición de dos muestras de gel con respecto a un patrón de ácido hialurónico.....	144
Figura 45. Espectro del gel utilizando equipo HPLC como método de análisis.	145
Figura 46. Reporte del laboratorio MICROLABS sobre el gel analizado.	147

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del problema

El órgano más extenso del ser humano es la piel, la cual es la parte más externa que se presenta, debido a esto se encuentra en constante exposición a luz solar, sufriendo graves daños a causa de esta, sumando a esto que la mayoría de personas no toman acciones preventivas contra este tipo de daño. Dentro de las consecuencias que puede generar la alta exposición a luz solar están: cáncer de piel, melanomas, arrugas prematuras, carcinomas, manchas, fotoenvejecimiento y otros problemas relacionados. Como acción preventiva a esta exposición solar se puede mencionar el uso de sustancias que humecten la piel, utilizando como vía de administración un suero de hidratación tópica ¹.

Debido a que el envejecimiento de la piel es un proceso gradual, dependiente de procesos internos y externos, este proceso no se puede detener debido a procesos fisiológicos anteriormente explicados, pero puede haber un retraso en el aspecto estético, con respecto a piel, además de los diferentes beneficios presentes en diversos tratamientos para la buena salud de la misma. Estos factores hacen que el cuidado de la piel se convierta en un proceso que debe ser incluido y utilizado por todas las personas debido a los diferentes beneficios y posibles rutas preventivas para diferentes patologías ².

El ácido hialurónico es producido por enzimas sintetizadas de AH presentes en la membrana plasmática de fibroblastos, posteriormente se liberan al espacio extracelular. Tiene un carácter bastante ácido, también es altamente hidrofílico e hidrosoluble, estas características le permiten atraer importantes cantidades de agua y sodio, como consecuencia de este proceso se incrementa la hidratación además de la elasticidad de la piel. Debido a estas características que presenta, es uno de las mejores opciones de tratamiento en cuanto a la mantención de una piel sana fisiológicamente y también en el aspecto estético ³.

El proceso de envejecimiento en la piel obedece a pérdidas de vascularización, de reproducción celular (por parte de fibroblastos), fibras de tipo colágenas y también elásticas, pero fundamentalmente de ácido hialurónico, provocando de esta manera deshidratación y pérdida de volumen. El ácido hialurónico es un polisacárido natural presente en el líquido

extracelular de todos los seres vivos, idéntico en todos los seres vivos y también en todos los tejidos que se presente. Cuanto mayor avance en edad menor será la producción de ácido hialurónico, por lo cual es importante tener en cuenta que mantener niveles estables de este polisacárido es fundamental para retrasar el proceso de envejecimiento en piel ⁴.

Las cáscaras de huevo son residuos sólidos procedentes de actividades, tanto agrícolas como avícolas. La producción masiva de este desecho proviene de plantas de incubación, criaderos de gallinas, fábricas productoras de salsas, industrias dedicadas a la panadería y repostería y también industrias de procesamiento de productos de huevo para su posterior venta por separado (albúmina y yema). La producción diaria de huevo según el consumo ecuatoriano fue de 10,81 millones en el 2019. En este país hay una producción de 4 millones de huevos, los mismos que producen 24000 toneladas anuales de residuos aproximadamente, de esto el 90% es depositado en tratamiento de rellenos sanitarios ⁵.

Una vez planteada la problemática a la cual se requiere dirigir el proyecto, nace la necesidad de realizar este Trabajo Final de Graduación, el cual va dirigido y pretende demostrar la obtención de ácido hialurónico a partir de membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo, además de formular un suero de hidratación tópico como forma farmacéutica en específico. Debido a esta premisa, surge la siguiente pregunta de investigación: ¿Cómo puede ayudar un suero de hidratación tópico teniendo como principio activo el ácido hialurónico extraído de las membranas testáceas presentes en la cáscara de huevo, en la Universidad Internacional de las Américas en el año 2022?

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Diseñar un suero tópico de hidratación para la piel a base de ácido hialurónico extraído de las membranas testáceas de las cáscaras de huevo en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas como aporte a los cuidados dermatocósméticos de usuarios adultos jóvenes en Costa Rica durante el tercer cuatrimestre del 2022

1.2.2 Objetivos Específicos

1. Optimizar las condiciones para la formulación de un suero tópico de hidratación para la piel a base de ácido hialurónico extraído de las membranas testáceas de las cáscaras.
2. Desarrollar la formulación de un suero tópico de hidratación para la piel a base de ácido hialurónico, extraído de las membranas testáceas de las cáscaras de huevo en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas.
3. Determinar características generales del suero tópico desarrollado y sus posibles aplicaciones como aporte a los cuidados dermatocósméticos de usuarios adultos jóvenes.

1.3 Justificación

Actualmente, existe una alta demanda de consumidores de productos cosméticos que incluyan dentro de su formulación ingredientes de tipo natural. La membrana de las cáscaras de huevo es una sustancia que ha demostrado manifestar un incremento en la actividad celular, además de aumentar la producción de colágeno. Esta membrana presente en el huevo retrasa el envejecimiento de la piel y también disminuye el daño provocado por la luz ultravioleta y también procesos de inflamación. Debido a diferentes investigaciones, se han desarrollado formulaciones efectivas de origen natural para la hidratación y recuperación de la piel, ayudando de esta manera al retraso en envejecimiento ².

Se han sugerido membranas en cáscaras de huevo de gallina para diferentes formulaciones, como humectantes y cicatrización de heridas, usándolo también en una línea celular de queratinocitos humanos, para el tratamiento de arrugas, así como también en actividad antibacteriana. Se determinó que la cáscara de huevo se puede utilizar para

ingredientes cosméticos funcionales, ya que ayuda a eliminar las arrugas causadas por los rayos UV-B ².

La membrana presente en la cáscara de huevo está situada entre la cáscara y la clara de huevo; además, es una bicapa insoluble. Tiene una estructura fibrosa y presenta efectos antimicrobianos y antibacterianos, es rica en sustancias como glucosamina, condroitín sulfato, ácido hialurónico, colágeno y sulfato de glicoproteína. Actualmente, las membranas de cáscara de huevo son muy utilizados en cosmética, medicina y en la industria farmacéutica. Las nuevas tecnologías generan la separación efectiva de las membranas de la cáscara; esto hace que se puedan aislar y obtener los principios activos de la membrana ⁶.

Dentro de las ventajas de utilizar las membranas de cáscaras de huevo, en este caso las testáceas, las cuales son un biomaterial natural y un tejido conectivo que están entre la clara y la cáscara de huevo; de esta manera, son biocompatibles con células humanas y fáciles de adquirir a un precio bastante accesible. La característica red porosa de la estructura les suministra a las membranas de la cáscara de huevo, una gran superficie para la deposición de biomoléculas y una porosidad apropiada para gas e intercambio de agua, los cuales son factores fundamentales para vendajes que se puedan utilizar en el tratamiento de heridas ⁶.

Además, en los tiempos modernos se ha observado un particular fanatismo por parte de las personas que utilizan cosméticos, por aquellos productos que utilizan componentes naturales dentro de su formulación y también sobre áreas de salud en general. Esta tendencia obedece a productos y laboratorios donde no prueben sus productos en animales, este factor ha sido muy importante e influyente durante estos últimos años. También con políticas asociadas a veganismo, pero aunque pareciera contrario el uso de huevo de gallina asociado a veganismo, de alguna manera la extracción de ácido hialurónico es más compatible con este tipo de tendencia en comparación con maltrato y prueba en animales ⁷.

Las cáscaras de huevo son un residuo y desecho orgánico abundante, proveniente del sector avícola, sectores agrícolas y alimenticias con gran importancia en el país. Debido a esto resulta ser una materia prima bastante abundante, lo cual no ha sido lo suficientemente

valorada y tomada en cuenta para la producción de diferentes productos, y de esta manera esta materia tiene un valor nulo, lo cual debería explorarse a fondo para generar la utilización de la misma. Actualmente, diferentes estudios e investigaciones han permitido determinar la composición química de las cáscaras de huevo, encontrando una gran cantidad de colágeno y también ácido hialurónico, componentes que se pueden extraer de las membranas de estas

8.

1.4 Antecedentes

1.4.1 Antecedentes Históricos

Heaney et al. ⁹, en su estudio “The isolation and characterization of hyaluronic acid in eggshell”, analizaron la parte orgánica de la cáscara de huevo de la gallina, en la cual hallaron que contenía una serie de proteínas y polisacáridos, eventualmente presentes como glicoproteínas y glicosaminoglicanos. Dicho estudio se realizó mediante una preparación purificada de un glicosaminoglicano, por estudio de la velocidad de sedimentación y hasta el equilibrio en un gradiente de densidad. Se observa que los productos de degradación manifestaron que los glicosaminoglicanos eran hialuronidasas y la identificación de los productos reveló que el glicosaminoglicano era ácido hialurónico.

Guerra et al. ¹⁰, en su trabajo “El ácido hialurónico y sus aplicaciones en dermatología”, demostraron lo importante que se ha vuelto el ácido hialurónico, ya que la literatura médica tiene un mayor auge en cuanto a este tema. Según esta investigación revelan que el ácido hialurónico fue nombrado así por Meyer y Palmer en 1934 en el tejido que se aisló del cuerpo vitreo del ojo bovino y del ácido hialurónico. Dentro de las conclusiones más importantes de este estudio son que el ácido hialurónico tiene un papel importante en la curación de heridas, en la cicatrización y en el tratamiento del envejecimiento de piel.

Long et al. ¹¹, en su investigación “Preparation of hyaluronic acid from eggshell membrane”, las composiciones y métodos para preparar formulaciones que incluyen ácido hialurónico procedente de la membrana de la cáscara de huevo. Este hallazgo se dirigió a un método de tratamiento de un mamífero, que se favorecerá de la administración de ácido

hialurónico, que incluye administrar una composición que contiene ácido hialurónico derivado de la membrana de la cáscara de huevo, donde se obtuvo que las composiciones pueden tener ácido hialurónico puro o ácido hialurónico en combinación con otros componentes naturales, procedentes de la cáscara del huevo.

1.4.2 Antecedentes Internacionales

Yoo et al.², en su publicación “Effects of eggshell membrane hydrolysates on UVB-radiation-induced wrinkle formation in SKH-1 hairless mice”, observaron el resultado de los hidrolizados de membrana de cáscara de huevo en cuanto a protección contra las arrugas, los rayos UV y la humedad para su utilización en cosméticos. Se realizó mediante un estudio donde se fraccionaron los hidrolizados, donde cada muestra se trató a diferentes concentraciones y se usaron ratones sin pelo, que habían sido expuestos a rayos UV-B para inducir arrugas durante siete semanas. Se logró determinar que la Fracción I fue más eficaz y que estos hidrolizados ayudan a atenuar las arrugas que fueron provocadas por radiación UV-B.

Oba et al.¹², en un estudio titulado “Collagen hydrolysate intake improves the loss of epidermal barrier function and skin elasticity induced by UVB irradiation in hairless mice”, mediante la administración de colágeno hidrolizado por vía oral a ratones en una dosis o dosis repetidas, exponiendo a estos a los rayos UV-B. obtuvieron como resultado que la irradiación provocó una disfunción de la barrera epidérmica, incremento en la pérdida de agua transepidérmica, hiperplasia epidérmica y una disminución en el contenido de agua del estrato córneo. La irradiación repetida disminuyó la elasticidad de la piel y la cantidad de ácido hialurónico dérmico en ratones. Por último, se concluyó que la administración de hidrolizado de colágeno descontrola la función de la barrera epidérmica y elasticidad cutánea dérmica.

Urbano¹³, en su estudio titulado “Extracción a escala de laboratorio del complejo de proteínas presentes en las membranas intersticiales de residuos de cáscaras de huevo de gallina (*Gallus Domesticus*) mediante el proceso de hidrólisis alcalina”, realizó una extracción del complejo proteico en las membranas intersticiales de residuos de cáscara de

huevo de gallina, en los cuales se realizaron análisis de caracterización en las fases proteica y mineral. Se determinó que las membranas intersticiales son una fuente significativa de proteína, en comparación con la fase mineral, que alcanza altas concentraciones de mineral (calcio).

Chi et al. ¹⁴ en un estudio titulado “A novel process to separate the eggshell membranas and eggshells via flash evaporation” hace referencia al consumo de huevo en diferentes países, mencionando potencias mundiales dentro de este. En el 2018 la producción de huevo fue de 76.7 millones de toneladas, tomando en cuenta un crecimiento de un 14,95% con respecto a los últimos 10 años. China tuvo una producción de 26.9 millones de toneladas en 2018, mientras que Estados Unidos tuvo una producción de 6,46 millones seguido por la India con 5.23 millones. El incremento en la producción de huevo obedece a un aumento en el consumo global de este producto, y se menciona que puede haber un aumento del 50% para 2035, esto debido al precio comparado a otros tipos de proteína animal.

Pasarin y Rovinaru ¹⁵, en su investigación titulada “Separation methods of the eggshell membranas from eggshell” mencionan algunos métodos para poder generar la extracción de la membrana de las cáscaras de huevo, en este caso mencionan una forma casera, la cual consiste en la obtención de la misma por medio de calentamiento en un horno durante un tiempo y temperatura determinada (30 min y 30 grados centígrados). Otro de los métodos mencionados consta de la utilización de ácidos diluidos (ácido acético, clorhídrico, EDTA, sulfúrico), disolviendo de esta manera el carbonato de calcio, la utilización de estos ácidos es bastante eficaz como proceso de extracción. Uno de los procesos mencionados y de los más modernos es utilizar aire disuelto en agua presurizada, el proceso puede tardar unas dos horas y lograr la separación del 96% de las membranas y 99% del carbonato de calcio. También uno de los métodos de extracción más sencillos es la utilización de microondas, suponiendo que las membranas tienen gran cantidad de agua y utilizando este método se puede obtener una obtención rápida, pero tal vez no tan eficaz como métodos mencionados anteriormente.

1.4.3 Antecedentes Nacionales

En este caso la única referencia encontrada sobre extracción de ácido hialurónico a partir de membranas testáceas en el país, corresponde a una investigación realizada por Gómez. ¹⁶ (2022) “Extracción del ácido hialurónico a partir de las membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo mediante hidrolisis enzimática con pepsina” en la cual menciona que el método enzimático utilizado para la extracción fue exitoso, debido a que pudo identificar y también cuantificar los componentes presentes, además se realizaron pruebas cuantitativas satisfactorias con respecto a densidad, pH y también concentración de las muestras presentes. En este estudio se realizaron pruebas de identificación vía infrarrojo, demostrando la similitud de las bandas teóricas con respecto a las experimentales, mostrando la coincidencia y presencia de este tipo de estructuras en las diferentes muestras.

CAPÍTULO II- MARCO TEÓRICO

2.1 Características generales de la piel

El órgano más extenso del ser humano es la piel, es una barrera contra el medio ambiente y sus diversos factores (fuerzas mecánicas, factores químicos, radiaciones, cambios de temperatura, microorganismos y manifiesta signos y síntomas de enfermedades sistémicas, además, alta importancia en cuanto a funciones vitales y también metabólicas (síntesis de vitamina D, reserva de grasas, eliminación de desechos, equilibrio hidroelectrico), nervioso (asiento de receptores nerviosos: tacto, temperatura, presión, dolor) y psicológico (expresión de emociones, autoimagen y cosmética) ¹⁷.

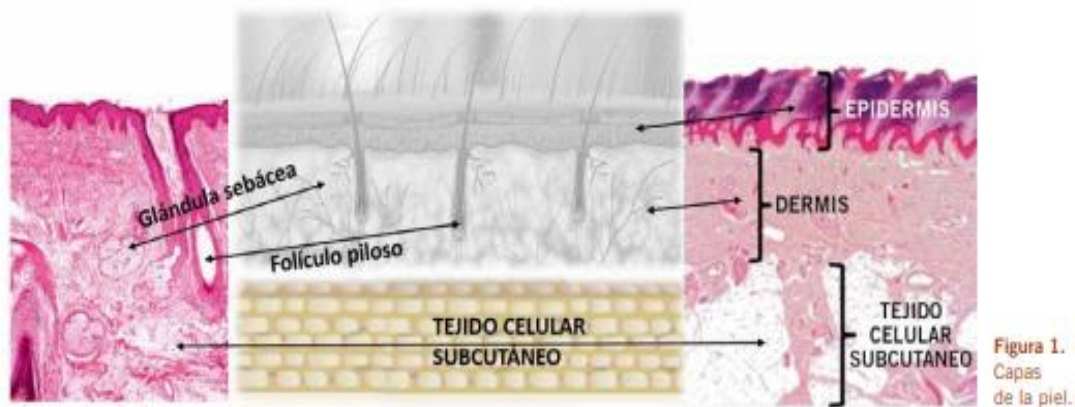
La función principal de la piel es construir una capa córnea protectora, eficaz, semipermeable, la cual brinde protección ante el medio al cual estamos expuestos. Esta barrera imposibilita la pérdida de fluidos corporales, como la entrada al organismo de sustancias peligrosas (microorganismos, radiación, tóxicos...). Para desempeñar estas funciones anteriormente mencionadas, la piel sintetizará numerosas proteínas y lípidos incluidos en la capa córnea a través de diversos procesos de diferenciación, logrando de esta manera el crecimiento de la piel en cuanto a recambio celular a través de los días y años en las personas¹⁸. Gracias a estos procesos se da el continuo crecimiento de la piel brindando de esta manera diferentes características como elasticidad, permeabilidad y protección.

2.2 Composición de la piel

La piel está constituida por tres capas bastante diferentes entre sí en cuanto en anatomía y función, pero con varias interrelaciones, estas capas son: epidermis, dermis e hipodermis (Fig. 1). La epidermis tiene un grosor desde 0,03 a 0,12 mm en piel fina y puede alcanzar 1,4 mm en la gruesa (palmas). De esta forma, la epidermis plantar y palmar son las zonas de la piel con mayor grosor, aunado a esto incorporan una capa extra conocida como estrato lucido¹⁷. El grosor de cada capa varía en función del área anatómica a la cual se esté refiriendo, teniendo de esta manera diversidad de grosor a lo largo de la extensa piel por todo el cuerpo humano.

Las células responsables de generar el recambio celular son las células madre, las cuales están presentes en todos los niveles de la piel y son uno de los principales pilares para entender la fisiología de este tejido. La principal característica de estas células es que poseen la capacidad de autorrenovarse y de esta manera poder dar origen a diferentes tipos celulares. Estas células madre también se ubican en glándulas sebáceas, infundíbulo y glándulas sudoríparas¹⁸. Gracias a la diferenciación que se produce en estas células permite la producción de células idénticas ayudando de esta manera al recambio celular, es decir, son las responsables de brindar el grosor y células sanas y adecuadas para los diferentes sectores del tejido.

Figura 1. Capas de la piel y elementos presentes en cada una de ellas.



Fuente: García y Alonso¹⁷

En cuanto al desarrollo a lo largo del tiempo de esta importante capa, la piel del neonato aunque parezca “madura” con respecto a su desarrollo anatómico, muchas funciones fisiológicas de la piel van a experimentar una maduración posnatal. Es importante recalcar que la piel de un neonato no es capaz de mantener la homeostasis, tampoco regular la temperatura; además de esto, es mucho más susceptible a infecciones. Estudios recientes demuestran diferencias marcadas con respecto a la piel adulta: se presenta un escaso desarrollo del estrato córneo, las uniones epidérmicas intracelulares son menos fuertes, se produce menor cantidad de sebo, también se presenta una menor cohesión entre dermis y epidermis, mayor pérdida transepidérmica de agua, la conductancia es mayor, es importante tener en cuenta que el pH de la piel de los neonatos es menor y también la piel es más fina¹⁷.

Dentro de las estructuras que se deben considerar con respecto a la piel, se encuentran los anexos cutáneos o partes adjuntas de la piel. Además de las uñas y los pelos (anexos queratinizados), se encuentran otro tipo de anexos debido a invaginaciones de la epidermis a lo largo de su desarrollo, dentro de estas estructuras se pueden mencionar: folículos pilosos, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas¹⁷.

Las células madre presentes en la piel tienen una gran importancia, se encuentran en gran cantidad, de manera proporcional a la superficie corporal, estas se pueden encontrar en la capa basal de la epidermis donde se diferencian a queratinocitos; en la parte inferior de la porción del folículo piloso se encuentran las células madre responsables de la regeneración del mismo; también en la papila dérmica se observan células que se diferencian hacia linaje neuronal y mesodérmico; otras se pueden ubicar en glándulas sebáceas, infundíbulo y glándulas sudoríparas¹⁷.

2.2.1. Epidermis

Es un epitelio plano poliestratificado y queratinizado, esta capa cubre la totalidad de la superficie corporal. Esta capa contiene el mayor número de células y posee una dinámica de recambio increíblemente amplia. Presenta un espesor variable, que va desde 0,1 mm hasta 1 o 2 mm, especialmente en plantas de los pies y palmas de las manos. Predominan queratinocitos en fase de diferenciación, que conforme se dividen, se van desplazando de la capa más interna a la capa más superficial, conteniendo cuatro diferentes estratos desde el interior hasta el exterior¹⁷.

a) *Capa basal o estrato germinativo*: es la capa más profunda, se separa de la dermis por medio de la membrana o lámina basal, y se encuentra anclada a ella por medio de hemidesmosomas. Posee una estructura compleja formada por cuatro espacios: membrana de las células basales, lámina lúcida, lámina basal y zona fibrosa o sublamina densa. Con respecto al nivel de células basales, se observan los hemidesmosomas, los cuales unen la epidermis a la lámina densa gracias a los filamentos de anclaje, constituidos principalmente por proteínas¹⁷.

Sobre la membrana basal, la capa basal presenta una monocapa de células cilíndricas o cúbicas, las cuales se caracterizan por poseer núcleo grande. Dentro de las células que se encuentran en esta monocapa se pueden mencionar: células madre indiferenciadas (poseen la capacidad de dividirse de manera ilimitada), células comprometidas (de rápida división, pero solo aportan queratinocitos) y células posmitóticas (no se dividen, estas células migran al estrato superior)¹⁷.

b) *Estrato espinoso o de Malphigio*: está formado por 8-10 capas de células espinosas, las cuales se mantienen unidas entre sí por medio de estructuras en forma de espina y con puentes intercelulares por los que se comunican con células adyacentes y constituidos por proteínas como filamentos de queratina, plaquitas y desmogleínas. Estas células contienen alta cantidad de ADN, ingrediente necesario para el proceso de síntesis proteica, que dará como resultado la producción de queratina¹⁷.

c) *Estrato granuloso*: en este nivel, inicia el proceso de queratinización, este estrato está constituido por 3-5 capas de células romboidales, aplanadas, en forma de diamanta, que contienen gránulos de queratohialina (ligados al citoesqueleto celular y a la producción de queratinas K2 y K11 y gránulos lamelares, los cuales contienen fosfolípidos, ceramidas y glicolípidos que cuando se depositan en la superficie de la piel, tienen una función de “pegamento” manteniendo las células unidas entre sí y de esta manera se forma la probarrera lipídica, una de las estructuras responsables de la impermeabilización de la piel¹⁷.

d) *Estrato lúcido*: esta capa se encuentra de forma selectiva en las plantas de los pies y palmas de las manos, expuestas con regularidad a situaciones que involucran fricción y desgaste. Consta de 2-3 capas de queratinocitos bastante aplanados, los cuales carecen de núcleo y presentan un citoplasma rico en una sustancia gelatinosa llamada eleidina, precursora de la queratina. Contiene gran cantidad de lipoproteínas y su principal función es evitar la entrada o salida de agua¹⁷.

e) *Estrato córneo*: porción más superficial y ancho de la epidermis, también es la capa que presenta mayor variación en cuanto a grosor. Es el resultado de la diferenciación terminal de los queratinocitos epidérmicos. Tiene un papel fundamental en la defensa de la piel y juega un papel clave en la función de barrera

frente a diferentes agresiones y situaciones bruscas que puedan generarse en la piel causadas por factores externos. Está formada por 20-30 capas de células escamosas, aplanadas y sin núcleo, con la curiosidad de que las células en esta capa están muertas. A estas células se les conoce como corneocitos y tiene una orientación y orden en forma de tejas, las cuales continuamente se desprenden. Se puede observar dos subcapas en este estrato, una subcapa cornea compacta, densa, cohesiva, más profunda; y la otra subcapa, más laxa, presenta menor cohesividad, la cual a medida que se hace más externa se pierde la adhesividad de sus células, momento en el que se deteriora la adhesión de las células y por último se produce la descamación de las mismas¹⁷.

Dentro de las células que están presentes en esta capa se encuentra: queratinocitos, células de Langerhans, melanocitos y células de Merkel. Los queratinocitos son el grupo celular predominante en esta capa, con un 80% del total de las células epidérmicas. Estas células se originan en la capa basal, zona donde son altamente proliferativos y a medida que maduran y ascienden en la epidermis, pierden de manera progresiva el potencial replicativo y experimentan apoptosis (muerte celular programada). En esa última fase es donde las células se tornan como queratinocitos sin núcleo (corneocitos) y contienen filamentos de queratina. La descamación es el resultado final¹⁷.

El proceso completo se denomina queratinización, el recambio celular de la totalidad de la capa epidérmica es acompañada de diferentes procesos o transformaciones radicales del queratinocito y se finaliza en un periodo cercano a los 30 días, desde el primer paso donde se produce la división celular, hasta que la célula cae desprendida de la superficie de la piel generando un proceso conocido como descamación¹⁷.

Dentro de las sustancias sintetizadas por las células a lo largo de este ciclo, cabe destacar varios tipos de queratina, las cuales son proteínas estructurales de los queratinocitos. Estas sustancias son insolubles en agua y con una gran resistencia frente a cambios en el pH, altas temperaturas y resistencia a la degradación enzimática. El aminoácido de mayor importancia de la queratina es la cisteína. Presentan puentes disulfuro los cuales aportan fuerza y rigidez a la estructura, esta rigidez es directamente proporcional a la cantidad de

puentes formados. Se subdividen en dos grupos: queratinas duras y blandas. Las queratinas duras o alfa forman parte del pelo y uñas, mientras que las queratinas beta pertenecen a elementos esenciales de la capa córnea¹⁷.

El proceso de queratinización presenta diferentes etapas, empezando por la división celular o mitosis que ocurre en el estrato basal o germinativo, debido a este proceso una célula de forma cúbica permanece, mientras que la otra asciende hacia la superficie de la piel, dando continuidad al proceso. Después la célula sube al estrato espinoso, cuando se incorporan a la parte más externa de esta capa, las células empiezan a producir gránulos de queratohialina y también cuerpos lamelares¹⁷.

Desde ahí, las células son empujadas hacia el estrato granuloso, lugar donde adoptan una forma plana y en forma de diamante. Después avanzan al estrato córneo, donde se aplanan con mayor intensidad y pierden las organelas y el núcleo. Finalmente, las células cornificadas o corneocitos alcanzan la superficie de la piel, en este momento, las células se interconectan entre sí mediante corneosomas y se amontonan en capas, formando de esta manera el aspecto típico que presenta el estrato córneo. La red más externa se forma entonces de corneocitos y matriz lipídica extracelular, y son descamados a través de la rotura de los desmosomas¹⁷.

Otra de las células involucradas en esta capa de la piel son los melanocitos, células dendríticas que se encuentran entre las células basales y el folículo piloso. Representa un 10% del total de las células epidérmicas, son responsables de la producción de melanina, responsable de la pigmentación de la piel. La luz UVB estimula la producción de melanina, la cual tiene propiedades fotoprotectoras de manera natural. Hacen contacto con los queratinocitos por medio de sus dendritas, la proporción de estas células es cercana a una por 36-40 queratinocitos o un melanocito por cada 9 células basales¹⁷.

El melanocito posee prolongaciones de su propio citoplasma donde se forma la melanina, proceso conocido como melanogénesis. Se pueden identificar dos tipos de melanina: de color marrón (eumelanina) y de color amarillento-rojo (feomelanina). La síntesis de estas sustancias está condicionada por varias enzimas, dentro de estas destaca la tirosinasa, la actividad de la enzima está condicionada por la unión de la MSH (hormona estimulante de melanocitos) al receptor que se encuentra en la membrana de los

queratinocitos. Este receptor presenta hasta 5 variantes, la respuesta en la producción de melanina (eumelanina o feomelanina) va a depender del estímulo a los receptores, lo que finalmente determina la respuesta a la luz solar por parte de la persona¹⁷.

Después de la formación de la melanina, se da una transferencia de esta en forma de melanosomas hacia los queratinocitos adyacentes. Los diferentes tonos de piel van a depender de las diferencias en la actividad de los melanocitos, las características de los melanosomas, la capacidad de transferir los melanosomas a los queratinocitos, cantidad de melanina y tamaño y densidad de los melanosomas transferidos¹⁷.

Las células de Langerhans representan entre un 3 y 8% de la población celular de esta capa y se localizan en el estrato espinoso. Son células dendríticas, las cuales conforman la primera línea defensiva de la piel y también tienen un papel fundamental en la presentación de antígenos. Forman parte del sistema mononuclear fagocítico y están involucradas en muchos tipos de respuesta inmune, por medio de la activación de las células T. Estas células presentan una característica inusual, al poseer un gránulo en forma de gusano o raqueta, conocido como gránulo de Birbeck¹⁷.

Este tipo de células captan antígenos en la piel, los cuales son procesados en compartimentos específicos y especializados. Después de unas horas, las células aumentan su tamaño, abandonan la epidermis para tomar el camino hacia la dermis, donde entran a los vasos linfáticos dérmicos, de ahí se dirigen hacia las áreas para corticales de los ganglios linfáticos de drenaje, lugar donde presentan al antígeno a las células T, generando de esta manera respuestas específicas y productivas en estas células¹⁷.

Por último, teniendo menor presencia en esta capa, las células de Merkel son células epidérmicas, se encuentran en el estrato basal, directamente sobre la membrana basal. Presentan una función sensorial como mecano receptores, y se sitúan en lugares con sensibilidad táctil alta como lo son pulpejos, palmas, plantas, mucosa oral y genital. Se encuentran unidos por medio de desmosomas con los queratinocitos adyacentes y también poseen filamentos de queratina¹⁷.

2.2.2 Dermis

Esta estructura proporciona soporte, resistencia, elasticidad y también capacidad de adaptación a movimientos y cambios de volumen. Constituye la mayor masa de la piel y el grosor máximo que llega a alcanzar es de 5 mm. Tiene conexión con la epidermis a nivel de la membrana basal, esta capa contiene colágeno y también fibras elásticas. La matriz extracelular contiene una elevada proporción de glicosaminoglicanos tales como: ácido hialurónico, proteoglicanos y glicoproteínas. Es un tejido vascularizado, el cual proporciona soporte y también alimento a la epidermis. Dentro de las estructuras que contiene se encuentran: vasos sanguíneos, linfáticos, nervios sensitivos, músculos, folículos pilosebáceos y glándulas sudoríparas¹⁷.

Dentro de las células presentes en esta capa se pueden mencionar: fibroblastos, histiocitos, mastocitos o células cebadas, adipocitos, linfocitos, células plasmáticas, eosinófilos y monocitos, aunque el número de células en esta capa es escaso. Los fibroblastos se diferencian a fibrocitos, los cuales al enlazarse uno con el otro, generan una red tridimensional. En este punto se da la síntesis y liberación de precursores de colágeno, elastina y proteoglucanos para construir de esta manera la matriz extracelular¹⁷.

Los histiocitos son macrófagos tisulares, los cuales están implicados con la respuesta inmune. Otra de las células presentes son los mastocitos, los cuales son células inflamatorias que se encuentran en las áreas perivasculares de la dermis y segregan sustancias vasoactivas y proinflamatorias implicados en la respuesta inflamatoria, remodelación del colágeno y también en la curación de heridas. Los adipocitos presentes en esta capa presentan diferencias con respecto a los adipocitos presentes en el tejido subcutáneo. Estas células tienen funciones con respecto al aislamiento de estructuras dérmicas, depósito de energía, regeneración del folículo piloso y además participa en la curación de heridas¹⁷.

Otra de las estructuras presentes en esta capa es la matriz extracelular o también conocido como sustancia fundamental, la cual representa el espacio libre entre los elementos fibrosos y celulares. Se encuentra constituido por un fluido gelatinoso en el cual las células se pueden movilizar con libertad. Es una sustancia amorfa que está compuesta principalmente por proteoglicanos, los cuales, debido a su gran capacidad para absorber agua, forman de esta

manera una materia pegajosa y gelatinosa, que funciona como elemento de unión entre el resto de elementos, tanto fibrosos como celulares, y también tienen influencia en la migración y diferenciación celular¹⁷.

El colágeno es el principal componente de la dermis. Existen 13 tipos de colágeno, por lo que no es homogéneo en todo el cuerpo, su variación obedece a morfología, composición de aminoácidos y también de sus propiedades físicas. Esta capa de la piel contiene principalmente colágeno tipo I (85-90%), tipo III (8-11%) y tipo V (2-4%). Las fibras elásticas proporcionan las propiedades retráctiles de la piel y representan de un 2-4%¹⁷. Estas fibras están constituidas por fibrilina y elastina, la fibrilina es una glicoproteína esencial para la formación de fibras elásticas del tejido conectivo.

La combinación del tejido fibroelástico, células dérmicas y matriz extracelular en la dermis, genera dos áreas diferentes, sin una clara demarcación o límite entre ellas, por un lado se encuentra la dermis papilar o capa papilar, la cual es más delgada, tiene contacto con la epidermis y está constituido por tejido conectivo laxo. Las proyecciones que presenta esta capa se denominan papilas dérmicas donde se encuentran las asas capilares (sistema circulatorio), estas proporcionan los nutrientes a la epidermis avascular. La capa papilar contiene terminaciones nerviosas, vasos linfáticos y también receptores sensoriales¹⁷.

Por otra parte, pero adyacente a la capa anterior, se encuentra la dermis reticular, la cual se encuentra en una zona más profunda, de mayor grosor, menos celular y contiene tejido conectivo bastante denso. El nombre de esta capa se ve reflejado por el entramado o retícula de las fibras colágenas que forman gruesos haces los cuales se entrelazan con otras fibras elásticas¹⁷.

2.2 Proceso de envejecimiento

El envejecimiento es un proceso biológico, normal, irreversible, progresivo, intrínseco y universal que con el pasar de los días se da de forma normal en todos los seres vivos como consecuencia de la interacción del individuo con el medio ambiente del cual está rodeado. “Podrían también definirse como todas las alteraciones que se producen en un organismo con el paso del tiempo y que conducen a las pérdidas funcionales y a la muerte”¹⁹. Este tipo de alteraciones pueden tener diferentes causas, las cuales van degenerando los diferentes órganos y sistemas involucrados en el funcionamiento normal de los seres vivos.

Actualmente, el envejecimiento se liga a la desorganización celular por el estrés oxidativo causado por los radicales libres y otras especies reactivas del oxígeno. Este daño se produce durante el metabolismo aerobio en la cual se producen de manera incidental especies radicales del oxígeno, dañando de esta manera a diferentes macromoléculas, acumulando este daño durante el tiempo, produciendo de esta manera pérdida gradual de los diferentes mecanismos homeostáticos presentes y pérdida de la capacidad funcional de la célula, conduciendo al envejecimiento de la misma y su posterior muerte¹⁹. Existen diferentes factores extrínsecos e intrínsecos involucrados en el aumento de estos radicales libres y también existen otras causas de envejecimiento de la piel.

Es importante reconocer los dos tipos de envejecimiento: el intrínseco (conocido como cronológico), este depende de la edad cronológica de la persona, y el extrínseco, el cual da lugar a la diferenciación entre la edad cronológica (determinada por la fecha de nacimiento) y la edad aparente (la edad que perciben las demás personas sobre uno). El envejecimiento de la piel ocasiona pérdida de calidad y grosor de la dermis, lo que ocurre es que las papilas dérmicas se aplanan, causando de esta manera una disminución en la llegada de nutrientes a la epidermis, así como pérdida de la resistencia a la deformación²⁰.

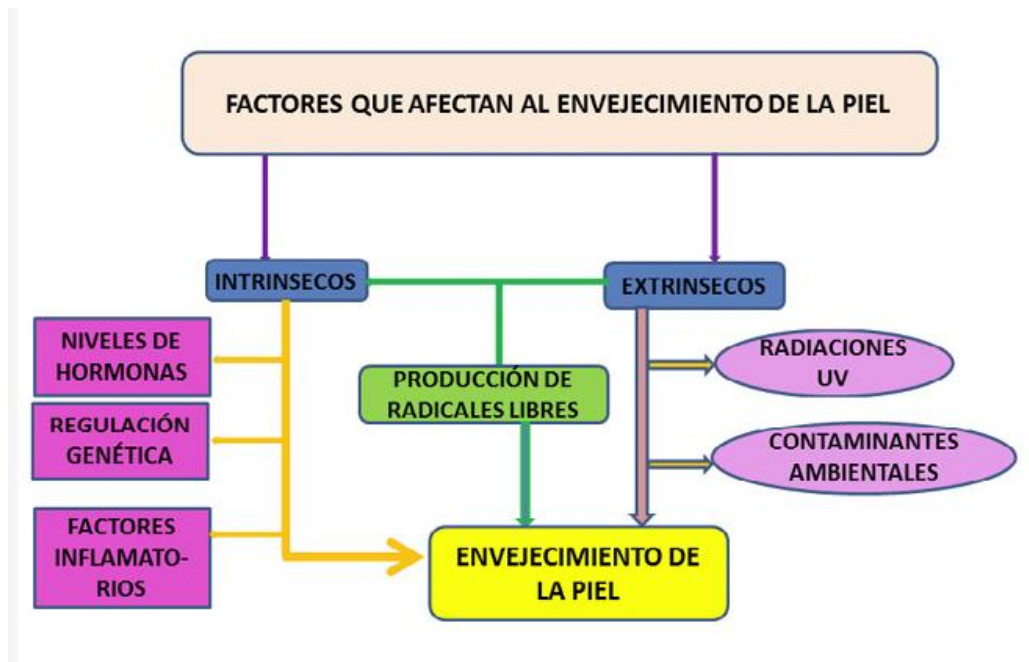
Con respecto al envejecimiento intrínseco, este se produce en la piel como una serie de cambios morfológicos, finas arrugas, neoplasias benignas, disminución de queratinocitos basales, lo que dificulta la cicatrización de heridas, además de disminución del contenido acuoso de los tejidos con el paso del tiempo, disminuyendo de esta manera el estado de

hidratación y de la piel, y por lo tanto, su función como barrera además de disminución de la elasticidad de la misma ²⁰. Uno de los objetivos primordiales en la prevención del envejecimiento cutáneo es procurar la hidratación normal del tejido, debido a que es un factor muy importante, tanto desde el punto de vista fisiológico como estético.

En cuanto al término de foto envejecimiento hace relación a describir diferentes procesos fisiológicos e histológicos producidos por exposición prolongada o crónica a la radiación solar. Su importancia dermatológica radica con respecto a la incidencia de las alteraciones cutáneas relacionadas a este proceso y también por la estrecha relación que presenta con el cáncer de piel. Este factor es responsable de la aspereza de la piel, las arrugas, color amarillento, telangiectasias, pigmentación irregular, y gran variedad de neoplasias benignas y malignas²¹. En la figura 2 se muestran diferentes causas de envejecimiento tomando en cuenta factores intrínsecos y extrínsecos. Todas estas condiciones se ven potenciadas por el deterioro del epitelio cutáneo asociado a la exposición prolongada a la radiación ultravioleta.

La característica histológica más importante en este caso es la elastosis dérmica la cual se caracteriza por la desaparición de las fibras elásticas de la dermis, disminuyendo el colágeno y también aumenta la presencia de proteoglicanos, pero disminuye glicosaminoglucanos como ácido hialurónico y dermatan sulfato; esta disminución del ácido hialurónico es responsable de la disminución de turgencia (deshidratación) y elasticidad de la piel, aparición de arrugas y alteración de la microcirculación dérmica de la zona ²¹. Lo mencionado anteriormente explica los diferentes procesos fisiológicos e histológicos que se producen en la zona, determinando de esta manera la condición de la misma.

Figura 2. Factores que influyen en el envejecimiento cutáneo.



Fuente: Ruiz y Morales²⁰

Cabe señalar la importancia que tienen los radicales libres, debido a que el aumento en la producción de estos, fomenta un aumento de la rigidez de las membranas celulares y tejido conectivo, lo cual lleva a una disminución del aporte de sangre a los órganos y tejidos con la consiguiente disminución en la perfusión tisular, para disminuir este tipo de restos citotóxicos producidos por reacciones oxidativas, las cuales son necesarias para la vida, los seres vivos han evolucionado para contrarrestar este crecimiento con varios mecanismos como detoxificación, reparación del ADN, antioxidantes naturales, depuradores de radicales libres, enzimas y sistemas de degradación proteica²¹.

2.3 La gallina

La gallina doméstica pertenece al orden de las gallináceas, se trata de aves terrestres cuyas principales características son: cuerpo pesado en relación a la altura, pico fuerte, corto

y ligeramente curvado, alas robustas, las cuales no les permite volar alto ni largo, patas cortas, gruesas y bastante fuertes, armadas con uñas aptas para escarbar y triturar, además de un espolón que se encuentra en la parte posterior. Existen muchas razas de gallinas, las aves criollas son aquellas propias de un lugar del cual han desarrollado diferentes características para su supervivencia²².

Las aves de carácter criollo son aves explotadas con escasas prácticas de manejo, de fenotipo variado y rústico, debido a que proviene de procesos espontáneos de la mezcla entre aves europeas, americanas modernas y asiáticas. La gallina (*Gallus gallus domesticus*) es una especie distribuida a nivel mundial. Existen evidencias arqueológicas donde remontan la domesticación del gallo rojo selvático en Pakistán y China alrededor de los años 7400-8000 a.c.²².

Tabla 1. Clasificación taxonómica de las gallinas

Reino	Animal
Sub reino	Metazoos
Tipo	Vertebrados
Clase	Ovíparo
Orden	Galliformes
Familia	Phasianidae
Género	Gállidos
Especie	<i>Gallus gallus</i>

Fuente: elaboración propia basada en la referencia ²².

Dentro del mundo de las aves se han distinguido variedades como:

- Comerciales productoras de huevos (razas ligeras)
- Comerciales productoras de carne (razas pesadas)
- Productoras de huevo y carne (doble propósito)
- Variedades criollas o locales
- Variedades mejoradas

Las razas productoras de huevos son resultado de una cuidadosa selección genética, se trata de razas muy delicadas adaptadas a explotación en granjas, y que por su alta productividad requieren una alimentación balanceada y también de un control sanitario controlado, de esta manera las gallinas tendrán una correcta producción de huevo, además de conservar su salud y que no mueran. Estas gallinas no son tan aptas para producir pollitos, debido a que es raro que enluequen y se conoce que no son buenas madres. Son aves relativamente pequeñas, pero producen huevos grandes²².

Dentro de las características deseables de las aves productoras se encuentran: capacidad de producir huevos en altas cantidades y de forma persistente, rápido desarrollo de la madurez sexual y estructura corporal adecuada para la postura, eficiente capacidad para convertir los alimentos en huevos, buen tamaño del huevo con cáscara firme y buena calidad interna, resistencia a enfermedades y color adecuado de la cáscara²².

El máximo desempeño con respecto a producción de huevos radica en el conocimiento de los animales, básicamente con el entendimiento de la anatomía y funcionamiento de los diversos sistemas involucrados en la gallina. Con estos conocimientos los productores pueden maximizar la producción de huevos, debido a que por medio de esto se conocen diversos factores que pueden afectar directamente el desempeño la puesta de huevos, por ejemplo, el manejo de la luz para promover la producción de huevos²².

Las aves son vertebrados de sangre caliente, estos animales son sucesores de los reptiles, los cuales son poiquilotermos, es decir, de sangre fría, lo cual significa que la temperatura corporal no es regulada y por lo general, corresponde a la del ambiente. Las aves, aunque son sucesores de estos animales son de sangre caliente. Su temperatura corporal es relativamente alta y por lo general permanece de forma constante. También son endotermos,

tienen la habilidad de generar calor corporal de forma interna para producir un aumento en su temperatura corporal²².

2.3.1 Proceso de formación del huevo

El gasto y balance de energía en las gallinas de postura, depende en gran medida de las demandas de la producción del huevo y la ausencia de consumo de alimentos durante las horas de la noche. La formación del huevo inicia gracias a diferentes estímulos del sistema nervioso y endocrino, manteniendo y coordinando este proceso y sincroniza las demandas de energía necesarias para la producción final del huevo. Este trabajo demanda costos nutricionales, por esta razón, existe una relación entre el consumo de alimento y la producción de huevo, además tiene relación con el ciclo de ovulación de la gallina que incluye un mecanismo de control, y discute el control hormonal del metabolismo de carbohidratos y lípidos en la gallina de postura²³.

Los requerimientos nutricionales para que se pueda generar la postura del huevo son considerables. Dentro de estos incluye energía para transferir nutrientes al huevo (aproximadamente 79,59 Kcals/día), y también gastos energéticos de la gallina durante el proceso de la síntesis del huevo y sus componentes, lo cual equivale a un intervalo entre 81,26-95,69 Kcal. Dentro de los costos para la producción del huevo se encuentran:

- Síntesis de ácidos grasos, precursores de la yema (aminoácidos, fosfatos y ácidos grasos), y proteínas de la albumina.
- Transporte de los precursores al huevo
- Formación del cascarón
- Movimiento del huevo a través del oviducto
- Mantenimiento de los órganos reproductivos²³.

De manera cuantitativa no es posible obtener un valor exacto para determinar la cantidad de energía necesaria que se utiliza para producir un huevo. Los costos de transporte de precursores al ovario y tracto reproductivo pueden ser estimados tomando en cuenta la circulación de sangre que se transporta por estos órganos. Aproximadamente el 0,7% del gasto cardiaco es suministrado al ovario, y 15,4% se dirige al oviducto. En gallinas con raza

de bajo peso se ha observado que los costos energéticos de la producción de un huevo se aproximan a los 160,30 Kcals, y que este gasto es cubierto por un aumento en el consumo de alimento conforme la gallina entra en ovoposición²³.

La relación entre el consumo de alimento y la necesidad de energía para la producción del huevo es sumamente controlada con respecto a que el peso de la gallina permanezca constante a través de la fase de postura del huevo. Esto hace referencia a los cambios que se pueden generar durante las diferentes fases de ovulación y ovoposición, cuando las necesidades de nutrientes varían. Se ha observado un menor consumo de alimentos cuando las gallinas no se encuentran en periodos de ovulación y ovoposición²³.

El requerimiento proteico que requieren las gallinas de postura está en función de las necesidades de su propio mantenimiento, así como la formación del huevo. EL contenido promedio de proteína en un huevo es cerca de 6 gramos, mientras que su mantenimiento 3-4 gramos/día basado en pollos adultos. El consumo de proteínas en el alimento de las gallinas, aumenta la velocidad de producción de huevos²³.

2.3.1.1 Formación de la yema

Es un proceso también conocido como vitelogénesis. Las proteínas de la yema tienen una estrecha relación con los lípidos, las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) se encuentran en mayor proporción con respecto a la materia seca, y se encuentran suspendidas dentro del sistema acuoso presente en la yema. Los lípidos del cuerpo de la gallina son agregados para la formación de esferas y gránulos en la yema, este tipo de lípidos se encuentran como fosfivitinas y lipovitelininas. La totalidad de las proteínas de la yema son sintetizadas fuera del ovario. Se diferencian dos tipos de VLDL, las grandes originadas en el intestino (LDF-1), y las pequeñas provenientes del hígado (LDF-2)²³.

Tanto los enterocitos como los hepatocitos forman una apoproteína B, la cual tiene una relación estrecha con las VDLS. Los estrógenos permiten a los hepatocitos la capacidad de transcribir la apoproteína, también aumentan la formación total de las VLDL hepáticas, esto para incrementar la síntesis de ácidos grasos. La vitelogenina es una lipoproteína de baja

densidad que es formada exclusivamente por los hepatocitos, de esta molécula se deriva la lipovitulina y fosfivitina²³.

La vitelogenina se clasifica como una glicolipoproteína, teniendo propiedades de azúcar, grasa y proteína; es precursor de lipoproteínas y fosfoproteínas, las cuales constituyen la mayor proporción en cuanto a proteínas pertenecientes a la yema. La fase acuosa presente en la yema contiene las α - y β livetinas, estas moléculas inmunológicas reaccionan con la albúmina del plasma y la transferrina, y ambas son sintetizadas en los hepatocitos. Este tipo de moléculas forman parte de inmunoglobulinas Gs las cuales surgen a partir de los linfocitos B²³.

Con respecto al proceso de transporte de sustancias desde su origen hacia el ovario, el sistema vascular es el responsable de generar este proceso. Las lipoproteínas formadas por estímulo de estrógenos, son depositadas en el huevo, debido a que otros tejidos del organismo del animal se encuentran limitados para hacer funcional este tipo de compuesto. La pared del folículo posee diferentes estructuras encargadas de la recolección de lipoproteínas circulantes y transferirlas al interior del óvulo²³.

2.3.1.2 Formación de la albúmina

Las proteínas de la albúmina son sintetizadas por células localizadas en el oviducto. Las células caliciformes epiteliales forman la albúmina densa, avidina y la mucina, mientras que las células tubulares forman la albúmina acuosa o líquida, ovoalbúmina y la lisozima; la mucina constituye aproximadamente el 2% del total, la inmunoglobulina A se encuentra en pequeña cantidad y proviene de los linfocitos B. Los huevos se mueven a través del oviducto por medio de peristalsis, mientras que la compresión de la mucosa ayuda a liberar albúmina de forma inmediata enfrente del huevo, para fomentar su movimiento²³.

Las células tubulares son extensivas y se orientan en cuerdas de tipo espiral, de tal manera que la peristalsis rodea la masa huevo-albúmina durante todo el trayecto. La mucina es liberada en forma de fibrillas y segregadas mientras dan vuelta (girando), creando de esta manera albúminas densas y acuosas en forma de esfera, con otras moléculas conocidas como chalazas, las cuales mantienen los componentes estructurales del huevo en su lugar²³.

El flujo de sangre se incrementa de manera drástica durante 2-3 horas en las que el huevo está presente, también es ayudado por la motilidad generada gracias el peristaltismo y las estructuras ciliares que se encuentran el oviducto; esta última estructura mencionada se mantiene de manera dependiente de los esteroides presentes en el ovario, de hecho estas hormonas son tan esenciales en el oviducto para desarrollar y retirar la albúmina, como lo son en el hígado para la síntesis de la yema²³.

2.3.1.3 Síntesis de esteroides

Este proceso se origina en la pared del folículo. El estradiol y la progesterona son producidos por las células de la teca y granulosa respectivamente; por otra parte, la testosterona es producida por ambas. El desarrollo folicular y la formación de esteroides es coordinado por las hormonas peptídicas presentes en el hipotálamo. La hormona folículo estimulante estimula el desarrollo de la granulosa en pequeños folículos, conforme la maduración progresa, la hormona luteinizante promueve la síntesis de progesterona²³.

Las células de la teca en el huevo maduro liberan una proteasa en respuesta a la hormona luteinizante, la cual determina la ovulación por efecto de la liberación del folículo ovulatorio. Los esteroides producidos por parte de cada folículo entran en el torrente sanguíneo, los diferentes procesos que se dan previo a la ovulación, tienen un efecto en la liberación total de los esteroides, aproximadamente 4 horas antes de la separación formal, este tipo de oleadas cíclicas de esteroides contribuyen al mantenimiento normal de la ovulación, de esta manera garantiza una formación continua de huevos²³.

2.3.1.4 Formación del cascarón

La glándula del cascarón de las aves o también conocido como útero, es un tejido especializado en el transporte de calcio, sustancia requerida para la correcta formación del cascarón y representa un fenómeno biológico único. El cascarón del huevo es formado durante su pasaje a través del oviducto con una duración de 24-25 horas. Posterior a la fertilización del huevo, se forma la capa perivitelina y las membranas testáceas, también se forma la cuermatriz orgánica responsable de la estructura del cascarón²³.

Cuando el huevo ingresa a la glándula del cascarón por un tiempo estimado de 21 horas se da el proceso de deposición de calcio. Este sugiere que la formación del cascarón es uno de los procesos de biomineralización más rápidos en la naturaleza. La deposición de carbonato de calcio es acompañada por cambios en flujos de otros minerales como: potasio, magnesio y glucosa dentro; mientras que el sodio y cloro fuera del fluido de la glándula del cascarón, en tanto recirculan dentro de la mucosa gracias a un sistema de transporte activo²³.

En la glándula del cascarón, los genes responsables de codificar proteínas pueden ser regulados por estímulos hormonales y no hormonales. El flujo de calcio es considerado uno de los estímulos principales de carácter no hormonal, que afecta la expresión de los genes. Se ha propuesto que el esfuerzo mecánico proporcionado por la entrada del huevo a la glándula del cascarón puede también afectar de alguna manera la expresión de genes del cascarón²³.

2.3 Huevo de gallina

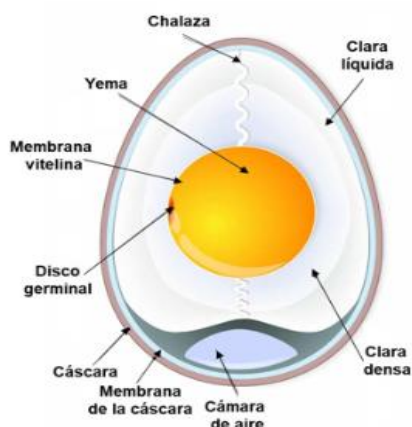
2.3.1 Características generales del huevo

El huevo es un alimento muy común y accesible, además de delicioso, el cual contiene diferentes nutrientes para el organismo, particularmente proteínas, lípidos, minerales y vitaminas de alta calidad. Tiene alto contenido de proteína con un 11,0-13,8%, también lípidos (8,5-12,0%) y agua en su mayoría (74,4-88.7%)²⁴. La proteína es de alto valor biológico, rica en aminoácidos esenciales, los cuales fomentan la síntesis y conservación de la masa muscular, relevante para atletas y adultos mayores. Las proteínas contenidas en la clara son principalmente ovoalbúmina, ovotransferrina y ovomucoide; además de lisozima, avidina y ovomucina, esta última mencionada se encarga de la viscosidad de la clara²⁵.

La calidad del huevo empieza por estar libre de contaminación microbiana, sus características externas son valoradas en función del estado de su cáscara (forma, textura, firmeza, limpieza y color), mientras las características internas son evaluadas comercialmente por iluminación en el ovoscopio, prueba en la cual se revela el tamaño de la cámara de aire, color y movilidad de la yema. El color que presenta la clara debe tener un

aspecto traslúcido, ligeramente opaco, en un estado de gel, además de ser libre de manchas de sangre y también carne²⁶. Con respecto a la yema, presenta un color homogéneo desde tonalidades amarillas hasta naranja brillante, y está fija en el centro del huevo por medio de las chalazas, estructuras mostradas en la Figura 3.

Figura 3. Partes de la estructura del huevo de gallina.



Fuente: Ramírez et al.²⁶

2.3.2 Composición química del huevo

El huevo se destaca por tener dentro de su composición amplia gama de vitaminas (A, B2, D, E) y minerales (fósforo, selenio, yodo y zinc) los cuales cubren parte de la ingesta diaria, mientras que la acción antioxidante de algunas vitaminas y oligoelementos presentes en el huevo ayudan a proteger el organismo de diferentes procesos degenerativos²⁷. Evitando de esta manera la producción de radicales libres y ayudando así a contrarrestar procesos de envejecimiento, por ejemplo. En la figura 4 se muestran los componentes del huevo de forma individualizada, para un huevo que pesa aproximadamente 100 gramos.

Figura 4. Componentes del huevo de gallina y masa respectiva.

Componentes	Unid.	Huevo/(100g)
Agua	g	76,15
Energía	g	143
Proteína	g	12,56
Lípidos totales	g	9,51
Carbohidratos	g	0,72
Fibra dietaria	g	0,00
Vitamina A	ug	160
Tiamina	mg	0,04
Riboflavina	mg	0,46
Ácido fólico	ug	47
Vitamina B-6	mg	0,170
Colesterol	mg	372
Humedad	g	74,00
Fósforo, P	mg	198
Hierro, Fe	mg	1,75
Zinc, Zn	mg	1,29

Fuente: Mora²⁷

Figura 5. Valor nutricional del huevo de gallina.

Nutriente	Unid.	Huevo 100g
Acidos grasos	g	4,327
Colesterol	mg	212,5
Lecitina	g	1,15
Vitaminas		
A	UI	317,5
D	UI	24,5
E	mg	0,525
B12	mcg	0,5
B1	mg	0,031
B2	mg	0,254
B3	mg	0,036
B5	mg	0,627
B6	mg	0,070
B9	mg	23,5
Biotina	mcg	9,98
Colina	mg	215,06
Minerales		
Calcio	mg	24,5
Hierro	mg	0,72
Magnesio	mg	5
Fosforo	mg	89
Potasio	mg	60,5
Sodio	mg	63
Zinc	mg	0,55

Fuente: Mora²⁷

2.4 Membranas testáceas

Las membranas presentes en el huevo se encuentran, tanto dentro del huevo como fuera del mismo, también son conocidas como membranas intersticiales, membranas testáceas o fáfarras. Estas membranas rodean el albumen y proporcionan protección con respecto a bacterias, además de representar materia prima para diversas aplicaciones investigadas en varios estudios anteriormente ¹¹. Este tipo de membranas son fácilmente apreciables en el momento de abrir el huevo, tienen un aspecto blanquecino opaco, y se observa que están adheridos al interior de la cáscara.

Este tipo de membranas ha demostrado eficacia en cuanto al tratamiento del control del dolor en pacientes con dolores articulares y también rigidez. La membrana de la cáscara del huevo se compone principalmente de proteínas fibrosas de colágeno de tipo I, V y X. También dentro de su composición contiene glicosaminoglicanos, como el sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, hexosaminas como la glucosamina²⁸. Dentro de los glicosaminoglucanos que se pueden mencionar en este caso y como concepto importante es el ácido hialurónico.

Existe un alto contenido de ácido hialurónico en estas membrabas testáceas, debido a esto y a la diversa composición de las membranas testáceas, se convierten en un tratamiento natural y efectivo contra la osteoartritis y dolores crónicos en articulaciones, especialmente en el dolor de rodilla. Sin embargo, algunos estudios han demostrado prometedores resultados en la mejora de la funcionalidad de la articulación de la rodilla, no obstante, se evidencia falta de conocimiento en cuanto a dosis²⁸. Recordando que se debe tener amplio conocimiento en cuanto a dosis para llegar a un nivel terapéutico estable y que genere disminución de los síntomas, de la misma manera que no genere efectos adversos.

Las membranas testáceas del huevo son un tipo de membrana interna de tipo proteica, la cual es rica en colágeno y elastina, tomando en cuenta que estos dos componentes representan cerca del 15% del total de la composición de la membrana, además con una proporción de 1:1. Después de la digestión humana es fácilmente convertible a pequeños aminoácidos moleculares los cuales son bastante sencillos de absorber a lo largo del tracto digestivo²⁹. También son proteínas de alta calidad, al mismo tiempo, las membranas testáceas

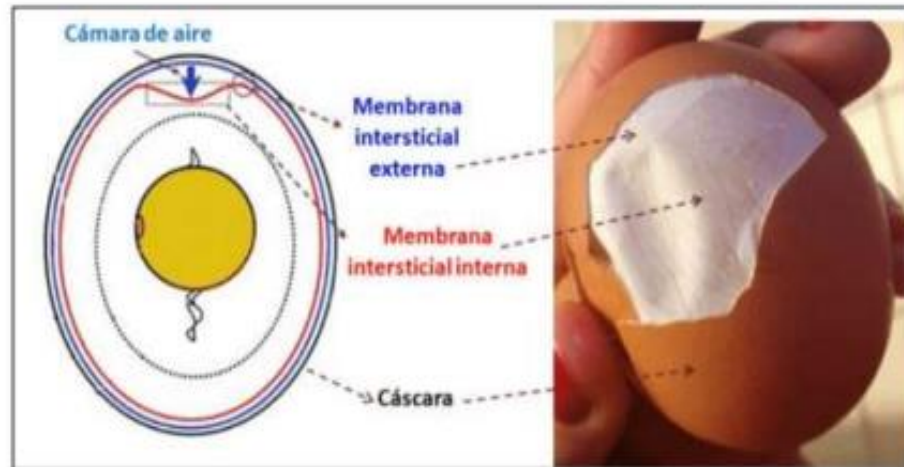
son bastante conocidas y utilizadas durante hace mucho tiempo por la medicina tradicional China, su conocimiento ha evidenciado buen valor medicinal y también sanitario.

El componente principal de la membrana del huevo es proteína, pero también contiene pequeñas cantidades de carbohidratos y lípidos. La proteína principal contenida en la membrana es colágeno tipo I. La membrana testácea es un tipo de doble membrana insoluble en agua, la cual se divide en membrana interna y membrana externa. Esta membrana se encuentra unida a una estructura de red de fibra entrelazada, y se distribuyen muchos poros diminutos a lo largo y ancho de la misma, estos poros son utilizados para generar el correcto intercambio de gases²⁹.

La estructura tridimensional de la membrana testácea es una red, la cual se puede utilizar para adsorber iones metálicos. La estructura de doble membrana de la cáscara de huevo se observa y diferencia debido a que la membrana externa contiene una matriz para promover la mineralización, mientras que la membrana interna tiene sustancias que son utilizadas para inhibir la mineralización³⁰. Lo anterior juega un papel muy importante debido a que repercute directamente en la correcta formación de cáscaras del huevo de aves y también reptiles. Esta función permite que la cáscara del huevo complete la mineralización dentro de un tiempo de 24 horas²⁹.

En comparación con la cáscara de huevo, las membranas testáceas poseen una gama más amplia de actividades biológicas, teniendo como componente principal la proteína, la cual es muy cercana a la proteína presente en la membrana celular. Las membranas testáceas contienen aproximadamente un 90% de proteína, 3% de lípidos y 2% de carbohidratos. Entre las proteínas presentes se pueden mencionar queratina, colágeno y proteínas complejas²⁹. La estructura de las membranas testáceas se puede observar en la figura 6.

Figura 6. Representación y fotografía de las estructuras de la cáscara del huevo de gallina.

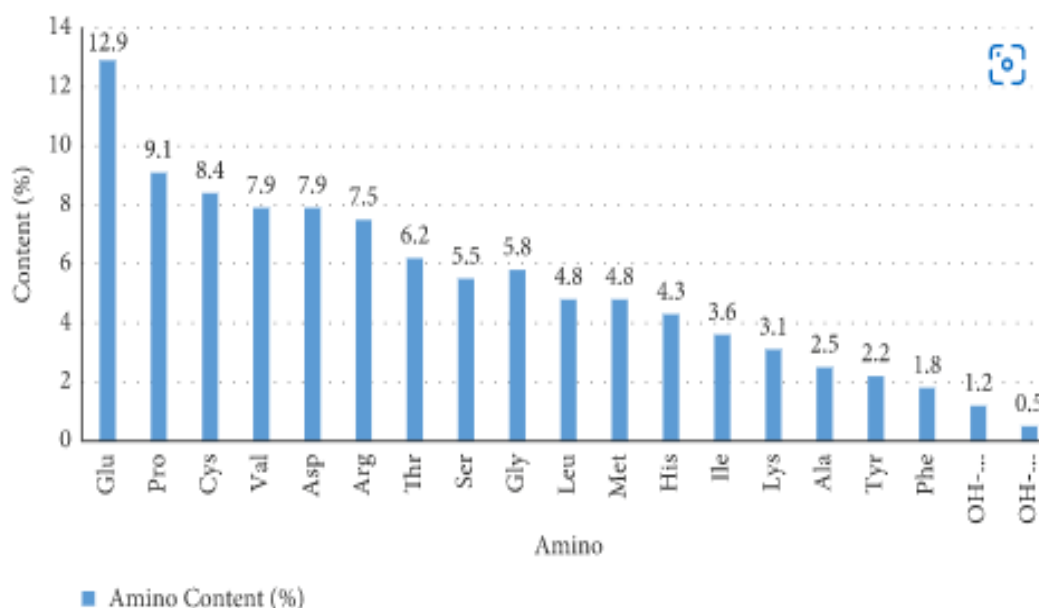


Fuente: Urbano¹²

La membrana testácea también contiene muchas sustancias activas, como mucopolisacárido, sulfato de condroitina y ácido hialurónico, además contiene varias enzimas relacionadas a diferentes procesos químicos y también otros ingredientes bioactivos. Se han descrito más de 200 especies de proteínas contenidas en estas membranas, las cuales no solo pueden resistir la posible invasión de organismos patógenos, sino que también tienen diferentes funciones biomédicas²⁹.

Dentro de la composición de las membranas testáceas en cuanto a carácter proteico (aminoácidos) se detectaron 19 tipos, incluyendo serina (Ser), glicina (Gly), metionina (Met), histidina (His), isoleucina (Ile), triptófano (Tyr), fenilalanina (Phe), hidroxilisina (OH-Lys), hidroxiprolina (OH-Pro), treonina (Thr), prolina (Pro), cisteína (Cys), ácido aspártico (Asp), lisina (Lys), leucina (Leu), valina (Val), ácido glutámico (Glu), alanina (Ala) y arginina (Arg)²⁹. El porcentaje de todos estos aminoácidos se puede observar en la figura 7.

Figura 7. Porcentaje de cada uno de los aminoácidos presentes en las membranas testáceas del huevo.



Fuente: Ye y Shao²⁹

Se ha reportado que la membranas testáceas del huevo presentan un efecto reductor en la secreción de agentes proinflamatorios en células inmunológicas in vitro, como lo es el factor de necrosis tumoral (TNF), también se ha determinado una disminución de interleucina 1 β y factor de necrosis tumoral in vivo. La interleucina 10 (IL-10) es una sustancia que puede lograr la inhibición de la Il-1 β y también del TNF. Clínicamente la expresión de IL-10 en el cartílago articular de pacientes con artritis es mayor que en pacientes que no presenten esta enfermedad, se evidencia un aumento de IL-10 después de 24 horas cuando se dan dosis de membranas testáceas³⁰. Entonces esto apoya la acción de las membranas de la cáscara de huevo relacionado a artritis, causando de esta manera una disminución de factores inflamatorios, mejorando las manifestaciones clínicas de los pacientes, además de aumentar la producción de factores anti inflamatorios.

2.5 Ácido hialurónico

El ácido hialurónico (AH) es un glicosaminoglicano, se encuentra en la matriz extracelular, recubre vasos sanguíneos y está presente en todos los tipos de tejidos del cuerpo humano. Es un polisacárido de alto peso molecular, producido por la membrana plasmática por la enzima ácido hialurónico sintasa y formado por repetidas unidades de disacáridos. Actualmente ha tenido mucha relevancia debido a sus prácticas aplicaciones clínicas en el área médica, teniendo muy buenos resultados, aunado a esto posee pocos efectos adversos³¹. Esta familia de glicosaminoglicanos es bastante conocida en el ámbito de la medicina y salud, debido a que algunas moléculas con estructura similar se utilizan actualmente como componentes activos dentro de diferentes formulaciones farmacéuticas y suplementos nutricionales.

Es un componente estelar en la intervención del proceso de homeostasis del agua, regulación del crecimiento capilar, reconocimiento y migración celular y también tiene participación en procesos caracterizados por proliferación celular rápida como cicatrización de heridas, además es una sustancia que permite lubricar, absorber, transportar nutrientes básicos en las células y también eliminar residuos generados, debido a que se encuentra entre espacios existentes entre las células y los tejidos, formando parte de la matriz extracelular. Es importante recalcar que cuando la producción de ácido hialurónico disminuye, como consecuencia aparece dolor en articulaciones, rigidez facial, envejecimiento cutáneo, sequedad y arrugas³¹.

Su mecanismo de acción consiste en organizar la disposición del colágeno favoreciendo de esta manera la diferenciación celular, y, por lo tanto, el proceso de cicatrización. Si las concentraciones de ácido hialurónico en el organismo no son adecuadas podría generarse un proceso de cicatrización ineficiente que tendría como consecuencias retracción y estenosis (estrechamiento)³².

Dentro de las actividades específicas que realiza el ácido hialurónico se encuentran la migración de fibroblastos y la fibrogenesis, proliferación de queratinocitos y la regulación del nivel de proliferación y grosor de la epidermis. Nuevamente cabe recalcar que esta

sustancia está involucrada en procesos de crecimiento e inflamación/reparación, los cuales proporcionan hidratación y propiedades plásticas a la mucosa³². La tabla 2 muestra las funciones generales del AH.

Tabla 2. Funciones generales del ácido hialurónico.

Interacción celular y extracelular dentro de los tejidos
Regulación de presión osmótica
Integridad estructural y homeostasis estructural
Lubricación de tejidos
Modula la inflamación en etapas iniciales
Organiza y estabiliza la matriz del tejido de granulación
Inhibe la serina (proteasa inflamatorio)
El AH de bajo peso molecular tiene efecto angiogénico, mientras que el de alto peso posee un efecto osteoconductor
Posee efecto bacteriostático en lesiones gingivales y periodontales como Prevotella oris y Staphylococcus aureus. La aplicación de AH después de cirugía dentales puede reducir la contaminación bacteriana y el riesgo de complicaciones infecciosas.
Organiza la disposición del colágeno favoreciendo diferenciación celular, generando una cicatrización con poca fibrosis y disminuye retracción de tejidos
Responsable de la elasticidad de la piel en gran medida y también aporta volumen a los tejidos
Juega un papel importante en la región periodontal ya que ayuda a la reparación y formación de tejido nuevo, donde se realizan movimientos ortodónticos
Posee funciones en el llenado de espacios, lubricación y exclusión de proteínas

Fuente: elaboración propia basada en la referencia ³².

Este compuesto tradicionalmente ha sido extraído de los peines de los gallos y también de humor vitro bovino. Sin embargo, es difícil aislar ácido hialurónico de alto peso molecular de manera económica, debido a que suele formar complejos con proteoglicanos.

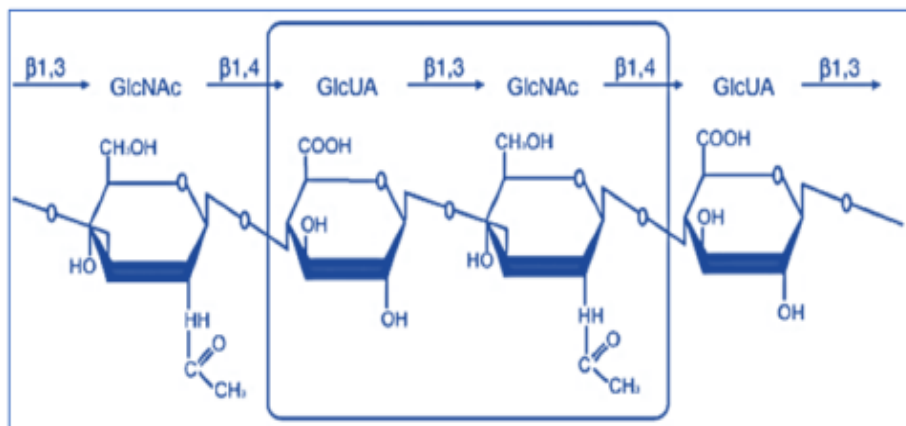
También en el caso de *Streptococcus* la extracción de ácido hialurónico se aísla en con bajos costos, y también con altos porcentajes de rendimiento³³.

2.5.1 Propiedades y estructura química

El ácido hialurónico posee gran capacidad para atraer agua, cumple con varias propiedades, en el área de dermatología permite la hidratación de la piel mediante la acción fisiológica que trae consigo mediante la retención acuosa; además proporciona firmeza y suavidad a la piel, por su acción en cuanto a lubricación de fibras colágenas. Genera una barrera defensiva debido a que impide el movimiento de algunos tipos de patógenos. También en el área de ortopedia proporciona estabilidad mecánica con respecto a diferentes cuadros presentes en las articulaciones³⁶.

La estructura del ácido hialurónico se forma por unidades de ácido D-glucorónico y también de N-acetilglucosamina. Estas estructuras son consideradas azúcares, las cuales se unen entre sí por medio de un enlace glucosídico de tipo beta 1-3³⁷. Mientras que cada disacárido se encuentra unido al siguiente por medio de una numeración diferentes de carbonos (1-4), como se muestra en la figura 8.

Figura 8. Estructura química del ácido hialurónico.



Fuente: María Cansino³⁷.

En esta estructura se presentan numerosos grupos carboxilo e hidroxilo los cuales le aportan una elevada hidrofilia, es decir, alta afinidad a solubilizarse en medios con agua. Además, cuando se encuentra en pH fisiológico, los grupos carboxilos están ionizados, mientras que, en presencia de cationes como sodio, potasio, calcio o magnesio, tiende a formar diferentes sales derivadas de este conocido con el nombre de hialuronano o hialuronato. Cuando se presente en solución, la estructura química del ácido hialurónico es estable por medio de la formación de enlaces de hidrógeno, lo que explica sus propiedades físicas, haciendo alusión a su buena solubilidad en agua, tanto en su forma de ácido hialurónico como sus sales, también presenta una elevada higroscopicidad y viscoelasticidad³⁸.

La propiedad del ácido hialurónico de ser viscoelástico es debido a que se encuentra formando una red polimérica con gran cantidad de unidades monoméricas, cuyos enlaces generan rigidez a la estructura química y también la capacidad de expandir la distancia entre sus átomos, generando de esta manera la elasticidad de la sustancia. Además, las cargas electrostáticas que se generan debido a los grupos carboxilo favorecen que la molécula se extienda, ocupando de esta manera un gran volumen al mismo tiempo que forman una malla^{38,39}.

Con el aumento del peso molecular y la concentración, las redes de la estructura del ácido hialurónico se fortalecen, y en consecuencia las soluciones de esta sustancia muestran un aumento progresivo de viscosidad y viscoelasticidad. Debido a que el hialuronano es un polielectrolito (se disocian en agua y quedan como polímeros cargados), sus propiedades reológicas en solución acuosa se ven influenciadas por la fuerza iónica, el pH y también por la temperatura, a medida que estos factores aumentan, la viscosidad del ácido hialurónico disminuye notablemente, lo cual sugiere un debilitamiento en las interacciones de las cadenas poliméricas presentes en la estructura³⁸.

2.5.2 Vida media, síntesis y metabolismo

El ácido hialurónico en el organismo humano se encuentra en una cantidad considerable en distintos tejidos como lo son: humor vítreo, líquido sinovial, válvulas cardiacas y piel. Sin

embargo, aproximadamente el 50% del total se genera y se deposita en la piel. De esta manera una persona que tenga una masa de 70 kilogramos presenta alrededor de 15 gramos de ácido hialurónico, de los cuales cerca de 5 gramos se renuevan diariamente³⁹.

La mayor parte de ácido hialurónico presente en la piel, se concentra en la dermis, aunque también se puede encontrar en la epidermis. En esta capa el ácido hialurónico se sintetiza gracias a los queratinocitos de la capa basal a nivel intracelular, mientras que otra parte del ácido hialurónico a nivel extracelular se encuentra en las partes más superficiales de la epidermis. Los fibroblastos son los encargados de sus síntesis en la zona de la dermis, teniendo una mayor actividad en la zona papilar³⁹.

Los glicosaminoglicanos son sintetizados en el aparato de Golgi, curiosamente el ácido hialurónico es sintetizado en la membrana plasmática a diferencia de los demás. Su síntesis es realizada por enzimas de membrana denominadas sintasas del ácido hialurónico, de las cuales existen 3 en vertebrados: HAS1, HAS2 y HAS3, las cuales se expresan de diferentes formas en las células. Las 3 enzimas tienen acción en la síntesis del AH, pero la HAS2 es la que parece encargarse de la manufactura de las cadenas más extensas. Se han encontrado homólogos de esta enzima en bacterias, sospechando una captación de las bacterias con respecto a los genes animales³³.

La vida de las moléculas de ácido hialurónico es variable, generalmente entre 1 y varios días. Su degradación se debe a diferentes enzimas: hialuronidasa, beta-D glucoronidasa, beta-D-N-acetil-hexosaminidasa; tomando en cuenta que la primera mencionada anteriormente la más importante. También se puede degradar en los lisosomas posterior al proceso de endocitosis mediada por receptor; a través de vía linfática puede ser eliminado cuando los tejidos tengan un buen drenaje linfático, si esta condición no se cumple la eliminación es vía hemática desde sangre hacia células endoteliales presentes en el hígado. Una parte del AH es eliminada por riñones, alrededor del 1%³³.

El ácido hialurónico se involucra en procesos de proliferación, diferenciación y reconocimiento celular, así como otras funciones fisiológicas como en el equilibrio de la

hidratación. Las funciones biológicas de esta sustancia dependen en gran parte del peso molecular del ácido hialurónico, considerando peso molecular:

- 0,4 y 4,0 kDa funciona como inductor de proteínas de choque térmico.
- 6 y 20 kDa es inmunoestimulador, angiogénico y rubefaciente.
- 20 y 200 kDa interviene en el desarrollo del embrión, la ovulación y cicatrización de heridas.
- $4 \cdot 10^2$ - $2 \cdot 10^4$ kDa rellena espacios, como el humor vítreo en el ojo en vertebrados, y también puede funcionar como amortiguador y lubricante³⁸.

2.5.3 Usos clínicos

2.5.3.1 Oftalmología

El ojo seco es un padecimiento que es producido en la superficie de la córnea y la conjuntiva por la falta de lágrimas, como consecuencia la superficie del ojo no se encuentra lubricada de manera correcta, lo que puede generar molestias oculares, problemas visuales y lesiones en córneo y conjuntiva. El ácido hialurónico en soluciones líquidas hace que las mismas tengan una alta viscosidad, por lo tanto, brindan una mejor capacidad lubricante en el ojo. También contiene una gran adhesión al epitelio de la córnea lo que brinda mucha estanqueidad (permite que las soluciones tengan menor fluidez) proporcionando de esta manera un mayor tiempo de la solución en la superficie ocular³⁶.

Otra de las aplicaciones del AH con respecto a oftalmología es en procesos quirúrgicos en el ojo. El ácido hialurónico se encuentra en la matriz extracelular del humor acuoso y vítreo, este componente brinda protección a las células endoteliales de la córnea y también a otras estructuras oculares. La aplicación de esta sustancia facilita la separación de los tejidos y también genera protección contra diferentes traumatismos quirúrgicos que se puedan generar durante el proceso. El hialuronato de sodio durante el proceso quirúrgico ayuda para restablecer el volumen intraocular, separa membranas adheridas a la retina y ayuda a controlar los desprendimientos de retina. Esta solución también es utilizada en lentes de contacto para mejorar su mojado³⁴.

2.5.3.2 Ortopedia

La osteoartritis es la enfermedad articular más común en la población mundial, se caracteriza por la degeneración del cartílago y también proliferación simultánea entre 3 tipos de tejidos (hueso, cartílago y tejido conectivo). Existen diferentes tratamientos orales disponibles y efectivos para tratar esta patología, uno de las nuevas alternativas en tratamiento es el ácido hialurónico, el cual se puede utilizar como terapia mediante inyección intraarticulares, las cuales han mostrado efectos beneficiosos con respecto al control de la sintomatología de la osteoartritis, artritis degenerativas y demás enfermedades osteoarticulares³⁶.

El ácido hialurónico ha demostrado tener acción terapéutica mediante inyecciones intraarticulares, promoviendo de esta manera la mejoría clínica mediante mecanismos específicos “El AH a nivel articular previene la apoptosis de condrocitos e inhibe la degradación condral y las respuestas inflamatorias articulares, por lo que produce mejoría clínica al ser aplicado intra-articularmente”³⁴. De esta manera también se produce una mejora en efectos regeneradores sobre el cartílago articular y restablecimiento de la elasticidad del líquido sinovial.

La aplicación de dosis de hialuronato interarticular siguiendo un esquema de aplicación de 3 veces por semana pretende obtener un efecto antiinflamatorio, anabólico, analgésico y condroprotector, mejorando la función de las diferentes articulaciones y estructuras tratadas, así como la calidad de vida de los pacientes³⁴. Este tipo de procedimiento es considerado mínimamente invasivo, y no representa alta molestia de aplicación en los pacientes, en la figura 8 se puede apreciar parte del procedimiento interarticular.

Figura 9. Fotografía de inyección interarticular de ácido hialurónico.



Fuente: Macías et al.³¹

El efecto antiinflamatorio del ácido hialurónico no se comprende completamente, debido a que sus efectos varían en gran medida con base en el peso molecular del mismo y también a los receptores celulares del tejido en el que se encuentre. Algunos de los mecanismos propuestos son: “inhibición de la expresión de genes de citoquinas, inhibición de producción de prostaglandinas, función de barrera para la migración de neutrófilos, inhibición de receptores quimiotácticos de leucocitos, inhibición de fagocitosis en neutrófilos, inhibición de producción de radicales libres”³¹, al mismo tiempo que mantiene el funcionamiento normal de las mitocondrias previniendo de esta manera la inducción de la apoptosis por disfunción.

2.5.3.3 Ginecología

Dentro de las aplicaciones del ácido hialurónico en ginecología es como posible hidratante vaginal, reemplazando de esta manera las secreciones vaginales, ya que tienen un alto poder para retener agua y también posee la capacidad para liberarla de forma lenta y continua, de esta manera se ha convertido en un tratamiento bastante utilizado³⁴.

En un estudio realizado en Turquía en 30 mujeres con posmenopausia natural evaluando la atrofia vulvo vaginal postmenopausica, recibieron dosis de 5 mg intravaginal de hialuronato sódico en días alternos durante dos semanas, y luego la misma dosis, dos veces por semana durante 90 días. Al final del estudio se observó mejoría en todas las

manifestaciones clínicas de las pacientes. Un 83.3% mejoró la elasticidad, el 67.9% la sequedad, 52.6% la dispareunia (dolor durante relaciones sexuales) y 100% de las fisuras. Ninguna de las 30 mujeres que se sometieron al estudio expresaron efectos adversos³⁵.

2.5.3.4 Cirugía plástica

Debido a las funciones de hidratación, lubricación y estabilización celular que brinda el ácido hialurónico, se puede utilizar como una alternativa en el tratamiento del envejecimiento de la piel, específicamente en el rostro, y se ha utilizado en el llenado de tejidos blandos para corregir depresiones en piel, arrugas y también pliegues de la piel. Se conoce que el ácido hialurónico es biodegradable, es reabsorbido por el cuerpo y tiene una duración aproximada de entre 4 y 12 meses. La disminución de los niveles de AH durante el proceso de envejecimiento da como resultado una contracción de la matriz extracelular y consecuentemente la reducción de la viscosidad, también hay alteración en la difusión de iones y macromoléculas generando de esta manera aparición de sequedad y arrugas³⁶.

Dentro de las posibles formas de aplicación del ácido hialurónico en el ámbito de la cirugía plástica es por medio de microimplantes en forma de gel viscoso, biodegradable, elástico, transparente y estéril. Este procedimiento se emplea con el fin de reducir líneas de expresión. Debido a que la duración de los efectos de este tipo de procedimiento dura alrededor de 6 meses, se hace necesario la repetición del mismo una o 2 veces más al año, este proceso consiste en la inyección de la sustancia de una manera superficial en la piel, integrándose de manera natural en los tejidos. Este proceso fomenta mayor hidratación en la piel y provee volumen a la dermis mientras dura el microimplante, de la misma manera actúa como relleno y tiene acción hidratante como se puede observar en las figuras 9 y 10.

Figura 10. Disminución de arrugas en zona ocular después del proceso de microimplante con ácido hialurónico.



Fuente: Macías et al.³¹

Figura 11. Resultados del tratamiento con microimplante de ácido hialurónico.



Fuente: Macías et al.³¹

2.5.3.5 Utilidad en psoriasis

La psoriasis es una enfermedad de tipo inflamatoria crónica de la piel, es de carácter autoinmune, se caracteriza por una marcada proliferación epidérmica y una diferenciación anormal. Este trastorno autoinmune es multifactorial, y se sabe que la inflamación juega un papel importante en su desarrollo. Diferentes investigaciones han demostrado que existe activación de células T, y también existe un aumento en los niveles de diferentes citoquinas como IL-17, IL-23, IL-27 y TNF- α ⁴⁰.

En la actualidad, el AH ha tomado alta relevancia como parte del sistema de administración transdérmica para mejorar la penetración del fármaco en el tratamiento de psoriasis. Se han desarrollado diferentes formas de sistemas de administración de medicamentos, en los que destacan las nanopartículas basadas en AH, etosomas (vesículas blandas), criogeles y también parches de microagujas, los cuales permiten una mejora en la permeación del medicamento a través y dentro de la piel para el tratamiento de la psoriasis⁴⁰.

Debido a las excelentes propiedades de solubilidad del ácido hialurónico dan como resultado un gran desarrollo y estudio como uno de los portadores tópicos más importantes para la administración localizada de diferentes fármacos en la piel y también como agente de administración de medicamentos para otras vías de administración como administración oftálmica, pulmonares, nasales, parenterales y tópicas⁴⁰.

El AH actúa como mucoadhesivo, lo que produce es una retención del fármaco en un sitio específico de acción/absorción. Otra de las funciones de este compuesto es que puede modificar la tasa de liberación y absorción in vivo del agente terapéutico (fármaco) y es capaz de localizar la administración del medicamento a la epidermis. Algunos de los medicamentos que se incluyen dentro de este sistema de aplicación con ácido hialurónico para el tratamiento de psoriasis son: metotrexato, tacrolimus y corticoesteroides, estos fármacos mencionados anteriormente se utilizan en el tratamiento de primera línea contra la psoriasis de moderada a grave⁴⁰.

Dentro de los nuevos sistemas de administración de fármacos como se mencionó anteriormente se encuentran los etosomas de AH, los cuales se dirigen a CD44 en la epidermis inflamada. Los etosomas son liposomas modernos deformables derivados de la dispersión de liposomas, los cuales se ha demostrado que son superiores a los liposomas clásicos, por su aumento significativo en la retención de diferentes medicamentos sobre la superficie de la piel⁴¹.

Estudios recientes demuestran que la proteína CD44 se encuentra altamente expresada en la epidermis de la piel inflamada psoriásica, lo que sugiere que CD44 sirve como un objetivo potencial de nanoportadores para la administración tópica de fármacos, intentando obtener una mayor retención de esos fármacos en la piel y de esta manera mejorar la eficacia y acción terapéutica específica del fármaco. Estos etosomas han demostrado

adhesión específica a CD44 en la piel inflamada psoriásica, evidenciando que es un sistema efectivo contra la enfermedad. Este sistema se utilizó con fármacos derivados de curcumina y se demostró una reducción en los niveles de ARNm de TNF- α y diferentes interleucinas, implicadas en el proceso inflamatorio⁴¹.

Otro de los sistemas de nanopartículas utilizados es el del complejo colesterol-AH y nicotamida, el cual se desarrolló para mejorar la permeabilidad de tacrolimus (FK506) en el tratamiento de la psoriasis. Este fármaco es una formulación de ungüento utilizada para el tratamiento de la dermatitis atópica, pero también se puede utilizar en el tratamiento de otras enfermedades de la piel como la psoriasis. Se trata de un inmunosupresor macrólido que inhibe la activación de linfocitos T a través de la inhibición de la IL-2 (una citoquina responsable del desarrollo y persistencia de las lesiones psoriásicas)⁴².

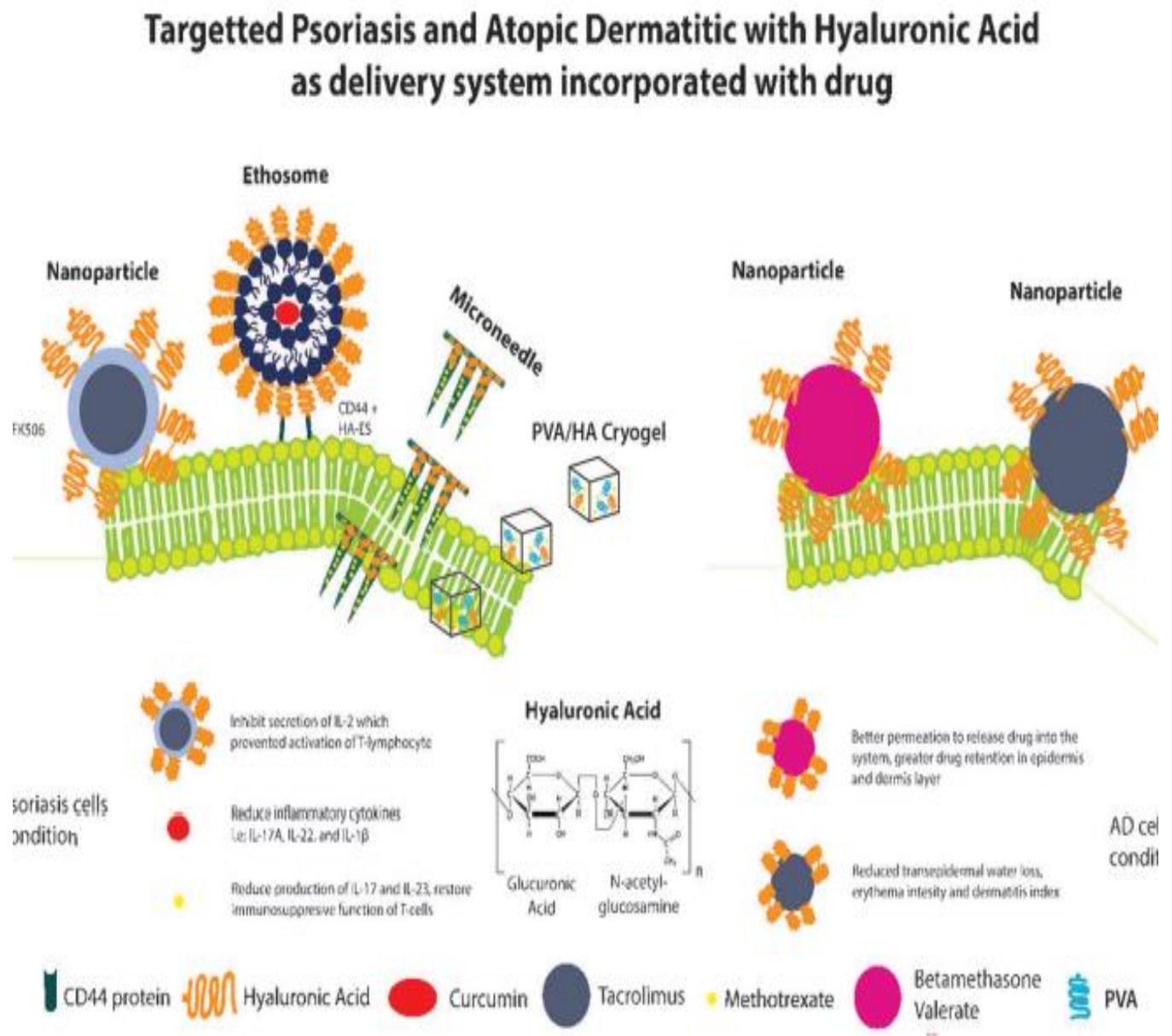
Sin embargo, el tratamiento tópico de la pomada de tacrolimus en placas psoriásicas hiperqueróticas no promueve la deposición de FK506 debido a su alta hidrofobicidad y alto peso molecular. Gracias a la investigación, actualmente se sabe que la combinación de nanopartículas de AH-colesterol presenta un efecto sinérgico significativo sobre la permeabilidad de la pomada FK506, de esta manera existe un aumento en el efecto terapéutico del fármaco, además de minimizar los efectos secundarios a nivel sistémico⁴³.

El parche de microagujas es un dispositivo que posee alta eficiencia y versatilidad, el cual atrajo amplios intereses científicos en las últimas décadas debido a sus propiedades que incluyen penetración indolora, excelente eficacia terapéutica, bajo costo y seguridad moderada. Se conoce que el metrotexato regula a la IL-17 e interferón C, también inhibe la proliferación de células T efectoras y restaura la función de células T reguladoras. Pero debido a su alto peso molecular, hidrofobicidad e incapacidad para tener una forma estable a pH fisiológico es difícil su penetración por difusión pasiva (paso por medio de membranas)⁴³.

El desarrollo del parche de microagujas a base de ácido hialurónico cargado con metrotexato tuvo una penetración exitosa en la epidermis engrosada en ratones, y alivió la inflamación de la piel similar a la psoriasis. Además, estos parches de microagujas a base de AH cargados de metrotexato fueron significativamente mucho más eficaces que la misma dosis del medicamento por vía oral. Esto reduce en gran cantidad la dosis de metrotexato

para el sistema de parches, lo que a su vez reduce la toxicidad sistémica debido a la disminución de dosis total⁴⁴.

Figura 12. Representación gráfica del funcionamiento de diferentes sistemas en los que se involucra AH.



Fuente: Nien et al⁴⁰.

2.5.3.6 Utilidad en dermatitis atópica

La dermatitis atópica es la enfermedad inflamatorio crónica más común de la piel, la cual mayoritariamente afecta a bebés y niños. Dentro de los factores que se pueden mencionar como una causa de esta enfermedad incluyen defectos en la diferenciación del epitelio, desregulación inmune, microbiota cutáneo alterada y también composición alterada y anormal del estrato córneo. El deterioro de la permeabilidad del estrato córneo causa deshidratación debido a que existe un aumento en la pérdida transepidérmica de agua, seguido de inflamación por el aumento de citoquinas, quimiocinas e interleucinas⁴⁵.

El principio básico del tratamiento de dermatitis atópica se basa en el cuidado óptimo de la piel abordando al defecto de la barrera cutánea. Las cremas hidratantes restauran la capacidad de la bicapa lipídica para restaurar, retener y redistribuir el agua. Las cremas hidratantes juegan un papel muy importante en esta enfermedad, ya que penetran y contribuyen a la reorganización de las estructuras de la piel. Este tipo de formas farmacéuticas contienen diversas composiciones que permiten mejorar su eficacia⁴⁶.

El AH, siendo uno de los componentes naturales de la piel, ha sido uno de los productos humectantes favoritos utilizados en muchos productos cosméticos con propiedades hidratantes. Ayuda en la retención y atracción de líquidos, también fomenta la reparación de la barrera cutánea. Este compuesto rara vez se utiliza como único ingrediente, más bien se combina con otro tipo de productos, trabajando de manera sinérgica aumentando las probabilidades de eficacia del tratamiento para la reparación de la piel dañada⁴⁷.

El peso molecular del AH tiene influencia sobre sus propiedades fisicoquímicas, el AH con un peso molecular mayor a 50 kDa puede reducir la penetración en la piel. De esta manera, el AH de alto peso molecular se utiliza para formar películas que impiden la pérdida de agua epidérmica, mientras que el AH de bajo peso molecular es utilizado para mejorar la penetración en la piel, sosteniendo la fisiología y manteniendo el microambiente hidratado para optimizar el rejuvenecimiento de la piel y la reparación del tejido⁴⁸.

Similar a la psoriasis, existen varias formas de sistemas de administración de medicamentos, incluyendo nanopartículas basadas en AH. Además, existen hidrogeles de doble respuesta (pH/temperatura), los cuales proporcionan una mejor penetración de las drogas a través de la piel para el tratamiento de la dermatitis atópica. Dentro de las drogas que se han incluido en estos sistemas de administración se incluyen tacrolimus, betametasona y ácido gálico, el cual es uno de los principales componentes de la medicina tradicional China.⁴⁰.

Existen ungüentos y cremas basados en tacrolimus y pimecrolimus, los cuales son inhibidores de la calcineurina, estas drogas se utilizan en el tratamiento de la dermatitis atópica. Sin embargo, se encontró que la potencia del tacrolimus al 0,1 % era equivalente a un esteroide tópico de media potencia, posiblemente debido a que tiene un gran tamaño molecular, lo que limita su penetración en la piel. Se describió una nanopartícula cargada de tacrolimus recubierta de AH, la cual presenta propiedades fisicoquímicas optimizadas, la liberación in vivo del fármaco era más sostenida, la permeación y retención del fármaco había mejorado y la eficacia de esta nanopartícula en un modelo de ratones fue superior en comparación con la solución de tacrolimus⁴⁹.

2.5.3.6 Odontología

El ácido hialurónico en odontología se utiliza en forma de biomaterial, debido a que es el único con la misma estructura molecular en todas las especies y tejidos. También se utiliza como coadyuvante en los procesos de diferenciación tisular y procesos traumáticos. En general es utilizado como antiséptico y es beneficioso con respecto a la disminución de sangrado. También es utilizado en la patología de la articulación temporomandibular traumática, degenerativa o inflamatoria, ya que favorece la función y disminuye el dolor debido a sus propiedades de lubricación, disminuyendo de esta manera el desgaste articular³².

El trastorno generado en esta articulación suele presentar dolores de cabeza, mandíbula, oídos e incluso dolor en el cuello, además de que reduce la calidad de vida de la persona al tener dificultad para realizar actos como comer o bostezar. La aplicación del ácido hialurónico de manera infiltrada ha demostrado ser un tratamiento bastante eficaz contra el dolor e inflamación causado en esa zona. Además de la lubricación generada y la reducción

del desgaste articular, el tratamiento con ácido hialurónico disminuye el avance de la degeneración articular³².

Esta sustancia facilita el proceso de cicatrización de las heridas, evitando de esta manera el crecimiento de microorganismos que puedan llegar a colonizar la herida, además de proteger contra agente irritantes que entren en contacto con el sitio intervenido, de esta manera hay una disminución en el riesgo de infecciones tras una intervención quirúrgica odontológica, como lo son: implantes dentales, implante de injertos de hueso o elevación del seno maxilar. Está indicado en el tratamiento de llagas y también úlceras orales³².

Se puede utilizar en el tratamiento de la sonrisa gingival, este es un padecimiento que se caracteriza por presentar una desproporción entre los dientes, encía y hueso maxilar, generando de esta manera que las encías tengan una visibilidad mayor comparada a una normal, generando de esta manera un problema estético que incluso puede afectar la autoestima de muchos pacientes. El ácido hialurónico brinda la posibilidad de tratar este problema sin necesidad de realizar operaciones invasivas y también puede emplearse como relleno en las papilas interdentes, disminuyendo los huecos entre los dientes por disminución en la proporción de encías³².

Figura 13. Presentación farmacéutica del ácido hialurónico en ampolla.



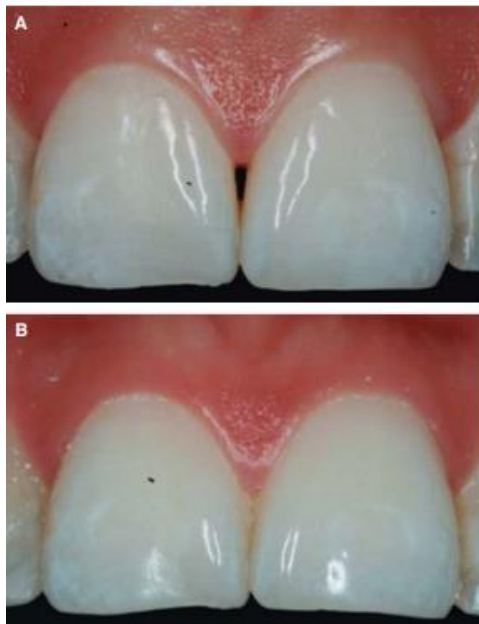
Fuente: Corte et al³².

Figura 14. Administración interdental de ácido hialurónico.



Fuente: Corte et al³²

Figura 15. Comparación de papila interdental. A) papila antes de infiltraciones de AH. B) papila al finalizar 4 filtraciones de AH.



Fuente: Corte et al³²

2.5.4 Cosmético

Los productos cosméticos son mezclas de sustancias, las cuales se aplican sobre la superficie de la piel y sus estructuras anexas, dientes, mucosa oral y genital externa, esto con el fin de limpiarlos, perfumarlos, protegerlos, mantenerlos en buen estado, modificar su aspecto o corregir olores corporales. Los cosméticos son presentados en varias formas

farmacéuticas como emulsiones, lociones, soluciones, polvos, geles, sueros, barras y aerosoles. Muchos de estos productos se utilizan a diario como jabones o cremas dentales, o también cada cierto tiempo como esmalte de uñas o depilatorios⁵⁰.

Estos productos cosméticos son regulados por diferentes normativas como resoluciones, directivas y disposiciones emitidas por autoridades nacionales responsables de la autorización y farmacovigilancia en cada país, teniendo como objetivo la comercialización y uso de productos que posean calidad, seguridad y eficacia; con el fin de proteger la salud de las personas que vayan a utilizar este tipo de productos. Las normativas incluyen diferentes directrices, entre las cuales se pueden mencionar: habilitación del laboratorio fabricante, estabilidad y vencimiento, rotulado y publicidad del producto, orientaciones para evaluar la seguridad del producto final; ingredientes y materiales en la aplicación de la forma farmacéutica sobre la piel⁵⁰.

Como producto farmacéutico, el titular, persona física o jurídica que posee la autorización para comercializar el producto, requiere la intervención de profesionales que determinen la seguridad del producto, después de someterlo a diferentes evaluaciones de seguridad antes de ser liberado para su venta legal. Existen diferentes reglamentos y definiciones sobre “cosmético”, esto va a depender de los diferentes países o también zonas en las cuales haya una convergencia de reglamentos que se utilicen para un grupo de países en específico o también, de manera individual, como es el caso de Argentina regido por un organismo conocido como ANMAT, Brasil que dispone de ANVISA, también se encuentra la Comisión Europea y FDA en Estados Unidos, entes que regulan la comercialización de estos productos⁵⁰.

Dentro de los reglamentos se pueden observar diferentes aspectos como por ejemplo: según la FDA las cremas dentales con fluoruro y anticaries, protectores solares, antitranspirantes y champús son considerados medicamentos de venta libre u OTC, ya que se utilizan con el fin de prevenir una enfermedad y de alguna manera afectan la estructura o funciones del cuerpo humano, de esta manera estos productos deben cumplir, tanto con normativas de cosméticos como las de medicamentos⁵⁰.

2.5.4.1 Indicaciones y modo de uso

Los sueros faciales de ácido hialurónico están indicados en pieles maduras, las cuales requieren un efecto relleno y antiarrugas, mientras que para pieles jóvenes se utiliza generalmente en pieles secas, aumentando de esta manera la hidratación de la piel. También se puede utilizar en el tratamiento de rosácea y dermatitis, procesos descritos anteriormente en el presente trabajo. Estos sueros de AH se pueden utilizar de manera sinérgica con cremas, facilitando de esta manera la acción de los principios activos presentes en la crema, debido a que el ácido hialurónico facilita su paso a la epidermis⁵¹.

El modo de aplicación del suero facial y su frecuencia depende del tipo de producto que se adquiera, generalmente las formas clásicas de sueros de AH se aplican una vez al día en la mañana, en rostro y cuello limpios. También existen presentaciones en roll-on las cuales se aplican en contorno de ojos, esto principalmente para disminuir arrugas a nivel de estas estructuras (bolsas, ojeras). Otro tipo de sueros para pieles delicadas y maduras se pueden aplicar dos veces al día, teniendo en consideración ayuda profesional⁵².

Actualmente existen diferentes formulaciones de sueros con ácido hialurónico, dentro de estos destaca la formulación ACE, la cual contiene vitamina A, C y E. Mientras que el ácido hialurónico cumple acción hidratante y también como de relleno, este tipo de vitaminas aportan un efecto curativo. En este caso la vitamina A desempeña un papel fundamental en la reparación constante de la epidermis, mientras que la vitamina C es indispensable para la correcta síntesis de colágeno y tiene alta foto protección contra rayos UVA y UVB. Por otra parte, la vitamina E mejora la actividad en los sistemas antioxidantes locales, contrarrestando de esta manera el daño causado por la acción de los radicales libres⁵².

2.5.5 Suero Tópico

Los sueros faciales son productos que presentan contextura ligera con concentraciones significativas de principio activo, este tipo de formas farmacéuticas actúan sobre la piel a un nivel más profundo, siendo más efectivos que las cremas. Esto sucede debido a que los sueros tópicos permiten administrar ingredientes específicos según las necesidades del consumidor⁵². Las formulaciones de sueros tópicos son bastante parecidas a

las de las cremas, de hecho, el desempeño es evaluado de la misma manera, sin embargo, estas presentan una mayor concentración de sustancias activas, además de presentar menor viscosidad.

Para comprobar la eficacia del ácido hialurónico en suero como presentación farmacológica, Robinson et al realizaron un estudio en donde formularon un suero y lo aplicaron durante semana 2, 4 y 8, recolectando fotografías durante el proceso, además de otro tipo de mecanismo para la determinación de diversos factores involucrados en la respuesta positiva por parte de la piel ante este suero formulado⁵¹.

La forma de aplicación del suero por parte de los pacientes fue de dos veces al día, instruyeron a los pacientes para poder aplicar el suero de forma correcta. En cada visita al centro de estudio los pacientes fueron medidos después de 15 minutos de limpieza de la piel y después de 15 minutos de aplicación del producto para analizar la hidratación de la piel con el uso de sensores. Dentro de los procesos adicionales para la determinación de resultados se incluyeron: evaluaciones y satisfacción del paciente, evaluaciones de investigadores y biopsias⁵¹.

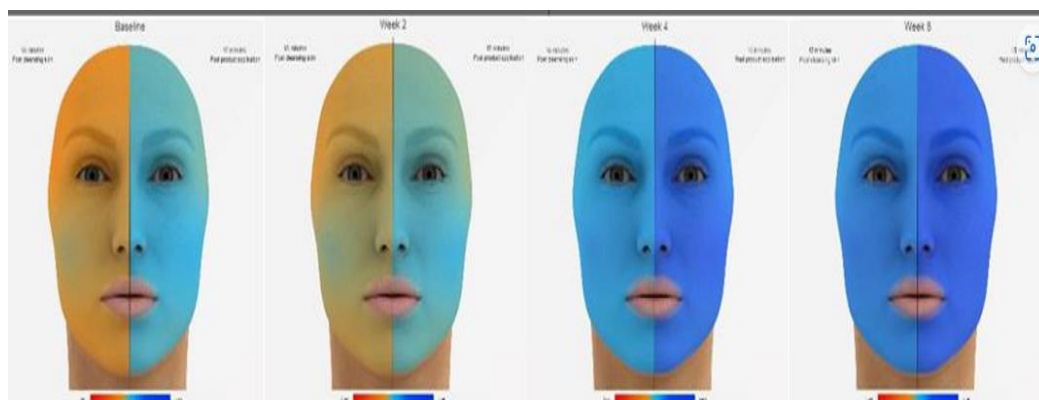
En cada una de las visitas de seguimiento, se realizaron mediciones de hidratación de la piel, las cuales aumentaban conforme el pasar del tiempo, tanto en las puntuaciones inmediatas como en las acumuladas a largo plazo. Entre la semana 4 y 8 hubo un aumento bastante considerable en la hidratación comparado con la sesión de inicio y la visita anterior. Además, las evaluaciones por parte de los pacientes aumentaron conforme el pasar de las sesiones, dando calificaciones mayores en todos los parámetros consultados⁵¹.

De la misma manera, los grados de evaluación del investigador fueron estadísticamente significativos, tomando en cuenta disminución de líneas finas (arrugas), textura, eritema y sequedad, también aumento de humedad/hidratación. En el análisis histológico, se reveló un aumento de la tinción de CD44 en 6 de los 7 participantes, concluyendo de esta manera que se genera un aumento por la estimulación de ácido hialurónico⁵¹. En todas las biopsias de los participantes se demostró una mejoría en la elastosis solar, además, por medio de fotografías se denota una mejora en el eritema, el tono y la textura.

Muchas de las preparaciones tópicas que contienen ácido hialurónico poseen combinaciones de ácido hialurónico de alto y bajo peso molecular para promover la hidratación de la piel. Sin embargo, según la literatura con respecto a curación de heridas, se sabe que el de bajo peso molecular tiene carácter proinflamatorio, lo cual podría resultar contraproducente y problemático. El enfoque del suero tiene como objetivo maximizar la capacidad de hidratación de la piel, al mismo tiempo que fomenta la actividad regenerativa dentro de la matriz extracelular⁵¹.

El estudio se realizó a 47 personas, 11 hombres y 35 mujeres. Con respecto a la técnica para determinar la cantidad de humedad o hidratación, se utilizó un sensor, el cual fue ajustado para medir hasta 50 μm de profundidad, capturando de esta manera el contenido de agua a través del estrato córneo y la epidermis superior. De igual manera este ensayo se realiza después de 15 minutos de limpieza facial y 15 minutos después de aplicar el producto. La medición es un resultado cuantitativo de la relación volumétrica de agua en el tejido de la piel⁵¹.

Figura 16. Mediciones de hidratación con sensor. (a mayor coloración azul, mayor grado de hidratación)

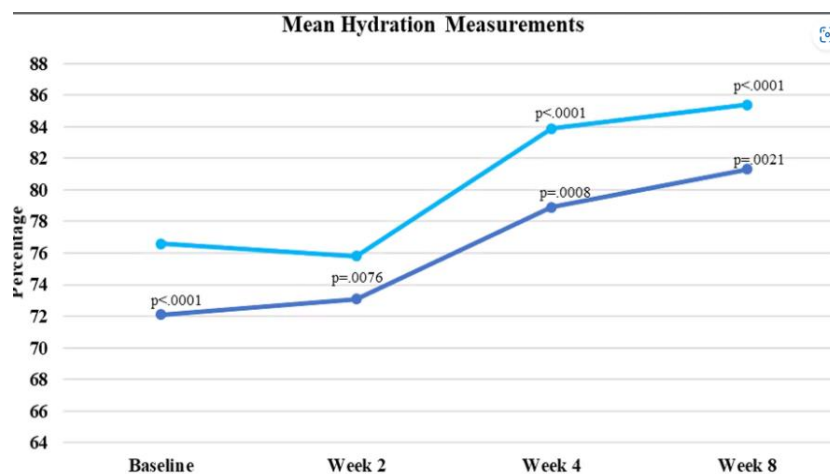


Fuente: Robinson et al⁵¹.

Dentro de los resultados del estudio, se menciona que 15 minutos después de la limpieza facial, las mediciones revelan que hubo un aumento en los niveles de hidratación comparado con la línea base. Con respecto a las semanas 4 y 8 estadísticamente hubo un aumento significativo en comparación con la línea basal de los análisis que se realizaron al

comenzar el estudio⁵¹. Los niveles de hidratación con respecto al tiempo se pueden evidenciar en la figura 17.

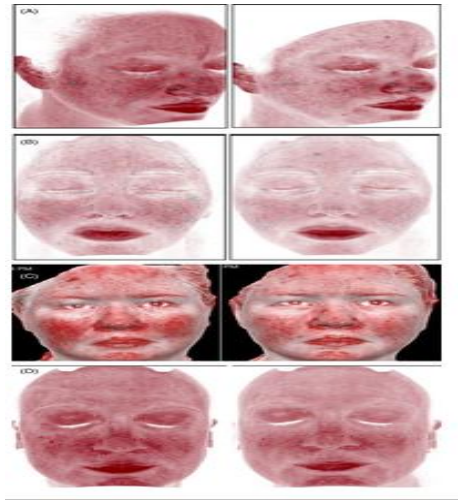
Figura 17. Porcentaje de hidratación con respecto al paso de las semanas de estudio.



Fuente: Robinson et al⁵¹.

Por medio de las fotografías realizadas en el estudio, se pueden determinar mediante filtros, el descenso en el grado de eritema, mejoras en la textura, tono y calidad de la piel, este resultado se puede apreciar en la figura 18. Con respecto a las líneas de expresión y arrugas, se evidencia en las figuras 19 y 20 la disminución de las mismas al terminar las 8 semanas de estudio, por lo que se puede concluir que la formulación con ácido hialurónico tuvo alta efectividad terapéutica⁵¹.

Figura 18. Disminución del eritema, utilizando filtros fotográficos.



Fuente: Robinson et al⁵¹.

Figura 19. Fotografía donde se evidencia la disminución de arrugas en zona periorcular.



Fuente: Robinson et al⁵¹.

Figura 20. Fotografía donde se evidencia la disminución de arrugas en mejilla y zona periocular inferior.



Fuente: Robinson et al⁵¹.

2.6 Métodos de extracción de ácido hialurónico

2.6.1 Extracción enzimática

Se han reportado diversas fuentes biológicas entre las que destacan el obtenido de crestas de gallo, humor vítreo bovino líquido sinovial vacuno, cordón umbilical humano, ojos de pez espada y tiburón moluscos) y fermentaciones utilizando diferentes microorganismos⁵³.

Dentro de las fuentes biológicas que tienen mayores concentraciones de AH se encuentran las crestas de gallo, así también el líquido sinovial bovino con rendimiento mientras que las demás fuentes de obtención de este carbohidrato se mantienen por debajo, siendo los métodos químicos y enzimático los reportados para su extracción⁵³.

De acuerdo con la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2012), la producción mundial cosechada de pescado fue de 158 millones de toneladas. Aproximadamente el 86% de esta producción se utiliza para consumo humano directo, el 14% restante se destina a productos alimentarios, en particular la fabricación de harina y aceite. Se calcula que el volumen de residuos producidos por las plantas de procesamiento es de 50%⁵³.

Con base en esto, se observa un área de oportunidad para su uso en la obtención de moléculas de alto interés comercial como el AH, con la finalidad de proporcionar valor agregado a dichos subproductos que no cuentan con una disposición final adecuada y que son vertidos directamente al mar o a rellenos sanitarios, ocasionando problemas de contaminación. Los extractos sólidos (químico y enzimático) son sometidos a espectroscopía de infrarrojo en el para determinar la presencia de los grupos amino, carboxilo e hidroxilo presentes en la estructura del AH⁵³.

Para realizar la extracción química de AH se pesaron de humor vítreo, se adicionaron NaCl al 0.2% y se dejó reposar durante 15 minutos, se centrifugó por 20 min a una temperatura de 25 °C. El sobrenadante fue tratado con 6 mL de bromuro de hexadecil trimetil amonio al 1% dejando reposar por 15 min, y se centrifugó 20 min y 25 °C. Al precipitado se le agregaron CaCl 0.9 M y de etanol acuoso, después se centrifugó a por 20 min, el sobrenadante se lavó con cloroformo durante cuatro veces en un embudo de separación. Al volumen resultante se le agregó etanol y de acetona. Se dejó reposar 12 h, después se centrifugó durante 20 min, se recuperó el precipitado de cada tratamiento y se dejó secar en tubos de 50 mL durante una semana en una campana de extracción a temperatura ambiente, finalmente el extracto fue almacenado en refrigeración a 4 °C⁵³.

El ácido hialurónico es aislado por hidrólisis enzimática usando enzimas como pepsina, papaína o tripsina. Las membranas de cáscara de huevo son añadidas a una solución de cisteína , EDTA y buffer acetato de sodio . El tanque en donde se encuentran los componentes se somete a agitación, mientras se añade la enzima⁵³.

Las membranas testáceas son suspendidas en una solución de NaCl (0,5 M). Son sometidas a la mezcla a agitación durante 1 hora. La solución extraída es decantada y centrifugada. Se repite el proceso 3 veces, es decir, se realizan 3 extracciones consecutivas. Se usa un tanque con agitación. Adicionalmente, se someten a las cáscaras de huevo a un proceso de molido para reducir el tamaño de partícula a 0,5mm. Después, se añade ácido acético (4M) y las partículas obtenidas del molido en relación 1:1. El ácido hialurónico extraído es precipitado con un volumen igual de isopropanol⁵³.

2.6.3 Extracción con microorganismos

Se conocen bacterias capaces de sintetizar HA, tales como *Pasteurella multocida* y *Streptococcus* pertenecientes a los grupos A y C, como *Streptococcus pyogenes*, el cual es patógeno en humanos, *Streptococcus equi* y *Streptococcus uberis*, patógenos en animales. Estos microorganismos utilizan el HA para encapsular sus células y de esta forma pasar desapercibidos frente al sistema inmunológico del animal, facilitando la adhesión y colonización de sus células⁵⁴.

Los *Streptococcus* del grupo C tienen una productividad de AH mayor a los del grupo A, y es por esto que son los más utilizados en su producción. La cepa más comúnmente utilizada en la producción industrial de AH es *S. equi* subespecie *zooepidemicus* modificados genéticamente, el cual puede producir hasta 6-7 g/L de ácido bajo las condiciones apropiadas. Con regularidad, se utiliza glucosa o sacarosa como fuente de carbono, mientras que la fuente de nitrógeno puede ser orgánica o inorgánica, como peptona, extracto de levadura⁵⁴.

2.6.2 Extracción con disolución de cloruro de sodio

La extracción con cloruro de sodio es un proceso relativamente fácil y además barato, que posee un buen rendimiento para la extracción de ácido hialurónico. En el proceso de extracción con disolución de cloruro de sodio se pueden utilizar varias concentraciones de NaCl, pero el artículo de revisión describe que la concentración que presenta mayor efectividad en extracción es a 0,5 M⁵⁵.

Otra de las condiciones que se debe tener en cuenta es la cantidad de solución de cloruro de sodio 0,5 M con respecto a la cantidad de membrana testácea seca en gramos. En ese estudio, se realiza con 3 diferentes proporciones, donde utilizan 1:20, 1:30 y 1:40, las extracciones dan como resultado que la proporción más adecuada es de 1:40. Es importante tener en cuenta que la muestra debe estar en agitación constante para que se genere una correcta extracción⁵⁵.

En el estudio, los investigadores realizaron diferentes gráficas tridimensionales para tomar varios datos en cuenta y obtener de esta manera un método de optimización como resultado final. También es de suma importancia el tiempo de agitación o proceso de extracción total donde describen que el tiempo que se debe utilizar para aumentar el rendimiento es de 1:30 horas⁵⁵.

2.7 Métodos de análisis.

2.7.1 HPLC

La cromatografía líquida de alta resolución o HPLC es un método cromatográfico utilizado para la separación y análisis de los componentes químicos de una mezcla. Consta de una fase móvil, la cual se encarga de llevar a la muestra hasta la fase estacionaria o columna cromatográfica, la cual puede ser sólida o también tener una película líquida sobre un sólido inerte⁵⁶. Dentro de las ventajas que proporciona utilizar este tipo de equipo se encuentran:

- Amplio rango de aplicabilidad, gracias a los instrumentos de este equipo prácticamente se puede analizar lo que sea:
- Alta precisión en resultados
- Variedad de técnicas
- Fácil manipulación de los gradientes generados
- No es destructiva, los compuestos se pueden recolectar de nuevo
- Alta reproducibilidad de daros cuantitativos
- Alto poder de separación
- Operación flexible, personalizable y automatizada⁵⁶

2.7.1.1 Equipo

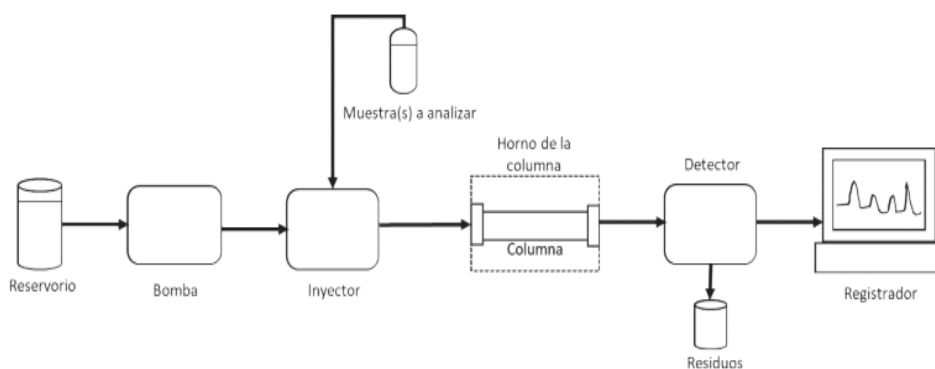
Un cromatógrafo líquido de alta resolución o alto rendimiento consta de cinco instrumentos: reservorio, bomba, inyector, horno (columna), detector y registrador. En el reservorio se encuentra la fase móvil, esta fase consiste en una mezcla de diferentes

sustancias polares y también no polares, las cuales varían su concentración dependiendo de las muestras que se quieran analizar, esta muestra debe ser filtrada con anterioridad para evitar incrustaciones y posibles obstrucciones en la columna o en el sistema de mangueras⁵⁶.

Los reservorios suelen estar hechos a base de vidrio, pueden necesitarse uno o más, dependiendo de si se hace un gradiente de concentración. La función de la bomba radica en succionar la fase móvil del reservorio para generar un flujo en el sistema del equipo con un ajuste en velocidad que se realiza mediante la computadora del HPLC. Dentro del sistema se genera una presión, se puede trabajar cerca de 6000 psi o menos, generalmente, esto varía dependiendo mucho de diferentes factores como tiempo, tamaño de la columna, composición de la fase móvil y también el flujo⁵⁶.

Normalmente se inyectan volúmenes que van desde 5 μ L y 5 mL. El inyector puede ser manual o automático. Con respecto a este último mencionado se destaca que permita que la muestra sea introducida a la fase móvil presurizada de forma precisa, por esta razón los inyectores manuales son raramente utilizados. Otra de las partes es el horno, el cual se encarga de regular y mantener la temperatura dentro de la columna, ya que esta variable influye directamente en la retención y selectividad de la misma⁵⁶. Las partes de este equipo se pueden ver en la figura 21.

Figura 21. Diagrama básico de un cromatógrafo de alta resolución.



Fuente: Suarez y Morales⁵⁶

Una de las partes de mayor relevancia es la columna, este instrumento está construido generalmente, por acero inoxidable y puede medir entre 50 a 300 mm, en su interior contiene a la fase estacionaria, su tamaño de partícula varía entre 3 a 10 μm ; las variaciones en estas dimensiones van a tener una influencia directa con respecto a la resolución, eficacia, velocidad y vida útil de la columna. Es importante recordar que en este apartado es donde se genera la separación y análisis de los compuestos⁵⁶.

Por último y no menos importante se encuentra el detector, está ubicado al final de la columna, es el encargado de captar los cambios en los afluentes de la columna y convertirlos en señales eléctricas, las cuales son enviadas al registrador. Los detectores se pueden clasificar dentro de 2 grupos: selectivos, como por ejemplo los detectores de fluorescencia, los cuales miden propiedades físicas o químicas de los solutos presentes en la mezcla y también universales, los cuales miden una propiedad física del eluyente. El registrador se encarga de recolectar y procesar las señales recibidas del convertidor y los interpreta en un cromatograma, con este material se puede realizar lectura e interpretación de datos⁵⁶.

2.7.1.2 Pretratamiento de muestra

Dentro de los cuidados que se debe tener en cuenta con respecto al tratamiento de la muestra se menciona la dilución de la muestra u otro tipo de manipulación volumétrica como neutralización. Cuando la muestra se encuentra en una fase sólida, debe ser disuelta. También cuando la muestra contenga sólidos suspendidos o cualquier otro material que pueda dañar el equipo, este tipo de trazas deben ser removidos⁵⁶.

2.7.1.3 Modo de operación y tipo de HPLC

Existen 3 modos en los que un cromatógrafo de alto rendimiento puede ser utilizado:

- Fase reversa: es la primera opción para el análisis de las muestras, es muy utilizado en aquellas muestras que contengan sustancias neutras o no ionizadas, solubles, en mezcla de sustancias orgánicas y también agua. La fase estacionaria es hidrofóbica, mientras que la fase móvil es una sustancia polar, generalmente se puede utilizar mezcla de agua-metanol o agua acetonitrilo en diferentes proporciones.
- Par ion: se emplea cuando se tiene compuestos iónicos o ionizables, generalmente

bases y también cationes. Los iones en solución pueden ser separados y neutralizados como un par de iones en una columna de fase reversa.

- Fase normal: este tipo de método separa analitos con respecto a su polaridad. La fase estacionaria que generalmente es polar, mientras la fase móvil es no polar. Las sustancias que normalmente se utilizan como fase móvil son: hexano, cloruro de metileno, cloroformo, éter dietílico y mezclas de este tipo de sustancias⁵⁶.

Por otra parte, hay otro tipo de clasificación según el mecanismo de retención utilizado, este se escoge dependiendo de la naturaleza de los compuestos presentes en la muestra. Existen 4 tipos de HPLC:

- Adsorción: Los tiempos de retención de las moléculas dependerán de la fase estacionaria, por ejemplo, si se desea retener compuestos polares, la fase estacionaria que se debe utilizar es también polar, en el caso contrario se debería utilizar una fase estacionaria no polar.
- Partición: En este caso la fase estacionaria es un líquido, debido a la inestabilidad que puede presentar líquidos estacionarios, este tipo de métodos no es tan aplicado actualmente.
- Exclusión molecular: es conveniente para la separación de analitos con diferencia de tamaño molecular. También suele ser empleado para calcular los pesos de los compuestos de una muestra. En este tipo de método, la columna adopta el funcionamiento de un tamiz molecular con una fase estacionaria sólida porosa.
- Afinidad: este método se aplica usualmente para la separación de moléculas biológicas capaces de formar complejos disociables con proteínas y ácidos nucleicos⁵⁶.

2.7.2 Infrarrojo

Los espectros que se obtienen mediante espectroscopia infrarroja son una de las herramientas más importantes para la observación de espectros vibracionales. Si dos moléculas están constituidas por átomos diferentes, o poseen diferente distribución isotópica, configuración o ambientes distintos, los espectros generados por el equipo serán distintos.

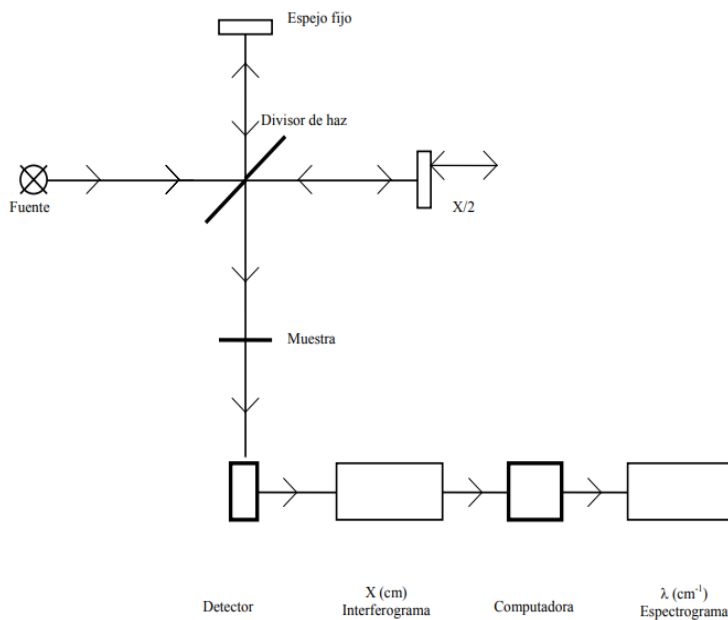
Una sustancia puede identificarse por medio de su espectro infrarrojo. Estos espectros pueden ser considerados como las huellas digitales de dicha sustancia⁵⁷.

Los átomos que constituyen una molécula están unidos entre sí por fuerzas electrostáticas, las cuales semejan uniones elásticas y, en consecuencia, sus movimientos son periódicos. Los movimientos relativos de los átomos en una molécula son una superposición de los llamados modos normales de vibración, en estos modos, los átomos se encuentran vibrando con la misma fase y frecuencia normal. El número de modos normales de vibración define el espectro vibracional de cada una de las moléculas⁵⁷.

Los espectros muestran bandas típicas de grupos funcionales definidos, y que poseen intensidades específicas y localizaciones dentro de los espectros infrarrojos. A partir de estos espectros se pueden inferir las estructuras moleculares. Las intensidades de las bandas en el espectro poseen una relación proporcional con respecto a los componentes individuales. Es una técnica bastante rápida para poder determinar diferentes grupos funcionales que pueda tener una molécula o alguna muestra en específico⁵⁷.

El espectrofotómetro marca Agilent Technologies disponible en la universidad es un espectrofotómetro infrarrojo por transformada de Fourier, el cual consta de 3 elementos básicos: una fuente luminosa, un interferómetro de Michaelson y un detector⁵⁷. Las partes que integran un espectrofotómetro se pueden observar mediante un diagrama en la figura 22.

Figura 22. Diagrama del funcionamiento de un espectrofotómetro infrarrojo por transformada de Fourier.



Fuente: Ruckmani⁵⁵

El funcionamiento de este equipo obedece la siguiente secuencia: un haz colimado, que proviene de una fuente que emite en toda la región infrarroja, incide sobre un divisor de haz. Este haz incidente se divide en dos haces perpendiculares de igual energía, uno de los cuales incide sobre el espejo móvil y el otro sobre el espejo fijo, estos haces se vuelven a recombinar lo que da lugar a una interferencia, la cual puede ser constructiva o destructiva dependiendo de la posición del espejo móvil con respecto al espejo fijo. El haz resultante pasa a través de la muestra, en donde sucede una absorción selectiva de longitudes de onda, para que finalmente llegue al detector⁵⁷.

Algunas de las ventajas que presentan estos espectros con respecto a los espectros realizados en un espectrofotómetro de dispersión son:

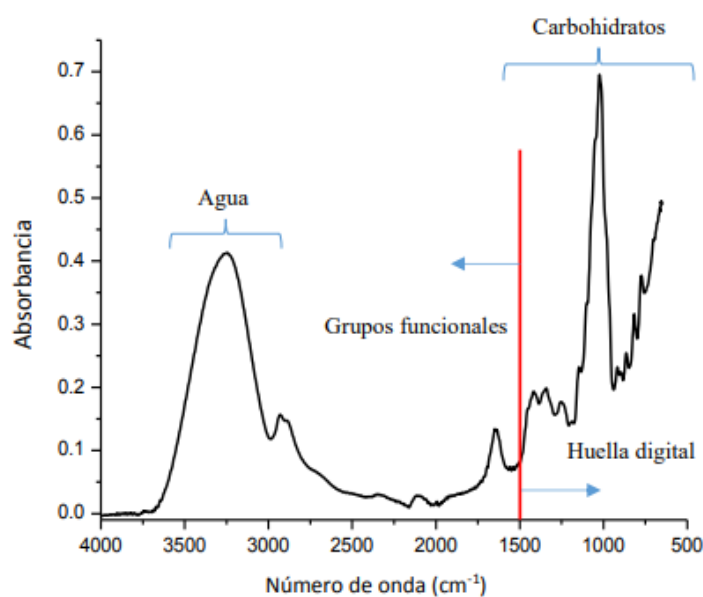
- Para obtener un espectrograma se necesita un periodo de tiempo corto. La señal del interferograma se conoce como señal multiplex porque el detector realiza una lectura de la totalidad de las frecuencias de manera simultánea. De esta manera se pueden obtener espectros confiables y en segundos, mientras

que un espectrofotómetro dispersivo demora entre 10 y 15 minutos.

- No se necesitan rendijas que limitan la capacidad de energía que llega al detector. En los espectrofotómetros dispersivos se necesitan este tipo de rendijas para generar una mayor resolución. En los espectrofotómetros por transformada de Fourier la radiación llega de una forma directa, lo cual resulta en mayor sensibilidad.
- La muestra no se calienta tanto al no estar tan cerca de la fuente de radiación⁵⁷.

Como se puede observar en la figura 23 en el eje X se encuentra indicada la intensidad de la radiación en términos de número de onda (cm^{-1}) y en el eje Y se indica la intensidad de la radiación infrarroja absorbida. El espectro consta de una serie de picos o bandas de absorción las cuales se ubican en diferentes posiciones y posee alturas y anchuras diferentes, la muestra presente en este espectro es miel de abeja, la composición mayoritaria se puede observar señaladas en el espectro⁵⁷.

Figura 23. Espectro infrarrojo de la miel de abeja.



Fuente: Cubillo Torres⁵⁷

Un grupo funcional es aquel que absorbe radiación en un intervalo específico de frecuencias, esto de forma independiente a que se encuentre unido a una molécula, de esta manera la banda que se genera en un espectro siempre se ubica en la misma zona. La región de los grupos funcionales que se comprende en un rango de 4000 y 1500 cm^{-1} podría ser dividida en 3 diferentes zonas con el propósito final de facilitar la identificación de grupos funcionales de un espectro específico⁵⁷.

Región de 4000-2500 cm^{-1}

Las bandas que se encuentran en esta zona hacen referencia a los enlaces de estiramiento de O-H, C-H y N-H. El enlace OH correspondiente al agua, genera una banda muy amplia y alta entre 3500 y 3200 cm^{-1} . El enlace de estiramiento de CH se encuentra comprendido entre 3400 y 3200 cm^{-1} y presenta una apariencia menos amplia que el enlace OH del agua. Mientras que en la zona de 3000 y 2800 cm^{-1} se encuentran bandas ligadas al enlace CH⁵⁷.

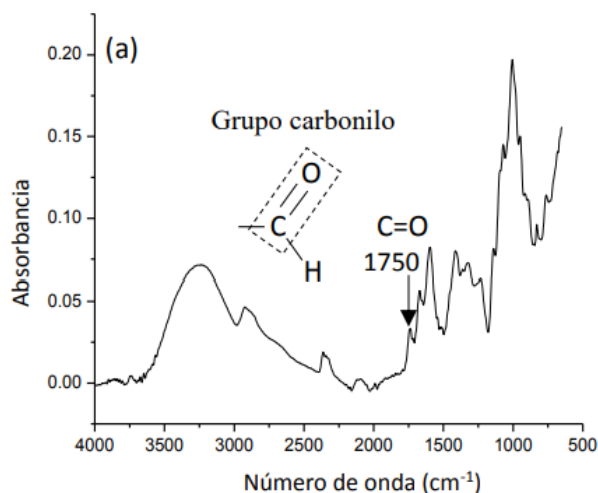
Región de 2500-2000 cm^{-1}

Usualmente en esta zona no aparecen bandas, y cuando aparecen, sus señales son bastante débiles, y frecuentemente no son relevantes para la interpretación de un espectro. Debido a esta razón se recomienda hacer énfasis en otras bandas del espectro. Si aparecieran bandas en esta zona, se hace referencia a enlaces triples de CC, CO y CN⁵⁷.

Región de 2000-1500 cm^{-1}

Este intervalo de frecuencia se conoce por contener generalmente enlaces dobles de tipo CC y CO del grupo carbonilo. La banda asociada con el enlace CO es intensa y aparece normalmente entre los 1830 y 1650 cm^{-1} como se puede observar en la figura 24. En el caso de las amidas, por ejemplo (enlace doble CO), la señal aparece alrededor de 1650 cm^{-1} . El enlace doble CN también suele aparecer en esta región, pero usualmente la banda no presenta tanta intensidad⁵⁷.

Figura 24. Representación de la banda característica del grupo funcional carbonilo en espectro infrarrojo.



Fuente: Cubillo Torres⁵⁷

Region de 1500-600 cm^{-1} (huella digital)

Las señales que aparecen en este intervalo son producto de varios tipos de vibraciones de enlace, por lo que a menudo se dificulta asignar su origen a una señal o banda en específico, también este tipo de señales originan una fuerte interacción entre enlaces vecinos⁵⁷.

2.8 Verificación de calidad en productos cosméticos.

Se requiere conocer las medidas preventivas en cuanto a calidad con respecto a la formulación final, por lo que según el Reglamento Técnico Centroamericano (RCTA), el cual es aprobado y verificado por los Subgrupos de Medidas de Normalización y de Medicamentos y Productos Afines de los países de la Región Centroamericana se da una guía para la verificación de calidad de productos cosméticos pertenecientes a productos farmacéuticos⁵⁸.

Este reglamento tiene como objetivo establecer pruebas analíticas de control que deben ser evaluadas para comprobar de esta manera la calidad de los productos cosméticos y también asegurar a las personas que vayan a consumir el producto que mantiene

características de acuerdo a especificaciones establecidas por diferentes entes relacionados con la salud y bienestar social. Es importante recordar que este reglamento es de aplicación para todos los productos cosméticos fabricados e importados en los países centroamericanos⁵⁸.

Según este documento, un producto cosmético es toda aquella sustancia o preparado, el cual se destina al contacto directo con la piel o diversas partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos externo) o con dientes y mucosas bucales, con el objetivo de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto y corregir olores corporales y mantenerlos en un buen estado fisiológico. También es importante recordar que los productos de higiene personal son considerados cosméticos⁵⁸.

2.8.1 Evaluación técnica

Existen varias pruebas de calidad descritas en el RCTA para la distribución de estos medicamentos, dentro de los parámetros que se describen en el documento se encuentra:

1. Etiquetado
2. Características organolépticas
3. Pruebas físicas
4. Pruebas químicas
5. Pruebas microbiológicas⁵⁸

El etiquetado de la forma farmacéutica debe cumplir con el RCTA 71.04.36:07, que comprende los parámetros para el etiquetado de productos cosméticos. Dentro de las características organolépticas que se deben tener en cuenta son: aspecto, sabor, color y olor. Las pruebas físicas que se deben aplicar comprenden desde pH, densidad y también se debe determinar la viscosidad del producto⁵⁸.

En relación a las pruebas químicas, se deben efectuar pruebas de identificación y de contenido de las sustancias activas, también de sustancias restringidas cuando aplique. Además, se deben realizar pruebas microbiológicas con sus respectivos límites microbianos (ver figura 25 y 26), estas pruebas deben efectuarse a todos los cosméticos, excluyendo de estas pruebas a presentaciones que no sean susceptibles a la contaminación microbiológica

por ejemplo: perfumes con alto porcentaje de alcohol, productos con más de 10% de clorhidrato de aluminio, productos oleosos y productos que contengan peróxidos⁵⁸.

Figura 25. Especificaciones de límites microbianos para productos cosméticos.

Expresados en UFC/g o UFC/cm³

PRODUCTO	DETERMINACIÓN	ESPECIFICACIÓN
Para Bebé	Recuento Total de Mesófilos aerobios	$\leq 10^2$
	Recuento Total de Mohos y Levaduras	$\leq 10^2$
Para el contorno de ojos	Recuento Total de Mesófilos aerobios	no más de 5×10^2
	Recuento Total de Mohos y Levaduras	$\leq 10^2$
Todos los otros	Recuento Total de Mesófilos aerobios	$\leq 10^3$
	Recuento Total de Mohos y Levaduras	$\leq 10^2$

Fuente: COMIECO⁵⁸.

Figura 26. Especificación de microorganismos patógenos.

MICROORGANISMO	ESPECIFICACIÓN
Staphylococcus aureus	Ausente
Escherichia coli	Ausente
Pseudomonas aeruginosa	Ausente

Fuente: COMIECO⁵⁸.

CAPÍTULO III- MARCO METODOLÓGICO

3.1 Enfoque

La presente investigación presenta un enfoque mixto, debido a que se pretende extraer ácido hialurónico a partir de las membranas testáceas presentes en la cáscara de huevo de gallina, dentro de esta extracción se pretende determinar concentraciones de componentes, optimización del proceso para el desarrollo de la forma farmacéutica (suero tópico) y los posibles usos de este suero en la comunidad joven. La investigación mixta no tiene como meta reemplazar a la investigación cuantitativa ni a la cualitativa, sino utilizar las fortalezas contenidas dentro de cada una de ellas para reforzar la indagación del proyecto, y además tratando de minimizar sus potenciales debilidades⁵⁹.

El enfoque mixto se caracteriza porque favorece una perspectiva amplia y profunda acerca del tema que se estudia, de esta manera, esto le facilita al investigador plantear el problema con claridad y formular objetivos apropiados. La utilización de un solo enfoque genera menos tensiones en el investigador, mientras que el carácter mixto ofrece una confrontación entre las diferentes teorías al tiempo que considera los datos recopilados por parte de los dos métodos⁵⁹.

3.2. Tipo de investigación

Se trata de un diseño exploratorio donde primero se recolectan datos y se examinan datos cualitativos para posteriormente conseguir y estudiar datos cuantitativos, esta recolección de datos cualitativos se hace para reconocer un fenómeno. Se clasifica como un estudio prospectivo, dentro de estos se puede incluir los procesos llevados en el laboratorio para la elaboración del suero tópico deseado⁶⁰.

Se trabaja con un modelo exploratorio debido a que la investigación posee pocos antecedentes en cuanto a procedimiento experimental, en este caso el investigador debe tener claridad acerca del nivel de conocimiento científico desarrollado previamente por otros trabajos e investigadores, además de información no escrita que posean personas, que con su relato puedan ayudar a reunir experiencias, logrando ponerlas en práctica para mejorar y optimizar los diferentes procesos incluidos en la investigación.

3.3. Fuentes de Información

Dentro de las fuentes utilizadas en esta investigación para la recolección y análisis de datos se encuentran las fuentes primarias, como artículos científicos provenientes de revistas confiables, así como también artículos científicos de revisión bibliográfica y trabajos finales de graduación, también libros en línea.

Al tener un carácter exploratorio también se toman en cuenta experiencias por parte de relatos de personas, por medio de este tipo de recopilación se pretende optimizar el proceso experimental. Aunque ya existe un proceso establecido para desarrollar el experimento este tipo de relatos pueden llegar a tener mucha importancia dentro de los diferentes procesos de laboratorio.

3.4. Población y muestra

En este caso la población son las membranas testáceas provenientes de las cáscaras de huevo de gallina, la cual es la materia prima para realizar el procedimiento experimental. La muestra es extraída de huevos de gallina predeterminadas con anterioridad, es decir, el proceso de recolección de huevos se hace solamente a un grupo de gallinas. A estas unidades de observación se les aplica un muestreo no probabilístico, tomando en cuenta que solo una población de gallinas, consecuentemente huevos, será sujeta a este experimento⁶⁰.

Debido a la utilización de este tipo de muestreo los resultados cuantitativos se verán dirigidos hacia una población de huevos pertenecientes a una raza de gallinas, además del entorno en el que vive la gallina. Entonces las variables y resultados cuantitativos probablemente no describan de manera general a la población. El tipo de muestreo, es de carácter intencionado, ya que el investigador tiene conocimiento de la población y sus elementos, existe riesgo en este caso debido a que existan vacíos o imparcialidades en el momento de recoger los huevos y, por lo tanto, las membranas testáceas⁶⁰.

3.5. Criterios de búsqueda de la información

Tabla 3. Criterios de búsqueda de información de la investigación.

Objetivo	Descriptores	Motor de búsqueda	Periodo de estudio	Idioma
Optimizar las condiciones para el desarrollo de la formulación de un suero tópico para la piel a base de ácido hialurónico.	Formulación del suero	Google académico	2017-2022	Español/Inglés
	Ácido hialurónico	Scielo Google académico	2017-2022	Español/Inglés
Desarrollar la formulación de un suero tópico de hidratación para la piel a base de ácido hialurónico.	Suero tópico de hidratación	Elsevier Google académico	2017-2022	Español/Inglés
Determinar características generales del suero desarrollado y sus posibles aplicaciones.	Características generales del suero	Google académico Scielo PubMed	2017-2022	Español/Inglés
	Posibles aplicaciones en personas	Google académico	2017-2022	Español/Inglés

Fuente: Elaboración propia.

3.6. Criterios de Inclusión y exclusión.

Con respecto a los criterios de inclusión y exclusión, se incluyeron artículos científicos, trabajos finales de graduación, revistas indexadas, libros y demás fuentes de información confiables, los cuales estuvieran en un periodo comprendido en un rango de antigüedad entre los años 2006 y 2022, en idioma inglés, español y también en portugués. Además de este rango se eligieron artículos e información relevante respecto a la temática del proyecto, con respecto a características específicas del ácido hialurónico, extracción del mismo a partir de membranas testáceas del huevo, usos del ácido hialurónico y demás conceptos relacionados con el tema para su correcta comprensión.

Tabla 4. Criterios de inclusión y exclusión.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
<ul style="list-style-type: none">-Artículos con menos de 5 años de longevidad.-Artículos sobre extracción de ácido hialurónico en membranas testáceas.-Artículos sobre características del huevo de gallina.-Composición de membranas testáceas.-Artículos sobre piel, características, anatomía y fisiología-Artículos relacionados a envejecimiento de piel y factores que podrían potenciarlo.	<ul style="list-style-type: none">-Artículos con más de 5 años de longevidad.-Artículos sobre extracción de ácido hialurónico a partir de otra matriz.-Artículos sobre anatomía de gallinas o fisiología del huevo.-Artículos de membranas testáceas de tortugas u otros animales.

Fuente: elaboración propia.

3.7. Clasificación de la información según nivel de evidencia.

Tabla 5. Información según nivel de evidencia (tabla Sackett)

Autor/año/revista	Ref #	Título del artículo	Tipo de estudio	Nivel de evidencia	Población	Método	Conclusiones y resultados
Scardovi S, Goglian A, Gendra P, Gendra, C / 2017 / Redalyc	4	Clinical study of the efficacy, duration and adverse effects of Hyaluronic Acid implants in the Oral-Maxillofacial area	Ensayo clínico observacional y descriptivo	3	40 pacientes de Facultad Odontología	Ensayo clínico y uso de implantes de Ácido hialurónico.	El implante de ácido hialurónico tipo Nahsa es eficaz para corregir alteraciones estéticas periorales. No se reportaron reacciones adversas.
Cocul'ová A, Krajcovic H / 2018 / Int Journ Scie and Comm	6	Isolation of the hyaluronic acid from the eggshell membranes.	Experimental-analítico, se realiza la extracción de ácido hialurónico	3	Membranas testáceas de cáscara de huevo de gallina	Procedimiento experimental en el cual se realiza la extracción de ácido hialurónico	La extracción tuvo mayor éxito cuando se realizó a 40 grados centígrados y a pH:3. Por medio de la extracción con pepsina se obtuvo un 5% de un gramo de membrana seca, lo que representa 1.027 mg por gramo.

Campos F, Gómez E Cortez, F, Chamut S / 2020 / Rev Agro Nor Arg	8	Hialuronic acid in the eggshell of <i>Salvator merianae</i> (Squamata: Teiidae).	Se trata de un estudio observacional, experimental de tipo analítico	3	Membranas testáceas de cáscara de huevo de <i>Salvator merianae</i>	Procedimiento experimental en el cual se realiza análisis del ácido hialurónico presenta en las membranas testáceas, además de diferentes pruebas microscópicas y de espectroscopía.	Se identifica una cubierta de glicosaminoglicanos en la superficie de la cáscara. El análisis espectroscópico Raman de esta región evidenció bandas vibracionales representativas del ácido hialurónico.
Chi Y, Liu R, Lin M, Chi Y / 2022 / FDT	14	A novel process to separate the eggshells membranes and eggshells via flash evaporation.	Estudio observacional, experimental de tipo analítico	4	Membranas testáceas de cáscara de huevo de gallina	Se realizan diferentes procedimientos en los cuales se determinan diferentes componentes de las membranas testáceas, además de sus respectivas cantidades	Concluyen que utilizando el método respectivo, la separación de las membranas es directamente proporcional a la presión, es decir, cuanto más presión, mayor será la separación. Además, se desarrolló un método amigable con el ambiente para llevar a cabo el experimento.
García J, Alonso P / 2021 / <i>Pediatr Int</i>	17	Anatomía y fisiología de la piel.	Revisión bibliográfica	5	Capas de la piel humana.	Revisión bibliográfica sobre partes y funcionamiento de la piel y órganos asociados.	El sistema incluye epidermis, dermis, hipodermis, glándulas asociadas, cabello y uñas. El sistema tegumentario es el órgano más grande del cuerpo y proporciona una barrera con respecto al ambiente.
Canóvas F, Abellán M, García A, Luque A, Pérez S,	28	Randomised clinical trial to analyse	Se trata de un estudio Aleatorio	3	80 pacientes mayores de 18 años, los	Ensayo clínico en el cual se les administran dosis de ácido hialurónico para	Se concluye que el alivio de los síntomas depende directamente de la dosis administrada,

Sánchez M / 2022 / MDPI		efficacy of eggshell membrane to improve joint functionality in knee osteoarthritis	controlado, doble ciego.		cuales tienen diagnóstico de osteoartritis en rodilla y dolor crónico.	controlar el dolor crónico que sufren pacientes con osteoartritis.	además hay un aumento en la fuerza y resistencia muscular como resultado de la reducción en la percepción al dolor en la zona.
Shao X, Ye W / 2021 / Hindawi	29	Preventive effect of egg membrane protein supplementation on dragon boat sports injury under the monitoring of artificial intelligence and big data	Se trata de un estudio aleatorio, controlado.	3	20 miembros de un equipo de barco de Dragón.	Ensayo clínico donde se administró membranas testáceas como suplemento proteico.	El ensayo concluye que la administración de membranas testáceas de huevo reduce el ácido láctico total, urea, hemoglobina y creatinina en sangre, también que reduce los daños en músculo esquelético cuando se practican deportes. También reduce la expresión de factores proinflamatorios.
Nien K, Hsum W, Lai C, Hing B / 2020 / Front in Pharm	40	Hyaluronic Acid-Mediated Drug Delivery System Targeting for Inflammatory Skin Diseases: A Mini Review	Revisión bibliográfica acerca de efectos del ácido hialurónico como transportador de otros fármacos.	5	Ácido hialurónico y otros principios activos con los que existe una relación sinérgica.	Revisión bibliográfica de diferentes estudios experimentales y conceptos teóricos.	El artículo concluye que el ácido hialurónico es un excelente producto natural, que posee buena biocompatibilidad y degradabilidad. Las propiedades de hidratación del ácido hialurónico hicieron que este compuesto sea muy utilizado en cosméticos y productos

							antienvjecimiento. No se conoce con exactitud el mecanismo del sistema de administración de fármacos basados en AH. Tampoco se conoce con claridad el efecto que tiene el ácido hialurónico con respecto a psoriasis y dermatitis atópica.
Robinson D, Vega J, Palm M, Bell M / 2022 / Journ of Cosmet Derm	51	Multicenter evaluation of a topical hyaluronic acid serum.	Es un estudio experimental controlado, aplicado a personas.	3	En este caso la población son 7 personas, hombres y mujeres sanos entre 25 y 70 años de edad.	A las personas que se incluyeron en este estudio, se les aplicó un tratamiento con ácido hialurónico 2 veces al día y se hicieron revisiones en semanas 2,4 y 8. Se utilizó un sensor que identifica el contenido de agua entre el estrato corneo y la epidermis, esta medición es de carácter cuantitativo, que representa un valor directo en relación a la hidratación efectiva por parte del suero utilizado. Se utilizó un suero de ácido hialurónico de alto peso molecular.	Los resultados del ensayo demostraron que la formulación produjo mejoras significativas en la hidratación inmediata y también a largo plazo de la piel. Se evaluó por medio de sensor con tecnología wearifi, biopsias y evaluaciones de pacientes e investigadores. Se demostró un aumento general de la luminosidad, disminución del enrojecimiento y mejora de la hidratación de la piel después de 15 minutos de su aplicación y también a largo plazo.

Ruckmani K, Shaikh S, Khalil P, Muneera M, Thusleem O / 2013 / Journ of Ph Analysis	68	Determination of sodium hyaluronate in pharmaceutical formulations by HPLC-UV.	Se trata de un método de validación para la determinación de ácido hialurónico por medio de equipo HPLC.	3	Membranas testáceas provenientes de las cáscaras de huevo.	Se trata de un método de validación utilizado para la determinación y cuantificación de ácido hialurónico en equipo de Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).	Un método de HPLC de exclusión molecular prueba la detección y brinda un proceso validado para la determinación de ácido hialurónico en formulaciones farmacéuticas y soluciones. El método es específico, simple y rápido.
Alparce K, Noomhorm A, Kumar A / 2018 / Innov in food Ingrid & food safet	55	Sequential extraction of Hyaluronic Acid and Collagen from chicken eggshell membrane	Estudio experimental donde se aplican varias técnicas de extracción.	3	Membranas testáceas provenientes de las cáscaras de huevo.	Estudio experimental donde se extrae ácido hialurónico con una solución de cloruro de sodio y papaína. También extraen colágeno y realizan cuantificación de analito.	El estudio concluye que la extracción de ácido hialurónico a partir de membranas testáceas se puede realizar con métodos simples como con solución de cloruro de sodio. También concluyen las condiciones para que la extracción sea potenciada.

3.8. Variables de la Investigación.

Tabla 6. Operacionalización de variables.

Objetivo	Variable	Concepto	Indicador	Instrumento o técnica
Optimizar las condiciones para la formulación de un suero tópico de hidratación para	Optimizar condiciones para la formulación	Para la obtención del extracto se deben tener en cuenta diferentes factores involucrados, además teniendo en	Mejoramiento del proceso durante las diferentes semanas de ensayo.	Revisiones bibliográficas sobre procesos de formulación y también

la piel a base de ácido hialurónico extraído de las membranas testáceas de las cáscaras.		cuenta diferentes aspectos que se podrían mejorar o agilizar, para que el proceso sea de mayor calidad.		proceso de laboratorio.
Desarrollar la formulación un suero tópico de hidratación para la piel a base de ácido hialurónico extraído de las membranas testáceas de las cáscaras de huevo	Suero tópico (extracción)	El suero tópico es una vía de administración de diferentes principios activos, este se utiliza en la piel con diferentes fines. En este caso el suero tópico contiene ácido hialurónico como agente hidratante en la piel.	Obtención del compuesto esperado.	Ensayo y pruebas de laboratorio.
Determinar características generales del suero tópico desarrollado y sus posibles aplicaciones como aporte a los cuidados dermocosméticos de usuarios adultos jóvenes.	Determinar características generales	En el proceso de extracción a partir de membranas testáceas, se generan diferentes compuestos, este tipo de sustancias deben ser identificadas por medio de diferentes procesos	Identificación de componentes del extracto	Ensayo y pruebas de laboratorio.

3.9. Descripción del procedimiento de recolección y análisis de datos

3.9.1 Recolección de datos

La recolección de datos e información va a ser dependiente de los objetivos planteados en esta investigación, una vez analizados los objetivos se define la manera en la que se recolectan los datos, en este caso debido a que hay una serie de objetivos de carácter cualitativo, la recolección de datos se realiza por medio de búsquedas de referencias bibliográficas las cuales presenten información relevante para el desarrollo de la investigación, además para las objetivos que presentan carácter cuantitativo, el análisis se genera al realizar el proceso experimental durante varias sesiones, por lo cual generará diferentes datos numéricos y determinaciones las cuales ayudan a generar los diferentes resultados cualitativos de la investigación.

Cada instrumento se aplicará según sean los datos que se requieran recoger; por ejemplo, en la construcción del procedimiento se utilizará una búsqueda mediante análisis de contenido en documentos, artículos, y otros. Seguidamente, iniciar con la construcción de los pasos para lograr la extracción del ácido hialurónico, mediante la utilización de las fuentes de información mencionadas anteriormente, esto con el procedimiento de hidrólisis enzimática, utilizando pepsina como el agente hidrolizante., y también utilizando la solución de NaCl 0,5 M.

Se pretende realizar la extracción durante los meses de agosto y octubre del 2022, en este tiempo se planea recolectar los datos con los que se llevará a los resultados de la presente investigación, para el uso del laboratorio de la universidad, se deben definir días con anterioridad y tener un mutuo acuerdo con el personal de laboratorio, manteniendo espacio de trabajo personal y posibles clases en ese momento. Cada instrumento permitirá identificar el proceso mediante la hidrólisis enzimática con pepsina y con la disolución de cloruro de sodio, de la extracción del componente principal en este caso el ácido hialurónico a partir de

las membranas testáceas de las cáscaras de huevo de gallina en la Universidad Internacional de las Américas.

3.9.2 Materia prima y tratamiento preliminar

La materia prima en este caso son las membranas testáceas extraídas de forma manual de las cáscaras de huevos de gallina, estas gallinas se ubican en una misma zona geográfica y además su alimentación y condiciones ambientales son las mismas. La recolección se hace durante varios días, pero no tanto como para que las cáscaras se descompongan debido a los residuos de la clara del huevo. Una vez recolectadas se procede a realizar un lavado gentil sobre la parte interna del huevo para remover otro tipo de sustancias pertenecientes al huevo.

Es importante recalcar que los huevos utilizados para la extracción de las membranas son lavados posteriores a su recolecta, además se vuelven a lavar antes de la extracción manual, esto para evitar contacto con sustancias como heces de la gallina o posibles interferentes del ambiente donde viven las gallinas. Las membranas se dejan secar un día antes de realizar el proceso de secado con el horno BIOBASE en el laboratorio de la Universidad Internacional de las Américas. En cuanto a los tratamientos que se les aplica a las membranas testáceas secas y procesadas se describen los siguientes:

Experimento 1.

- Determinación de masas de las muestras por triplicado.
- Se añade un volumen determinado de buffer de $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ para hidratar las membranas durante 30 minutos.
- Comienza el proceso de hidrólisis enzimática con pepsina, utilizando cantidades proporcionales a la masa de la muestra, la disolución con pepsina se prepara con agua destilada y llevando a pH 3 con ácido fosfórico 1 M, este proceso se realiza durante 5 horas a 40°C .
- Filtrado de las muestras.

Experimento 2.

- Determinación de masas de las muestras por triplicado.

- Se añade un volumen determinado de 40 ml (NaCl 0,5 M) por gramo de material a las muestras.
- La muestra debe tener agitación constante utilizando una pastilla magnética y plantilla durante hora y media.
- Filtrado de muestras.

Preparación de buffer:

Disolver 32 gramos de NH_4Cl en 300 ml de agua destilada, añadir 30 ml de hidróxido de amonio concentrado y aforar con agua destilada hasta 500 mL.

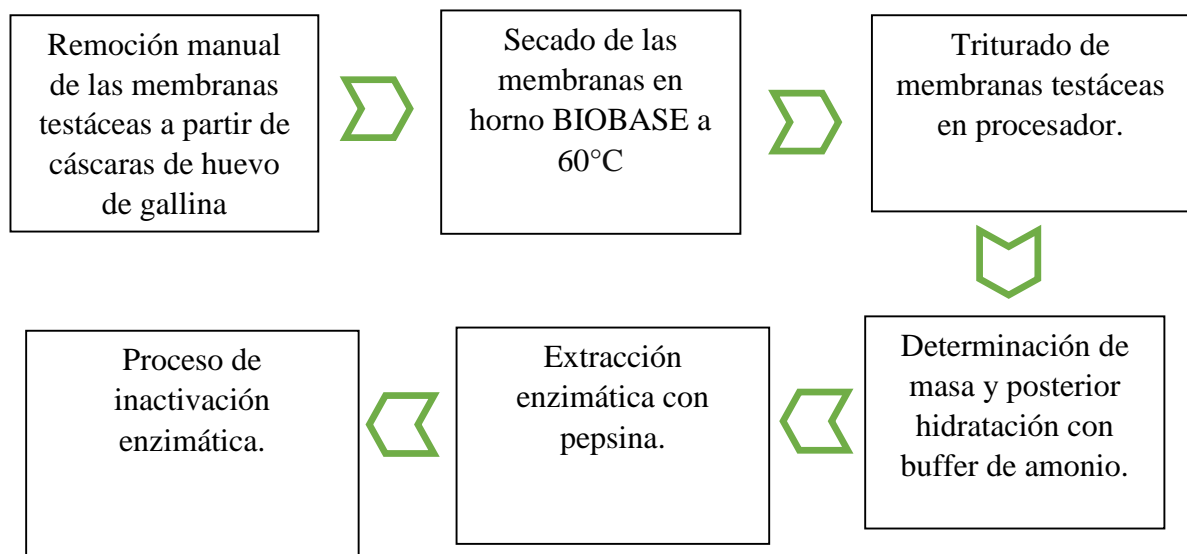
Preparación de fase móvil:

Disolver 6,8043 en 1 litro de agua destilada ajustando a pH 7 con KOH al 10%, importante realizar filtración al vacío con el equipo de filtración para HPLC.

Preparación de solución de NaCl 0,5 M:

Para preparar 500 ml de disolución se debe pesar 14,61 gramos de NaCl sólido y llevar a 500 mL en balón aforado.

Figura 27. Diagrama de flujo del proceso de extracción del ácido hialurónico por utilizando extracción enzimática.



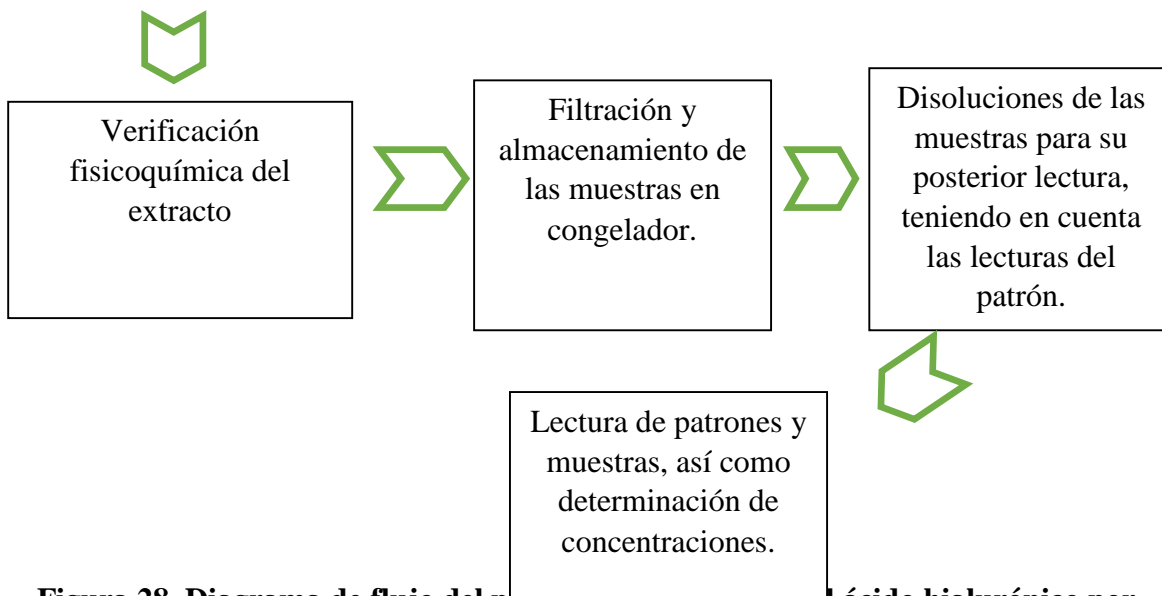
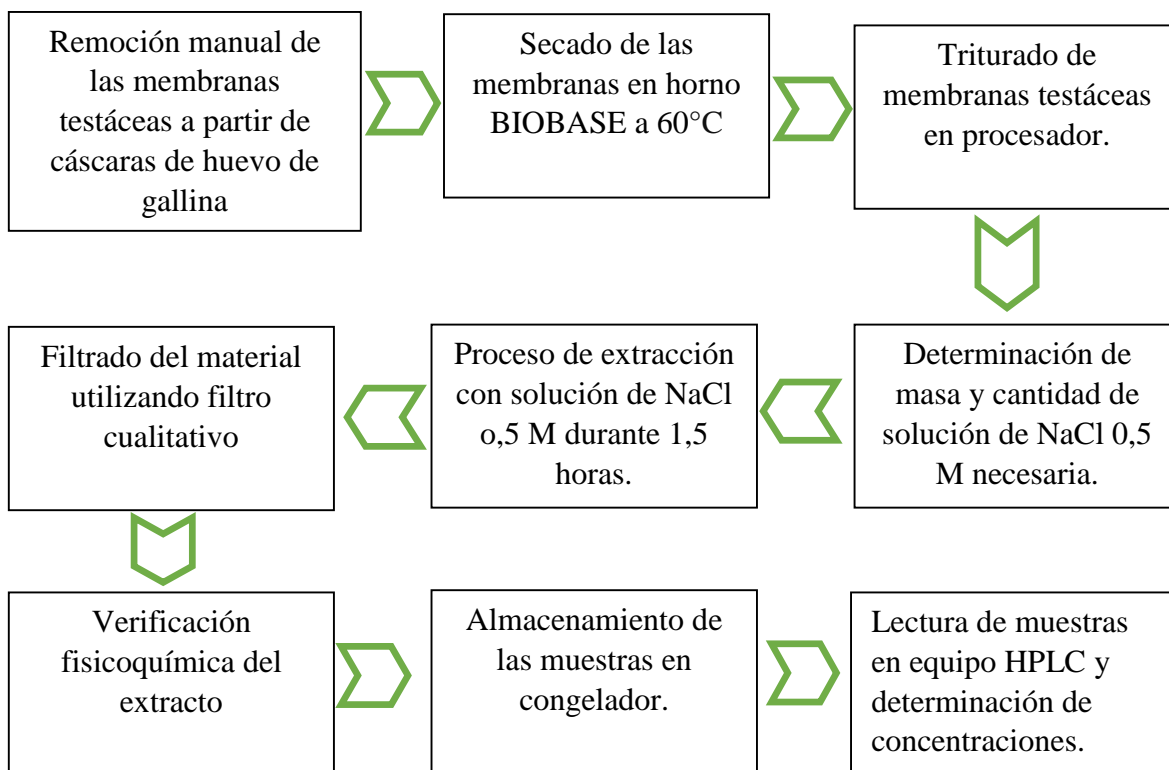


Figura 28. Diagrama de flujo del proceso de extracción del ácido hialurónico por disolución con cloruro de sodio 0,5 M.



3.10. Descripción de instrumentos y técnicas.

En este caso la observación se puede utilizar como instrumento, donde incluye de manera sistematizada y lógica muchas técnicas del proceso de investigación, para la recopilación de datos de calidad y confiabilidad. La observación también es utilizada como una herramienta de recolección de datos, donde se necesita que una persona observe el fenómeno y tenga en cuenta elementos teóricos y también empíricos⁶¹.

Por otra parte, el análisis de contenido de la parte cualitativa tiene como objetivo el recolectar un sistema de datos, principalmente hablado, en la parte cualitativa se observan los datos para clasificarlos en unidades y también en categorías de análisis para concluir con una teoría. Este tipo de instrumentos permite abordar los objetivos, categorías y variables de la presente investigación, ya que, al tener un enfoque mixto, se pueden evaluar variables tanto cualitativas como cuantitativas⁶¹.

3.11. Materiales, equipos y condiciones.

Materiales

- Beakers (250mL, 400mL, 500 mL)
- Balones aforados (1L, 25 mL)
- Probetas (1L, 25 mL, 10 mL)
- Espátula
- Piseta de agua destilada
- Piseta de acetona
- Goteros
- Termómetros
- Agitadores de vidrio
- Plantillas eléctricas
- Prensas universales
- Peras
- Papel filtro Qualitative P8
- Trompos de filtración de 0.20 μm
- Papel encerado
- Moldes de aluminio
- Picnómetro


Reactivos



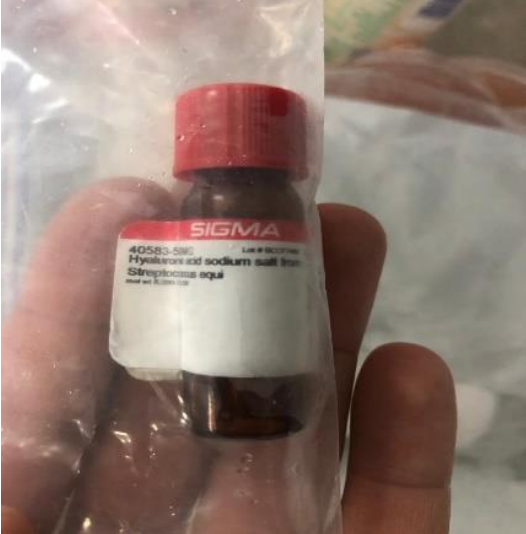
- NaOH 1M
- NH_4Cl



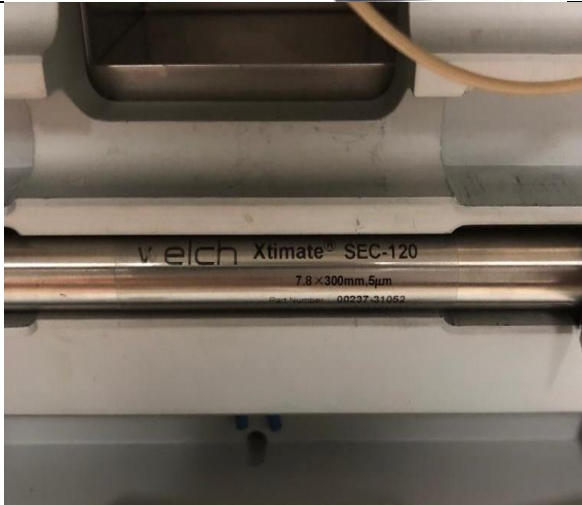
- KH_2PO_4
- KOH 10%
- Ácido fosfórico 1M
- Hidróxido de amonio
- Pepsina 2000 FIP
- Estándar de ácido hialurónico
- Agua tridestilada
- NaCl 0,5 M
- Carbopol
- Metilparabeno
- Trietanolamina
- Glicerina

Equipos


Tabla 7. Equipos utilizados en el proceso experimental.

Nombre del equipo	Imagen ilustrativa	Función en el proceso
Balanza analítica		Determinar masas de los diferentes componentes a utilizar en el experimento.

<p>Horno BIOBASE</p>		<p>Secar las membranas testáceas húmedas en un tiempo y a temperaturas determinadas.</p>
<p>Espectrofotómetro Ultravioleta Visible</p>		<p>Identificación del ácido hialurónico por medio de ondas ultravioleta, tomando como referencia el estándar del ácido hialurónico.</p>
<p>Estándar ácido hialurónico</p>		<p>El estándar permite ser un patrón de referencia para el análisis de las muestras.</p>

<p>Espectrofotómetro Infrarrojo</p>		<p>Indica los espectros de las señales de diferentes grupos funcionales y estructuras presentes en el extracto.</p>
<p>Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución</p>		<p>Este equipo separa los componentes dependiendo del peso molecular y también su volatilidad, también permite cuantificar las muestras en relación al estándar.</p>
<p>Columna SEC-120</p>		<p>Este dispositivo se utiliza para generar la separación de los compuestos, mediante diferentes factores controlados por el equipo HPLC. La fase móvil pasa con un flujo constante por la fase estacionaria, la cual está presente en este dispositivo.</p>

<p>Centrífuga</p>		<p>Mediante el ajuste de dos parámetros como lo son tiempo y revoluciones por minuto, este equipo puede separar sólidos de líquidos o también líquidos de líquidos por diferencia de densidades en una disolución. Esta acción es ejercida gracias a la fuerza gravitacional, que al ejecutarse con la fuerza centrífuga genera que la materia más densa se separe y caiga al fondo del recipiente utilizado.</p>
<p>Viscosímetro</p>		<p>Este instrumento es utilizado para la determinación de viscosidad, en este caso se utiliza para determinar la viscosidad del suero preparado, mediante el uso de sus diferentes extensiones.</p>

Mezclador		<p>El mezclador es un equipo que se utiliza para la disolución y mezcla de diferentes excipientes en la preparación de la formulación, gracias a su velocidad regulable y sus aspás, permite una mejor disolución que el uso de pastillas magnéticas.</p>
-----------	--	---

3.12. Componentes reactivos.

- NaOH 1M
- NH₄Cl
- KH₂PO₄
- Ácido fosfórico 1M
- Hidróxido de amonio
- Pepsina 2000 FIP
- Estándar de ácido hialurónico
- Agua tridestilada
- Cloruro de sodio
- Patrón de ácido hialurónico

Tabla 8. Condiciones de HPLC

Tipo de cromatografía	Cromatografía líquida de Alta Resolución
Columna	SEC-120 7.8x300mm
Fase móvil	Tampón dihidrogenofosfato de potasio (KH ₂ PO ₄) pH 7
Longitud de onda	205 nm
Flujo	1.0 ml/min
Volumen inyectado	10 µL
Temperatura de columna	25 °C
Tiempo de retención esperado	5-6 min

CAPÍTULO IV- ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

4.1 Extracción de ácido hialurónico a partir de membranas testáceas de cáscaras de huevo de gallina utilizando un método enzimático y otro con disolución de NaCl 0,5 M.

Se realizó una búsqueda exhaustiva del procedimiento de laboratorio a seguir para lograr la extracción de ácido hialurónico a partir de membranas testáceas de huevo de gallina, además de artículos que describían el procedimiento puntual, se toman otro tipo de artículos e información para respaldar el uso de los métodos empleados en esta investigación. Luego de la revisión de estos procedimientos de laboratorio se desarrollaron los procesos experimentales, tomando en cuenta diferentes situaciones que se presentan durante los procesos.

La recolección de la materia prima es la parte más lenta del proceso, debido a que hay que desprender de forma manual las membranas testáceas de la cáscara de huevo, teniendo en consideración que algunas de las membranas se adhieren a la cáscara, evitando de esta manera extraer de forma completa la membrana, y aumentando de esta manera el tiempo de extracción o recolección.

Una vez que las membranas son desprendidas se secan durante un tiempo de 4 horas bajo condiciones de 60 °C en el horno BIOBASE. Después del secado, se determinan las masas correspondientes para empezar con el proceso de laboratorio. Es importante tener en cuenta que las masas de las muestras van a determinar de manera proporcional la cantidad de volumen necesario de las demás disoluciones para lograr que el proceso sea efectivo.

Tabla 9. Masa de las membranas que se utilizaron para la extracción enzimática utilizando balanza analítica marca Nimbus ($\pm 0,0001$ g).

Muestra	Masa del beaker (g)	Masa del beaker + membranas (g)	Masa (g)
1	122,6892	124,86	2,1708
2	121,6435	124,2699	2,6264
3	145,3426	148,969	3,6264
Peso total de las membranas: 8,4236 gramos			

Fuente: elaboración propia.

Tabla 10. Masa de las membranas que se utilizaron para la extracción con solución de cloruro de sodio utilizando balanza analítica marca Nimbus ($\pm 0,0001$ g).

Muestra	Masa del beaker (g)	Masa del beaker + membranas (g)	Masa (g)
1	124,9104	128,3942	3,4838
2	122,6435	126,0959	3,4524
3	124,0722	129,3825	6,1103

Fuente: elaboración propia.

4.1.1 Extracción enzimática con pepsina.

La primera extracción fue realizada gracias a un proceso enzimático, se realizó por triplicado para que haya una mayor confiabilidad de los datos, al tener la posibilidad de hacer promedios y visualizar los diferentes cambios que se puedan generar durante el proceso. Varias técnicas han sido desarrolladas y optimizadas para la extracción de ácido hialurónico, utilizando detergentes, enzimas y solventes para romper y aislar las moléculas de ácido hialurónico de posibles complejos polisacáridos⁶².

En general, los métodos utilizados se basan en la hidrólisis química del tejido, lo cual garantiza la alteración del núcleo de proteoglicanos. Dentro de las enzimas más utilizadas para la extracción de ácido hialurónico se encuentran: papaína, tripsina, pepsina y pronasa. Estas enzimas se han utilizado para la degradación del tejido y la descomposición de fracciones proteicas, aislando de esta manera las moléculas de ácido hialurónico⁶².

Este método enzimático requiere de varios procesos involucrados, esto para realizar una correcta hidrólisis del material. Este proceso experimental se basa en el proceso utilizado un investigación realizada por la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI)⁶⁴ en el cual, se da la extracción de ácido hialurónico utilizando pepsina como agente enzimático. También se revisa otro artículo sobre extracción de AH de humor vitreo de

peces⁶² y una tesis de Gómez Oviedo¹⁶. El procedimiento experimental se desarrolla de la siguiente manera:

- Secado de membranas a 60°C en el horno BIOBASE y posterior triturado de las membranas, se realiza la determinación de masa.
- Después de esto, se agrega buffer de NH₃ / NH₄Cl en una proporción 6:1 con respecto a la cantidad de membrana seca, es decir si utiliza 2 gramos de material, se debería agregar 12 mL de buffer. La hidratación permanece durante 30 minutos.
- Se da la adición de la enzima, la cual tiene una proporción de 4 mg por cada gramo de membrana testácea triturada, además la proporción de agua destilada para disolver la enzima es de 10 ml por mg de pepsina 2000 FIP-U/g. Ajustando el pH de la disolución a 3.0 con ácido fosfórico 1M.
- Se procede a mezclar la membrana hidratada y la disolución enzimática en condiciones de 40°C por un tiempo de 5 horas.
- Para el proceso de inactivación enzimática, la temperatura se elevó hasta 60°C durante 15 minutos, estas condiciones propician la desnaturalización de la enzima, por tanto, ponen un final en el proceso enzimático.
- Posterior a esto, la mezcla se deja enfriar a temperatura ambiente para ser filtrado utilizando un filtro Qualitative P8 retirando de esta manera los restos de membrana.
- Lectura, envasado y almacenaje en refrigeración de las muestras.

Es importante tener en cuenta que las dos variables a controlar para que se dé una acción eficaz por parte de la enzima (pepsina) son temperatura y pH, debido a que la actividad enzimática puede cambiar cuando se generan cambios en estas dos variables. La pepsina porcina exhibe mayor actividad entre pH 1-2 para luego disminuir su porcentaje de efectividad, pero en la utilización de procesos industriales donde se requieren pepsinas activas a pH no tan bajos, se efectúa a un pH próximo a 3, en caso de extracción de colágeno y ácido hialurónico⁶⁴.

Con respecto a la temperatura utilizada para la hidrólisis enzimática, se ajusta a 40 ° debido a que a esta temperatura la pepsina bovina muestra una buena eficacia, de hecho, la pepsina de origen bovino es estable hasta los 60°, también existe pepsina de origen de

animales acuáticos la cual presenta estabilidad hasta unos 40-55°. Utilizando esta enzima se pueden realizar procesos de hidrólisis enzimática a temperaturas moderadas sin comprometer la integridad de los productos y con posibilidad de detenerlos con *shock* térmico a temperaturas relativamente bajas que rondan los 60 y 70°. También es importante recalcar que la pepsina presenta una menor capacidad de hidrólisis del colágeno, lo que no resulta eficiente para la obtención de péptidos bioactivos, esto genera que en el extracto final haya poca o nula cantidad de colágeno⁶⁴.

Figura 29. Representación gráfica de los pasos correspondientes al proceso enzimático.



Secado de membranas en horno BIOBASE



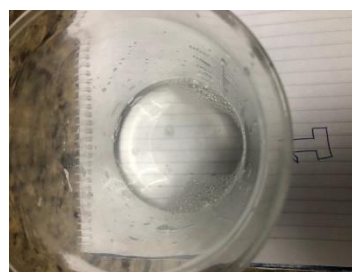
Procesado de membranas



Proceso de hidratación con buffer



Hidrólisis enzimática con pepsina



Filtrado y observación del extracto

Fuente: elaboración propia

4.1.2 Extracción con cloruro de sodio (NaCl).

Se han descrito varios métodos ampliamente estudiados para generar la extracción de ácido hialurónico y colágeno a partir de otras fuentes de colágeno y AH distintas de la extracción en membranas testáceas de huevo. Muchos métodos implican pretratamientos intensivos, los cuales se destinan a eliminar grasas de fuentes mamíferas. Este tipo de método es dirigido a extraer ácido hialurónico y colágeno a partir de membranas testáceas utilizando métodos simples y económicos⁵⁵.

El estudio que se toma como referencia para realizar esta extracción, realiza diferentes análisis en cuanto a tiempo de disolución y concentración de cloruro de sodio, por medio de los resultados de este análisis, se realiza un plan de trabajo basado en las mejores condiciones que permitan extraer la mayor cantidad de ácido hialurónico, mediante el análisis de gráficos y datos presentes en el estudio se resumen las condiciones de extracción en la siguiente tabla (tabla 11).

Tabla 11. Condiciones de las diferentes variables para optimizar el proceso de extracción con disolución de cloruro de sodio (NaCl)

Tiempo de disolución	1:30 horas
Concentración de cloruro de sodio	0,5 M
Revoluciones por minuto	350 rpm
Proporción disolución (mL) / muestra (g)	1:40

Fuente: elaboración propia basado en la referencia ⁵⁵.

Tomando en cuenta la tabla anterior y diferentes procesos explicados en el artículo en que se basó el análisis, se determina que el proceso de extracción con solución de cloruro de sodio se desarrolla de la siguiente forma:

- Secado de membranas a 60°C en el horno BIOBASE y posterior triturado de las membranas, se realiza la determinación de masa.
- Por cada gramo de material se agregan 40 mL de disolución de cloruro de sodio al 0,5 M.
- Se ajusta la plantilla a 350 rpm, el proceso se lleva a cabo durante 1:30 horas.
- El extracto se filtra utilizando con filtro Qualitative P8 retirando de esta manera los

restos de membrana.

- Se realizan alícuotas para la determinación de la cantidad de ácido hialurónico presente y el extracto es almacenado bajo refrigeración.

La concentración de cloruro de sodio que se utiliza en este análisis es basada en diferentes concentraciones que se utilizaron para extraer ácido hialurónico, mostrando que la cantidad de ácido hialurónico aumenta conforme aumenta la concentración de cloruro de sodio hasta llegar a 0,5 M, donde la cantidad liberada es la máxima durante el proceso. Después de 0,5 M la cantidad de ácido hialurónico disminuye, y en el caso de la disolución de 1,5 M solo se observa un aumento en la última extracción⁵⁵.

En el artículo consultado, se realizaron 3 extracciones de la misma materia prima, y menciona que a 1,5 M de cloruro de sodio la cantidad de ácido hialurónico en disolución es más alta, pero esto se da hasta la tercer extracción donde la matriz o materia prima (membranas testáceas) ya ha pasado por dos procesos de extracción con diferentes concentraciones de cloruro de sodio, y atribuyen la liberación de cloruro de sodio a la posible fuerza motriz que genera la alta concentración de esta sal, generando de esta manera la liberación de mayor cantidad de ácido hialurónico, comparado con concentraciones menores en la última extracción⁵⁵.

Además, la proporción utilizada en este proceso, también es una de las variables que se maneja en el estudio, donde se demuestra que en esa proporción la liberación de ácido hialurónico es mayor, después de haber hecho ensayos con 20:1 y 30:1. Durante la tercera extracción a condiciones de 40:1, 0,5 horas de disolución y 1,5 M de cloruro de sodio mencionan que la cantidad de ácido hialurónico es muy pequeña comparada con la primera extracción, debido a que la mayoría de AH fue recolectada durante la extracción 1 y 2⁵⁵.

Figura 30. Representación gráfica de los pasos correspondientes al proceso con disolución de cloruro de sodio.



Secado de membranas
en horno BIOBASE



Procesado de
membranas



Agitación con
disolución de NaCl 0,5
M



Filtración del extracto



Toma de alícuotas para
análisis

Fuente: elaboración propia

Cabe destacar las diferentes mejoras en cada uno de los experimentos anteriores, mediante la observación de pasos y eventualidades que se presentaron durante el proceso experimental. Desde los primeros pasos del procedimiento como lo es la recolección de las membranas testáceas, es importante mantener un aseo adecuado de las cáscaras, lavándolas

pocos días después de utilizar el huevo, para evitar de esta manera que se genere algún tipo de descomposición de la materia del huevo.

También dentro de lo que respecta el proceso de remoción de la membrana, es importante tomar en cuenta que el proceso se facilita si las membranas están un poco humedecidas con agua, ya que cuando las membranas y cáscaras se secan por completo su remoción se dificulta debido a que se pega en las cáscaras y salen pequeños trozos de membrana, mientras que cuando están un poco humedecidas es posible remover la membrana de forma total.

Es importante tener en cuenta el tiempo y temperatura de secado correcto para que el procesamiento posterior sea más sencillo. En este caso, el tiempo de secado se mantuvo, pero la temperatura se aumentó a 60 °C, este cambio se realiza después de observar que a 50 °C las membranas no quedan secas en su totalidad, y su textura no es quebradiza, mientras que a 60 °C las membranas se encuentran secas, además al tacto se tornan quebradizas, esto disminuye el tiempo de procesamiento, además que el material procesado tiende a ser más polvo que pequeñas porciones, como lo fue en el proceso a 50 °C.

El proceso de secado se realizó en el horno BIOBASE, con temperatura interna controlada mediante termómetros, esto para asegurar que la temperatura fuera la óptima, debido a que la temperatura de ajuste externo no era igual a la temperatura interna. El otro horno que se encuentra presente en el laboratorio se descartó debido a que presenta altas fluctuaciones de temperatura que para controlar se debía de abrir la puerta y después volver a estabilizar la temperatura, por estas razones, además de tener mejores características tecnológicas, se utilizó el horno BIOBASE.

Identificación de compuesto activo.

Con respecto a la identificación de moléculas de ácido hialurónico en el extracto final, se realiza por medio del espectro infrarrojo. Este equipo permite dar importante información acerca de la naturaleza química y estructura de la molécula en observación, la absorción de energía que muestran las moléculas en la región infrarrojo se produce debido a que sus núcleos entran en un modo de vibración en torno a sus posiciones de equilibrio. En

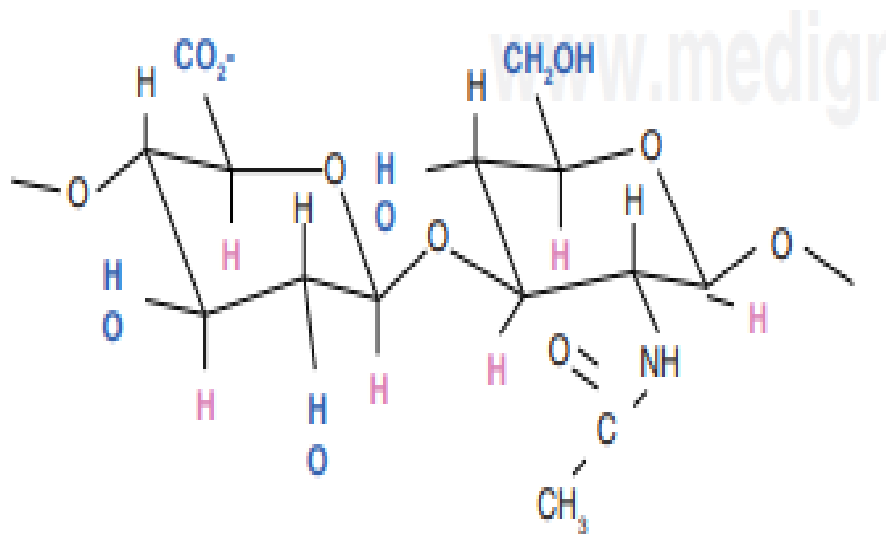
cada una de las vibraciones moleculares, los núcleos se desplazan simultáneamente de su posición de equilibrio hasta alcanzar un máximo desplazamiento⁶⁵.

Para la mayoría de los grupos funcionales, las frecuencias características de las vibraciones deben situarse en la región de 4000 a 1000. En la región de los 1300 a 4000, las frecuencias vibracionales son afectadas por la molécula entera, ya que la absorción en esta región de las huellas digitales es característica de toda molécula. La frecuencia de la vibración depende de las masas de los átomos y de la rigidez del enlace, los átomos más pesados vibran más lentamente que los más ligeros⁶⁵.

En cuanto al proceso de identificación del compuesto activo en las diferentes muestras extraídas mediante dos procesos diferentes obteniendo ácido hialurónico, se realizó una prueba utilizando un equipo de espectro infrarrojo, esta prueba de manera comparativa entre el estándar de ácido hialurónico con respecto a las demás muestras de las cuales se extrajo el compuesto. Es importante mencionar que no se profundiza el estudio de todos los picos del espectro.

En el análisis instrumental, la técnica de espectroscopia de infrarrojo se encuentra dentro de las técnicas que más se ha popularizado debido a su gran versatilidad, precisión y fácil utilización. La vibración producida en las moléculas orgánicas genera una idea de cómo están constituidas y se ve representado en los espectros por medio de porcentaje de transmitancia. Se puede observar la representación del enlace O-H dentro del rango de 3200 y 3400 donde se considera una vibración de fuerza media alta y ancha, mientras que en el enlace C-O las vibraciones son asimétricas y oscilan entre los 1000-1750⁵⁷.

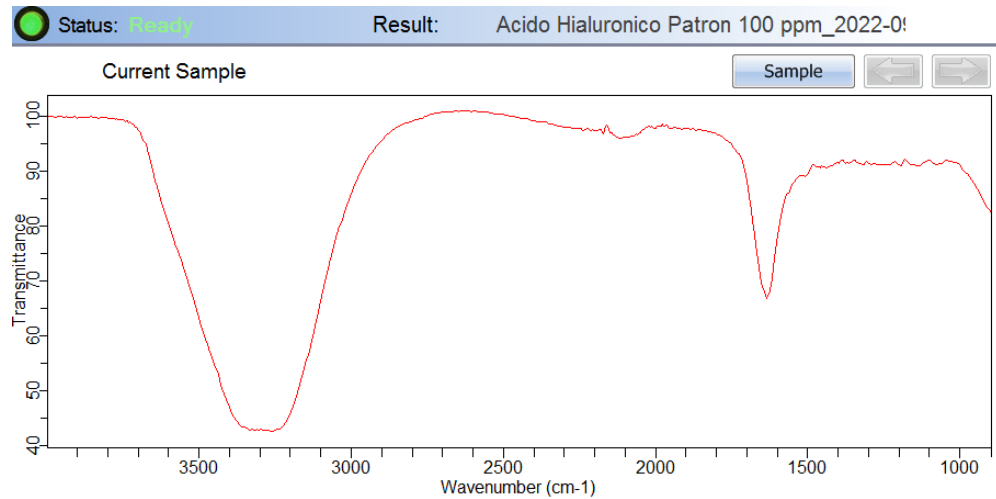
Figura 31. Estructura molecular y enlaces presentes en la estructura del ácido hialurónico.



Fuente: Corte et al³²

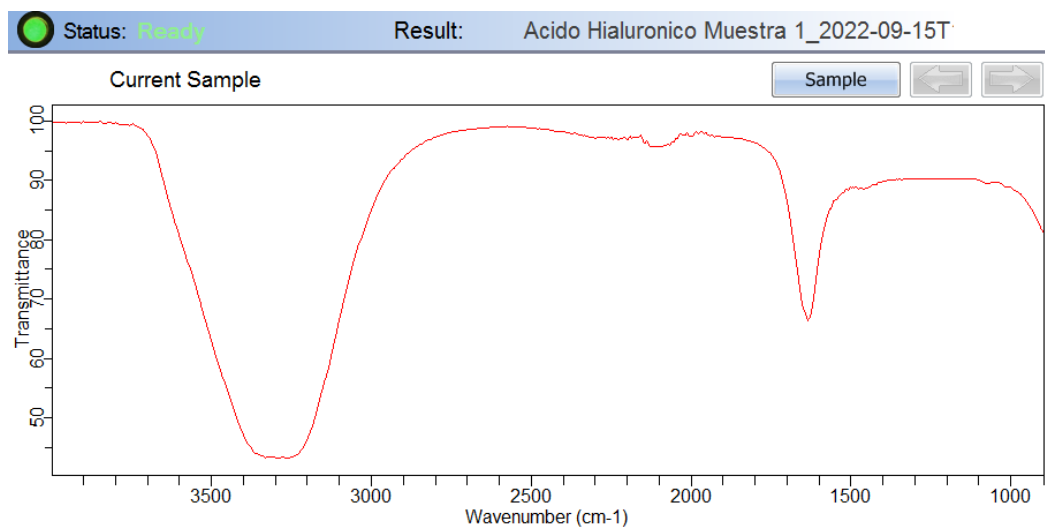
En la figura 27 se logra observar la estructura de la molécula del ácido hialurónico, donde se aprecian los diferentes tipos de enlaces entre los elementos, dentro de los enlaces presentes se encuentra el del grupo hidroxilo entre el rango de 3100 y 3600, también se observa un pico entre los 1630-1680 donde se puede relacionar a la presencia del grupo amida. En los rangos de 1375-1450 se pueden apreciar pequeñas elevaciones que hacen referencia a los enlaces C-H. Estos picos mencionados anteriormente se pueden evidenciar en las siguientes figuras, las cuales representan los diferentes espectros realizados con el espectrómetro infrarrojo.

Figura 32. Espectro infrarrojo del estándar de ácido hialurónico utilizando equipo de espectroscopia infrarroja marca Agilent.



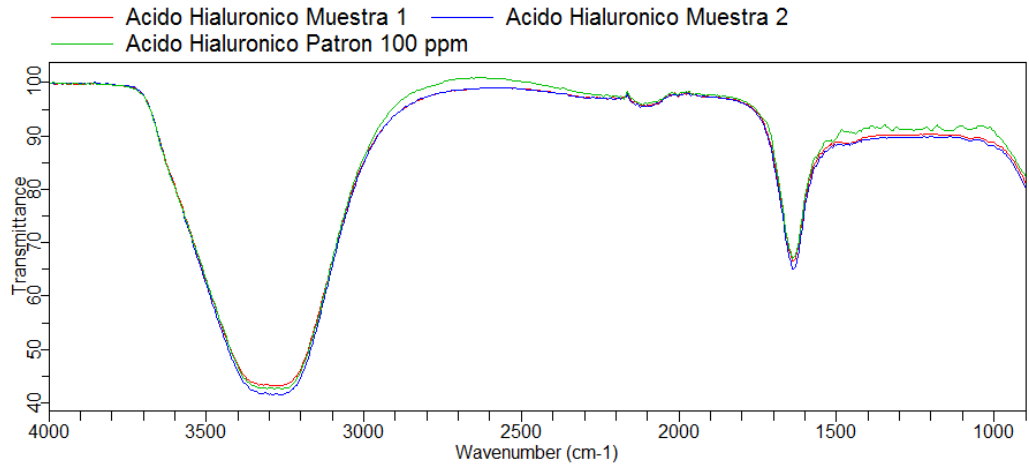
Fuente: elaboración propia

Figura 33. Espectro infrarrojo de la muestra extraída por proceso enzimático utilizando equipo de espectroscopia infrarroja marca Agilent.



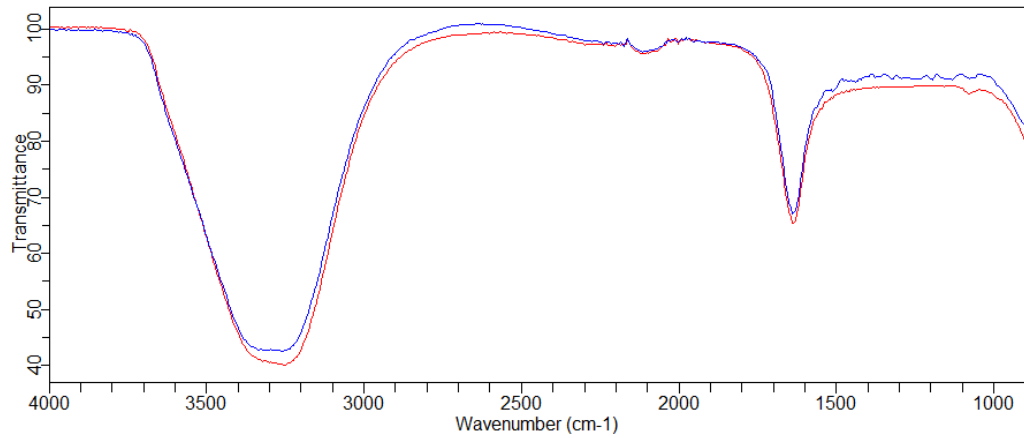
Fuente: elaboración propia.

Figura 34. Superposición del espectro infrarrojo del estándar contra dos lecturas del proceso enzimático utilizando equipo de espectroscopia infrarroja marca Agilent.



Fuente: elaboración propia.

Figura 35. Superposición del espectro infrarrojo del estándar contra un espectro del proceso con cloruro de sodio 0,5 M utilizando equipo de espectroscopia infrarroja marca Agilent



Fuente: elaboración propia.

En ambos casos se puede apreciar la similitud de ondas producidas por la vibración de los átomos, entonces se puede determinar que existe relación con respecto a estructuras entre el patrón de ácido hialurónico preparado y las dos diferentes extracciones que se realizaron en este proceso experimental. Los enlaces más fuertes generalmente son más rígidos, por lo que se requiere mayor fuerza para alargarlos o comprimirlos, por esta razón los enlaces más fuertes vibran más deprisa que los enlaces más débiles, como lo es el caso del enlace OH el cual tiene frecuencias más altas como se observa en las figuras anteriores en rangos de 3100-3600³².

Cuantificación del compuesto activo.

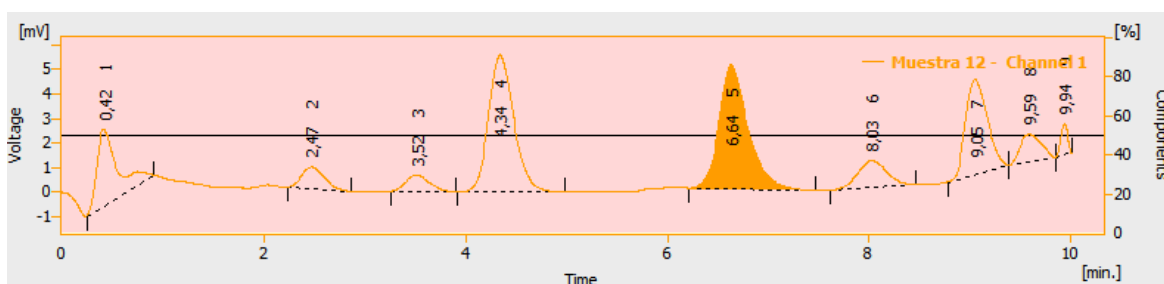
Para poder realizar la cuantificación de ácido hialurónico contenido en las diferentes muestras realizadas en el análisis se utilizó el equipo de Cromatografía líquida de Alta Resolución (HPLC) con condiciones de uso anteriormente descritas en la tabla 8. Se pudieron obtener de esta manera los tiempos de retención y áreas de los diferentes picos durante el proceso, esto para determinar concentraciones en unidades de partes por millón.

Por medio de HPLC se realiza una separación y análisis de los componentes químicos de las disoluciones realizadas en esta investigación. En este método participan la fase móvil y estacionaria las cuales son inmiscibles entre sí y la muestra de interés. La fase móvil es líquida y su función es transportar la muestra a través de la fase estacionaria que puede ser una película líquida soportada en un sólido o sólida de forma completa. Los componentes con mayor afinidad a la fase estacionaria se desplazan con menor velocidad que aquellos que presentan menor afinidad⁶⁶.

En este punto es importante recalcar que se utilizó una ecuación basada en diferentes concentraciones de disolución patrón, con concentraciones de 100, 200 y 400 (mg/L), esta ecuación fue recopilada de la investigación de Gómez Oviedo¹⁶. El uso de la ecuación es debido a que las lecturas de los patrones realizados en este proceso experimental no fueron exitosas, se realizaron 3 estándares diferentes y ninguno mostró resultados coherentes, es decir, los picos y áreas mostradas en el espectro no generan suficiente información como para realizar una curva de calibración.

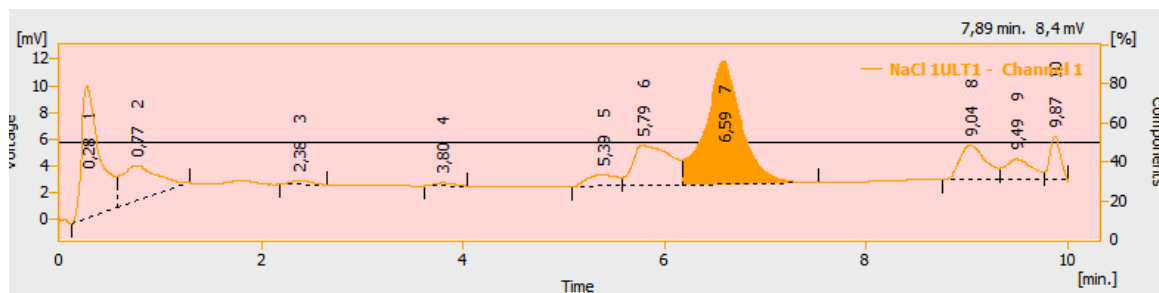
Dentro de las condiciones utilizadas en el sistema cromatográfico HPLC se utilizó una fase móvil constituida por fosfato (Dihidrogenofostato de potasio), a 0,05 M, el cual fue ajustado a pH 7 utilizando NaOH 1M como agente básico. En la figura 34 se puede observar que el tiempo de retención esperado para las soluciones que contengan ácido hialurónico se encuentra aproximadamente entre los 5 minutos. Sin embargo, el tiempo de retención que se expresó en las muestras de este estudio, fueron entre 6 y 7 minutos, de esta manera los resultados se enfocan en estos tiempos, comparando de esta manera el pico característico del ácido hialurónico sin profundizar en cada uno de ellos.

Figura 36. Espectro HPLC de la muestra obtenido por extracción enzimática.



Fuente: elaboración propia.

Figura 37. Espectro HPLC de la muestra obtenida por extracción con disolución de cloruro de sodio.



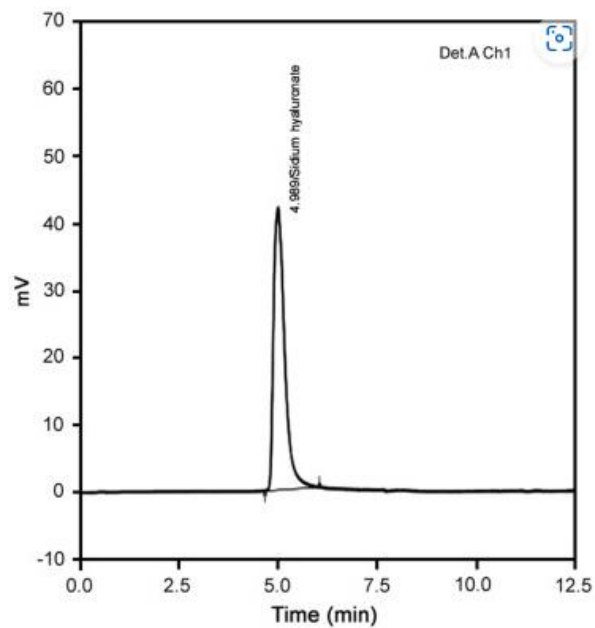
Fuente: elaboración propia.

Tabla 12. Secuencia de análisis utilizada para la lectura de muestras.

Sustancia	Alícuotas analizadas
Blanco	2
Muestra 1	3
Muestra 1.1	3
Muestra 2	3
Muestra 2.2	3
Muestra 3	3
Muestra 3.3	3
Muestra 4	3
Muestra 5	3
Muestra 6	3

Fuente: elaboración propia.

Figura 38. Espectro de ácido hialurónico.



Fuente: Ruckmani et al⁶⁶

Existen otros picos en los diferentes espectros de las muestras, es importante recordar que en las muestras enzimáticas se trabaja con otro tipo de reactivos como buffer, pepsina y ácido nítrico, por lo que estos espectros contemplan otras señales. Con respecto a las muestras del proceso con cloruro de sodio, también muestra otras señales debido a que existe otra estructura en este caso iónica, dentro de la solución analizada. Los diferentes tiempos de retención se pueden observar en la tabla 13.

Tabla 13. Tiempos de retención correspondiente a las muestras del proceso enzimático utilizando equipo HPLC marca YL.

Muestra	Tiempos de retención (min)		
1	6,637	6,637	6,540
1.1	6,340	6,743	6,613
2	6,740	6,727	6,623
2.1	6,727	6,733	6,620
3	6,610	6,603	6,623

Fuente: elaboración propia.

Se realizaron dos diferentes disoluciones en las muestras enzimáticas para determinar si las áreas iban a entrar dentro de la curva de calibración, en este caso se hicieron alícuotas de 5 mL en 10 (1,2,3), y también de 5 en 25 mL (1.1, 2.2). Sin embargo, las áreas son pequeñas comparadas con las áreas obtenidas para la realización de la curva. Se puede observar la similitud entre los diferentes tiempos de retención analizados, de esta manera se logra interpretar que en las muestras analizadas se confirma la presencia de ácido hialurónico.

Tabla 14. Tiempos de retención correspondiente a las muestras del proceso con disolución de cloruro de sodio al 0,5 M utilizando equipo HPLC marca YL.

Muestra	Tiempos de retención (min)		
4	6,530	6,587	6,593
5	6,533	6,530	6,593
6	6,510	6,517	6,503

Fuente: elaboración propia.

En la tabla 15 se encuentran las diferentes áreas del pico en interés, todas las áreas coinciden con las tablas 13 y 14 en relación a los tiempos de retención de las muestras. En este caso se observa un área más pronunciada con respecto a las muestras 3 y 6 analizadas. Esto pudo generarse debido a que las muestras 1,2,4 y 5 no fueron procesadas de igual forma que las demás muestras, ya que para las últimas muestras, se utilizó la licuadora disponible en el laboratorio de la Universidad, pero con ayuda de una superficie plana se pudo acortar el volumen donde las membranas estaban siendo cortadas, aumentando de esta manera la capacidad de corte por parte de las cuchillas del procesador.

Es importante mencionar que todas las membranas se procesaron con este mismo instrumento, pero con ese pequeño cambio al final, este cambio se hizo debido a que no se consiguió extraer tanto ácido hialurónico en los primeros ensayos. Con esa modificación se consigue obtener mayor cantidad de ácido hialurónico en forma de polvo, mientras que la proporción de polvo en los primeros procesados fue bastante baja, debido a que el procesador cortaba muy poco y debido al giro de las cuchillas los restos de membrana prácticamente flotaban por la totalidad del recipiente.

Tabla 15. Área del pico del ácido hialurónico presente en las muestras del proceso enzimático y el de disolución con NaCl 0,5 M.

Muestra	Área del pico del analito (mVxs)		
1	109,799	101,170	128,362
2	179,212	99,046	106,410
3	250,659	269,014	282,949
4	163,257	228,322	225,176
5	166,843	147,908	200,199
6	823,204	824,879	863,813

Fuente: elaboración propia.

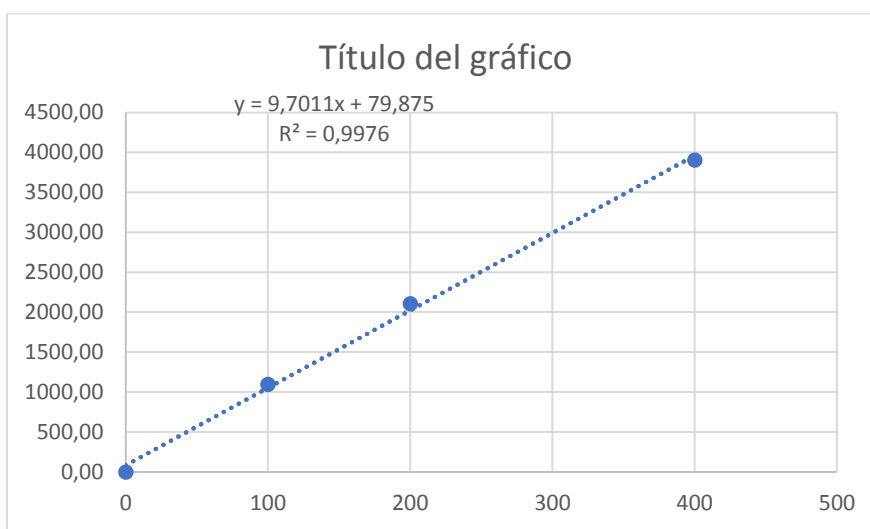
Por medio del uso de la ecuación de la recta planteada por Gómez Oviedo¹⁶ donde realiza análisis a diferentes disoluciones del estándar de ácido hialurónico se puede realizar la determinación de concentraciones de las diferentes muestras de esta investigación, teniendo en cuenta que se agrega el punto de origen 0,0 en ambos ejes, esto se debe a que las áreas no entran dentro del rango entre 100 ppm y 400 ppm, los datos utilizados para generar la curva son:

Tabla 16. Datos utilizados para generar la curva de calibración.

X (Concentración en mg/L)	Y (Área promedio (mV.s))
0	0.0
100	1098.127
200	2107.629
400	3904.506

Fuente: elaboración propia

Figura 39. Gráfica correspondiente a las concentraciones de estándar contra las áreas generadas en el espectro.



Fuente: elaboración propia.

A partir de los datos contenidos en la tabla anterior se genera la siguiente ecuación:

$$y = 9,7011x + 79,875$$

Desviación estándar: 0,9976

Despejando X: $y - 79,875 = 9,7011x$

$$x = \frac{y - 79,875}{9,7011}$$

Proceso de determinación de ácido hialurónico para una muestra extraída de la hidrolisis enzimática y para otra extraída con disolución de cloruro de sodio utilizando la ecuación anterior:

Muestra 3: $x = \frac{259,8356 - 79,875}{9,7011}$

Utilizando área 1 y 2: $x = 18,5506 \text{ ppm}$

Promedio: 259,8365 mVxs

Concentración x Factor de dilución (balón / pipeta)

$$18,5506 \text{ ppm} \times \left(\frac{10\text{mL}}{5\text{mL}}\right) = 37,1012 \text{ ppm}$$

$$37,1012 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 0,166 = 6,15 \text{ mg}$$

Muestra 6: $x = \frac{837,2986 - 79,875}{9,7011}$

Utilizando área 1,2 y 3: $x = 78,0760 \text{ ppm}$

Promedio: 837,2986 mVxs

Concentración x Factor de dilución (balón / pipeta)

$$78,0760 \text{ ppm} \times \left(\frac{10\text{mL}}{5\text{mL}}\right) = 156,1521 \text{ ppm o mg/L}$$

$$156,1521 \text{ mg/L} \times 0,244 \text{ mL} = 38,1011 \text{ mg}$$

Tabla 17. Miligramos de ácido hialurónico presentes en los extractos enzimáticos.

Muestra	Áreas utilizadas	Promedio de áreas	Volumen del extracto (L)	Cantidad de ácido hialurónico (mg)
1	1,2,3	113,1103	0,099	0,67
2	2,3	102,7280	0,120	0,56
3	1,2,3	267,5407	0,166	6,15

Fuente: elaboración propia.

Tabla 18. Miligramos de ácido hialurónico presentes en los extractos con disolución de cloruro de sodio 0,5 M.

Muestra	Áreas utilizadas	Promedio de áreas	Volumen del extracto (L)	Cantidad de ácido hialurónico (mg)
4	2,3	226,7490	0,140	4,23
5	1,2,3	171,6530	0,138	2,61
6	1,2,3	837,2986	0,244	38,10

Fuente: elaboración propia.

4.2 Desarrollar la formulación un suero tópico de hidratación para la piel a base de ácido hialurónico extraído de las membranas testáceas de las cáscaras de huevo en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas.

Debido a que el extracto del proceso enzimático contiene trazas de otros materiales como ácido nítrico, buffer de fosfato y restos de aminoácidos provenientes de la pepsina, se decide realizar otro método de extracción que contenga menor cantidad de solutos presentes, además de evitar el uso e incorporación de sustancias fuertes como ácidos o bases en la formulación farmacéutica, evitando de esta manera posibles efectos secundarios debido a la presencia de estas sustancias.

Se realizaron varias formulaciones con diferentes materiales, por ejemplo se utilizó un material llamado Prolipid (mezcla de glicerol estearato, ácido palmítico, ácido esteárico, lecitina, alcohol láurico, alcohol cetílico y alcohol miristirilico), el cual se utiliza para la manufactura de cremas, sueros e hidratantes para piel, cara y manos, pero al tener mucha fase acuosa contenida en el extracto y un porcentaje acuoso alto en general para la formulación del suero, el material no se homogenizó en la formulación, de esta manera se descarta la utilización de esta materia prima, además de que el Prolipid debe alcanzar temperaturas de 75-80 grados centígrados para poder disolverse, esto conlleva a una posible degradación del ácido hialurónico.

Otra de las formulaciones que se realizaron en el laboratorio, fueron con hidroxietilcelulosa como agente gelificante. Según el proceso y guía del HandBook⁶⁹ de excipientes, la hidroxietilcelulosa debía generar un gel al fin de una hora de disolución constante, y se podía elevar la temperatura hasta unos 70 grados centígrados para aumentar la velocidad de gelificación. Para que la disolución se gelificara de manera correcta tardaba menos de este tiempo, además de que la temperatura a la que gelificó se encontró entre el rango de 35 y 45 grados.

Al tener una temperatura baja de gelificación y condiciones que permitieran la estabilidad de la sustancia activa o ingrediente estelar, estas formulaciones tomaron una fuerte posibilidad para la realización final del suero; pero la coloración del suero al final era amarillenta, debido a la hidroxietilcelulosa disuelta. Otro de los factores fue que al ponerlo en piel no mantenía una consistencia uniforme, sino que se dispersaba cuando se ponía en contacto con la piel, además de presentar en algunas ocasiones pequeñas porciones de hidroxietilcelulosa, aunque fueran tamizados con malla.

Debido a este tipo de inconvenientes en la manufactura de la formulación, se realiza otro ensayo con carbomero (Carbopol 940). El proceso de formulación con carbopol no necesita aumentos de temperatura, pero sí requiere de un exigente tamizaje, ya que si no se tamiza de la manera correcta van a quedar partículas de diferente tamaño, lo que afecta directamente en la homogenización de la mezcla, quedando pequeñas aglomeraciones dentro de la disolución.

Una de las observaciones que se realizó durante el experimento es que el pH de la disolución baja de manera considerable, cuando se disuelve el carbomero; pero no es tan bajo como para que llegue a afectar la estructura tridimensional del ácido hialurónico y eliminar consecuentemente sus propiedades. La propiedad gelificante del carbomero resulta activada al aumentar su pH, en este caso la sustancia utilizada para este propósito fue la trietanolamina.

La formulación final se realizó tras probar diferentes concentraciones de los excipientes en la disolución, esto para determinar cuál posee mejores características, además de cumplir con la satisfacción del formulador, que en este caso es el responsable en decidir qué tipo de formulación según sus características es la más adecuada. Los excipientes utilizados en este caso se pueden observar en la tabla 19.

Tabla 19. Materiales específicos, porcentaje y cantidades utilizadas para realizar la formulación de 200 gramos.

Excipiente	Porcentaje (%)	Cantidad utilizada (g)
Glicerina	2,5	5
Agua destilada	35,225	70,45
Disolución de Ácido hialurónico en NaCl 0,5 M	60	120
Metilparabeno	0,025	0,05
Carbopol	0,75	1,5
Trietanolamina	1,5	3

Fuente: elaboración propia

A continuación, se realizará una descripción de los diferentes excipientes utilizados en la formulación, esta información es relevante debido a que en algunos casos, los excipientes deben de tener diferentes tipos de tratamientos o porcentajes establecidos para obtener una formulación adecuada. Además, se analizó la posibilidad de interacciones entre los excipientes, estos datos son bastante importantes de analizar debido a que se pueden generar diversos problemas entre sustancias que perjudiquen de manera directa a la formulación.

1. Glicerina

Esta sustancia es utilizada en formulaciones farmacéuticas tópicas y cosméticos, se utiliza principalmente por sus propiedades humectantes y emolientes. También es utilizado en cremas y emulsiones como solvente o cosolvente. La glicerina se puede usar en geles acuosos como es el caso de la presente formulación, también se utiliza en geles no acuosos⁶⁷, en la tabla 20 se pueden observar diferentes propiedades fisicoquímicas de la glicerina.

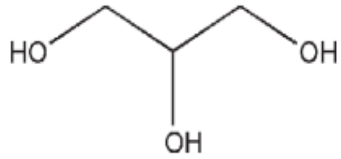
En la selección del humectante hay que tener en cuenta que la formulación no sea un obstáculo para procesos de descamación normal controlado por encimas, la glicerina es con

frecuencia el humectante de elección por esta razón. La glicerina no solo atrae agua, sino que también se ha sugerido su efecto modulador en el comportamiento de lípidos del estrato córneo⁶⁷.

El modo de acción de la glicerina, tanto en la hidratación del estrato córneo como en el de barrera epidérmica está relacionado con el canal de acuaporina 3. Las acuaporinas son una familia de proteínas integrales de membrana, las cuales funcionan como transportadores de membrana plasmática de agua y en ocasiones pequeños solutos polares. Durante algunas horas después de la aplicación se ha observado que hay disminución en la pérdida transepidérmica de agua⁶⁷.

No se ha observado evidencia en el deterioro de la función de barrera cutánea después de largos periodos de tratamiento de la piel normal y atópica con glicerina al 20%. De hecho, se ha encontrado que la glicerina acelera el proceso de recuperación de la barrera cutánea después de perturbaciones externas agudas. También se sugiere que la glicerina induce reducción en los corneocitos superficiales⁶⁷.

Tabla 20. Propiedades fisicoquímicas de la glicerina.

Estructura molecular	
Fórmula y peso molecular	C ₃ H ₈ O ₃ / 92.09 g/mol
Categoría funcional	Preservante antimicrobiano, cosolvente, emoliente, humectante, plastificante, solvente, edulcorante y agente de tonicidad.
Descripción	Líquido transparente, incoloro, inoloro, viscoso e higroscópico, tiene un sabor dulce.
Porcentaje sugerido	Preservante antimicrobiano: <20 Emoliente: <30 Humectante: <30

Solubilidad en agua	Soluble
Densidad	1,2620 a 15 °C
Punto de ebullición (descomposición)	290°C
Punto de fusión	17.8
Incompatibilidades	Agentes oxidantes fuertes (cloruro de potasio y permanganato de potasio), decoloración en presencia de luz. Genera complejos cuando se mezcla con fenoles, salicilatos y taninos.

Fuente: elaboración propia basado en la referencia ⁶⁷

2. Ácido hialurónico

Según los cálculos para la determinación de ácido hialurónico en el gel, que se realizan más adelante en el presente documento, la cantidad de ácido hialurónico en la formulación farmacéutica se aproxima a los 18-20 mg. Por tanto, si se utilizara el valor de 20 mg en la formulación, el cálculo del porcentaje utilizado sería el siguiente:

$$\frac{0,02g \times 100}{200g} = 0,01\% \frac{m}{m}$$

Tabla 21. Propiedades fisicoquímicas del ácido hialurónico

Estructura molecular	<p style="text-align: center;">ÁCIDO HIALURÓNICO</p>
Fórmula y peso molecular	$C_{14}H_{21}NO_{11}$ / 1000000 Daltons (Alto peso molecular)
Categoría funcional	Hidratante
Descripción	El ácido hialurónico se encuentra en disolución con cloruro de sodio 0,5 M. La disolución posee un aspecto viscoso, además de tornarse con una leve coloración amarilla. Inodoro.
Porcentaje sugerido (cosmético)	0,01-3%
Solubilidad en agua	Soluble
Incompatibilidades	Desinfectantes que contengan sales de amonio cuaternario, debido a que puede generar precipitación del mismo.

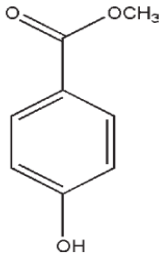
Fuente: elaboración propia basado en la referencia⁶⁷

3. Metilparabeno

Este excipiente es bastante utilizado como preservante antimicrobiano en cosméticos, alimentos y formulaciones farmacéuticas. Se puede utilizar solo o suele usarse en combinación con otros parabenos o preservantes antimicrobianos de otro tipo. En cosméticos, el metilparabeno es el más utilizado como preservante. Los parabenos son efectivos en un amplio rango de pH y con amplio espectro de actividad antimicrobiana, aunque son más eficaces contra levaduras y mohos⁶⁹.

La actividad como preservante antimicrobiano en el caso del metilparabeno se genera en rangos de pH 4-8, cuando hay aumentos de pH, el metilparabeno tiende a disminuir su eficacia debido a la formación del anión fenolato. Este tipo de preservantes es más efectivo contra mohos y levaduras que contra bacterias. Con respecto a la eficacia bacteriana, se reporta que el metilparabeno posee mayor actividad contra bacterias gram positivas que contra las gram negativas⁶⁷.

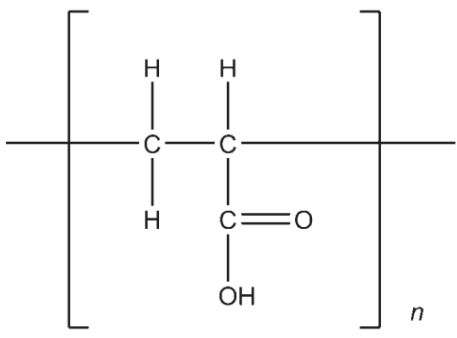
Tabla 22. Propiedades fisicoquímicas del metilparabeno.

Estructura molecular	
Fórmula y peso molecular	C ₈ H ₈ O ₃ / 152.15 g/mol
Categoría funcional	Preservante antimicrobiano
Descripción	Cristal incoloro o blanco. Inodoro o casi inodoro, posee un ligero ardor al gusto.
Porcentaje sugerido (cosmético)	0,02-0,3
Solubilidad en agua	Soluble 1:400
Densidad	1,352 g/ml
Punto de ebullición (descomposición)	125-128°C
Incompatibilidades	Surfactante no iónicos (Polisorbato 80), bentonita, trisilicato de magnesio, talco, alginato de sodio, aceites esenciales, sorbitol y atropina.

Fuente: elaboración propia basado en la referencia⁶⁷

4. Carbopol (carbomero)

Tabla 23. Propiedades fisicoquímicas del Carbopol 940

Estructura molecular	 <p>The diagram shows a polymer chain segment enclosed in large square brackets with a subscript 'n' at the bottom right. The chain consists of two carbon atoms connected by a single bond. The left carbon atom is bonded to two hydrogen atoms (H) above and below it. The right carbon atom is bonded to one hydrogen atom (H) above it and a carboxylic acid group below it. The carboxylic acid group consists of a carbon atom double-bonded to an oxygen atom (O) and single-bonded to a hydroxyl group (OH). The polymer chain continues to the left and right, indicated by horizontal lines passing through the carbon atoms.</p>
Fórmula y peso molecular	Entre el 52-68% de sus estructura está compuesto por ácidos carboxilicos / 140 400 g/mol
Categoría funcional	Material bioahesivo, agente de liberación controlada, emulsionante, estabilizador de emulsión, modificante de reología, agente de suspensión y aglutinante en tabletas.
Descripción	Polvo de color blanco “esponjoso”, ácido e higroscópico con un olor característico.
Porcentaje sugerido	Agente gelificante: 0.5-2.0
Solubilidad en agua	Soluble, también en glicerina
Densidad	0,2 g/ml
Punto de ebullición (descomposición)	260°C

Incompatibilidades	Los carbomeros son decolorados cuando se combinan con resorcinol e incompatibles con fenoles, polímeros catiónicos, ácidos fuertes y altos niveles de electrolitos. Trazas de metales pueden generar la dispersión de los carbomeros. Los preservantes se deben utilizar en bajas proporciones.
--------------------	---

Fuente: elaboración propia basado en la referencia⁶⁷

Para utilizar el carbopol 940 dentro de la formulación, se realizó primeramente un tamizado con la ayuda de un colador pequeño, después fue tamizado con una malla de tamizado número 80, esto para homogenizar el tamaño de partícula, facilitando de esta manera la disolución parcial de este material. Es importante recordar que los carbomeros no se disuelven, sino que se hinchan y se puede notar con el paso del tiempo debido a que son microgeles reticulados. Aunque no se disuelven, es importante tamizar debido a que llegan a generar aglomeraciones, causando de esta manera reducción en la homogenización de la mezcla⁶⁷.

Los carbomeros se dispersan en agua para dar lugar a dispersiones coloidales que cuando se neutralizan, producen geles altamente viscosos. Los polvos del carbomero deben dispersarse primero en agua agitando de manera vigorosa para evitar la formación de aglomeraciones, después de un proceso de agitación se agrega el agente neutralizante que puede ser (triatanolamina, aminoácidos, hidróxido de sodio, es importante tener en consideración que al momento de agregar este agente, se debe disminuir la velocidad de agitación o preferiblemente realizar un mezclado manual para evitar la formación de burbujas⁶⁷.

Los geles acuosos neutralizados a pH 6-11 son los que presentan mayor viscosidad, contrariamente cuando se encuentran fuera del rango de pH 3-12, su viscosidad se ve bastante reducida. Los geles pierden viscosidad rápidamente cuando se exponen a la luz ultravioleta, por lo que es recomendable la adición de un antioxidante. Dentro de los preservantes recomendados para utilizar carbomeros se encuentran: clorocresol, metilparabeno,

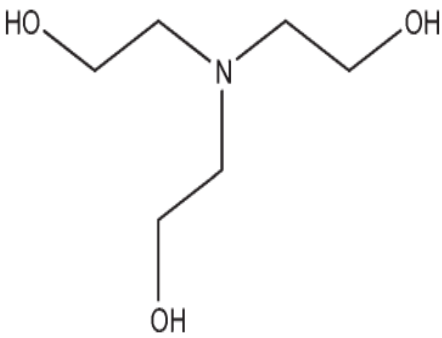
propilparabeno o timerosal; no obstante, el uso de benzoato de sodio en altas concentraciones (0.1%) puede reducir la viscosidad de este tipo de dispersiones⁶⁷.

Con respecto a los agentes que se pueden utilizar para disminuir la oxidación y, por consiguiente, pérdida en la viscosidad, se recomienda agregar a la formulación un agente soluble en agua que absorba rayos UV en proporción de 0,05-0,1% de benzofenona 2 o benzofenona 4, pero en el laboratorio no se encontraba ninguno de los dos reactivos por lo que no se puede realizar esta precaución. Es importante tener en cuenta el uso de guantes, lentes y mascarilla en el manejo de este reactivo debido a que produce fácilmente irritación de mucosas⁶⁷.

5. Trietanolamina

Como agente alcalinizante para la formulación se utiliza la trietanolamina, es un excipiente muy utilizado en la formulación de productos tópicos, especialmente en emulsiones.

Tabla 24. Propiedades fisicoquímicas de la trietanolamina

Estructura molecular	
Fórmula y peso molecular	$C_6H_{15}NO_3$ / 149,19 g/mol
Categoría funcional	Agente alcalinizante y emulsificante
Descripción	Es un líquido viscoso transparente, con un color amarillo pálido que posee un ligero olor a amoníaco.
Porcentaje sugerido	Cantidad suficiente para llegar a pH 6, aproximadamente 3.5 mL en la presente formulación.

Solubilidad en agua	Miscible
Densidad	1,120 g/ml
Punto de fusión	21,6°C
Punto de ebullición	335°C
Incompatibilidades	Reacción con ácidos minerales formando sales cristalinas y esteres. Forma sales solubles en agua con ácidos grasos. También reacción con cobre formando sales complejas.

Fuente: elaboración propia basado en la referencia⁶⁷

6. Cloruro de sodio

Este componente debe ser tomado en cuenta debido a que es uno de los ingredientes de la formulación, ya que es el componente que se utilizó para poder realizar la extracción con cloruro de sodio, entonces, aunque no fue agregado a la formulación de manera puntual, es una sustancia que va incorporada en la disolución que contiene la sustancia activa, por esta razón debe ser considerada en este apartado.

Es importante tener en cuenta la cantidad aproximada de cloruro de sodio que se utilizó dentro de la formulación, aunque no se utilizó un porcentaje en específico para formular, este dato se puede determinar mediante la siguiente relación:

Para preparar 1 litro de disolución 0,5 M se necesita 29,22 gramos de cloruro de sodio.

Se utilizó 120 mL de disolución de cloruro de sodio 0,5 M entonces:

$$\frac{29,22g}{1litro} = \frac{X}{0,120} = 3.5064 \text{ gramos}$$

$$\frac{3.5064 \times 100}{200g} = 1,7532\%$$

Tabla 25. Propiedades fisicoquímicas del cloruro de sodio

Estructura molecular	
Fórmula y peso molecular	NaCl / 58,44 g/mol
Categoría funcional	Diluyente en tabletas y cápsulas, agente de tonicidad.
Descripción	Polvo cristalino blanco o sin color, con sabor salado.
Porcentaje utilizado	1,7532% (Porcentaje contenido en la disolución de 0,5 M utilizada para la extracción.
Solubilidad en agua	Soluble 1:2,8
Densidad	2,17 g/ml
Punto de ebullición	804°C
Incompatibilidades	Las soluciones acuosas son corrosivas para el hierro. También reaccionan para formar precipitados con sales de plata, plomo y mercurio. La adición de cloruro de sodio a formulaciones con carbomero e hidroxietilcelulosa disminuye su viscosidad.

Fuente: elaboración propia basado en la referencia⁶⁷

Debido a la última incompatibilidad descrita en la tabla 25, las formulaciones se realizaron con una disolución blanco de cloruro de sodio 0,5 M, esto para observar y analizar el comportamiento de la formulación, debido a que hay que tener en cuenta la disminución en la viscosidad que genera el cloruro de sodio, además de que se disponía de 250 mL de

disolución con ácido hialurónico, entonces para no desperdiciar esta solución en formulaciones, se realizó la solución blanco de cloruro de sodio 0,5 M.

Tabla 26. Materiales utilizados y su respectiva función en la formulación.

Material o sustancia	Propiedad en formulación
Glicerina	Emoliente, preservante antimicrobiano, vehículo, agente humectante
Agua destilada	Disolvente
Disolución de ácido hialurónico en NaCl 0,5 M	Sustancia activa
Metilparabeno	Preservante antimicrobiano
Carbopol	Agente gelificante
Trietanolamina	Agente neutralizante de Carbopol

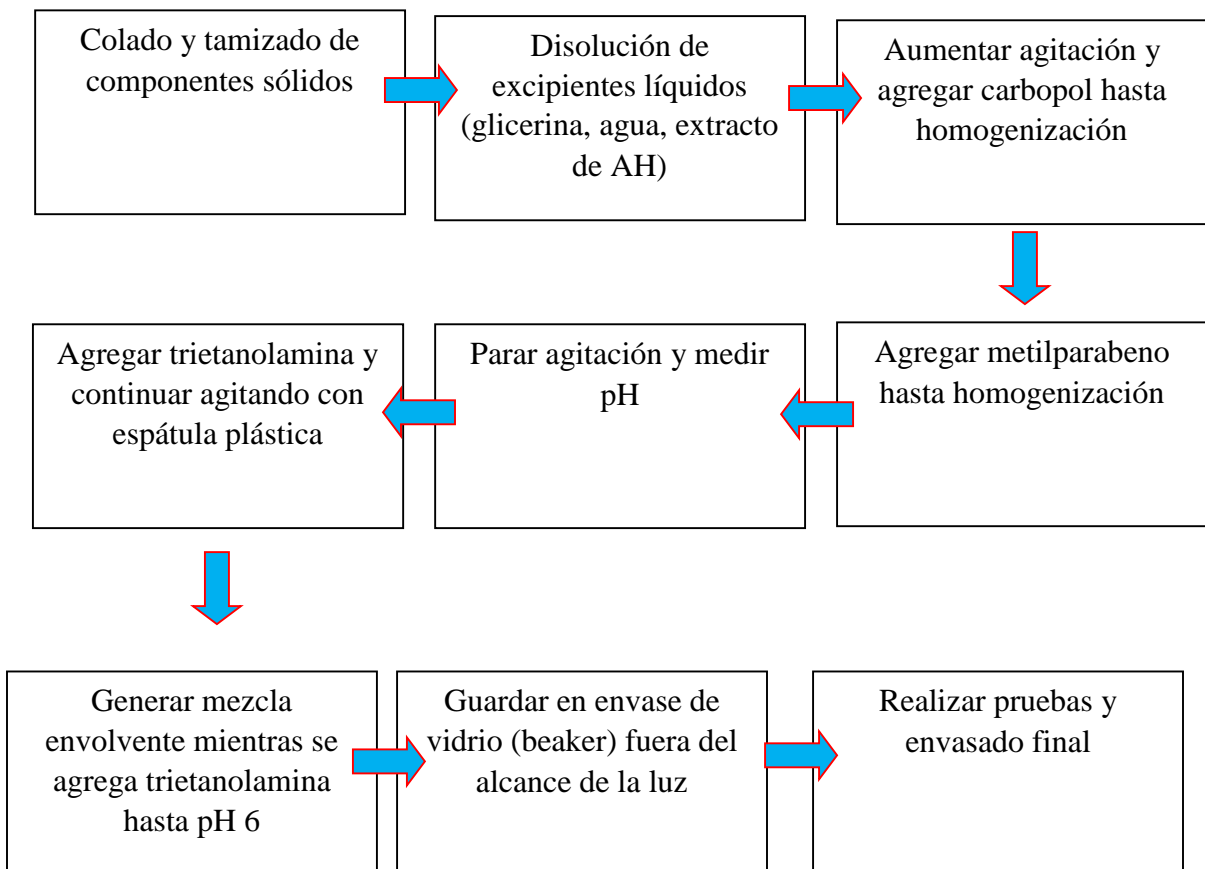
Fuente: elaboración propia basada en la referencia⁶⁷

Proceso de formulación:

- a) Colado y tamizado en malla 80 de los componentes de carácter sólido.
- b) En un beaker de 400 mL agregar la glicerina, agua destilada y disolución de cloruro de sodio 0,5 M con ácido hialurónico.
- c) Mantener agitación constante con mezclador a 350 rpm para garantizar disolución de excipientes líquidos.
- d) Agregar Carbopol 940 de forma cautelosa en pequeñas porciones, para evitar posibles aglomeraciones del material.

- e) Agregar el metilparabeno hasta homogenización.
- f) Aumentar la agitación a 700 rpm durante 45 minutos hasta generar una disolución homogénea.
- g) Una vez que la disolución se torna homogénea, se quita el mezclador y se procede a utilizar mezcla manual con espátula plástica, esto se hace para evitar la entrada de burbujas de aire en la formulación.
- h) Determinar pH de la disolución y agregar trietanolamina con gotero agitando la disolución de forma envolvente, hasta llegar a pH 6, donde se observa la gelificación de la formulación final.
- i) Almacenar en envase de vidrio, realizar pruebas y envasado final.

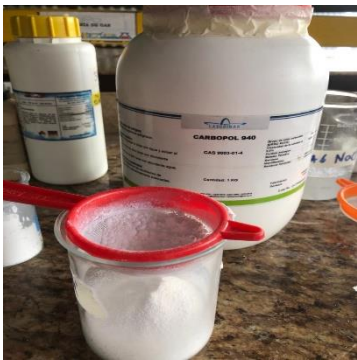
Figura 40. Diagrama de flujo del proceso de formulación con Carbopol 940.



Fuente: elaboración propia

Figura 41. Proceso de formulación de suero.

Proceso de tamizaje
con colador de
excipientes sólidos



Tamizaje con malla 80
de excipientes sólidos



Determinación de
masas de los diferentes
excipientes



Mezcla vigorosa de
carbopol y excipientes
líquidos

Determinación de pH
de la solución y
adición de TEA

Formulación final



Fuente: elaboración propia.

4.3 Determinar características generales del suero tópico desarrollado y sus posibles aplicaciones como aporte a los cuidados dermocosméticos de usuarios adultos jóvenes.

Se deben realizar diferentes pruebas a la formulación farmacéutica para garantizar de esta manera el control de calidad del producto y también de la misma manera asegurar a la población que el producto mantiene sus características de acuerdo a especificaciones. Es importante recalcar que la formulación que se realizó en el presente proyecto, debe cumplir con el Reglamento Técnico Centroamericano 71.03.45:07 oficializado por el Consejo de Ministros de Integración Económica de Centroamérica (COMIECO), esto debido a que el Ministerio de Salud de Costa Rica forma parte de los Subgrupos de Normalización y de Medicamentos y Productos Afines.

Como primer punto, el reglamento establece que el producto debe estar etiquetado según el RCTA 71.03.36:07 donde describe que el producto debe contener la clasificación de la forma cosmética, cantidad neta del producto dentro del empaque primario, nombre del titular y país de origen, declaración de la lista de ingredientes y la declaración del lote, en caso de que contenga sustancias que no pueden entrar en la composición de productos cosméticos⁶⁸, pero en la formulación de este producto no se conoce existencia de este tipo de sustancias. La etiqueta que se realizó para el producto se puede apreciar en la figura 41.

Figura 42. Etiqueta del envase primario de suero de ácido hialurónico.



Fuente: elaboración propia.

Teniendo en cuenta el RCTA para el control de calidad de productos cosméticos, se procede a hacer diferentes determinaciones con el fin de obtener una formulación con todos los requerimientos ejecutados y analizados, dentro de las pruebas que se especifican en este reglamento se encuentran las características organolépticas de la formulación, estos análisis se detallan a continuación en la tabla 27.

Tabla 27. Características organolépticas de la formulación farmacéutica (suero).

Aspecto	Se trata de un producto en forma líquida, es decir adopta la forma del contenedor. Es de apariencia viscosa, extensible y refrescante.
Color	Posee un color transparente con un ligero tono blanquecino o lechoso.
Sabor	El producto presenta un leve sabor dulce, debido a la glicerina presente.
Olor	El producto posee un olor leve característico a carbomero cuando se realiza la prueba desde el contenedor, pero al manipular una dosis pequeña el olor desaparece.

Fuente: elaboración propia

Con respecto a las pruebas físicas que se le realizaron a la formulación, se observa que el pH obtenido se encuentra dentro del rango permitido, el cual debe estar entre 6 y 7,5⁶⁹. En esta formulación el resultado de pH fue de 6, esto se realizó mediante la adición de la trietanolamina como agente alcalinizante. Los resultados de las pruebas físicas se pueden observar en la tabla 28.

Tabla 28. Pruebas físicas, pH, densidad y viscosidad del suero.

pH	6
Densidad	1,0205 g/ml
Viscosidad del suero (rotor 1 a 60 rpm)	196 mPAxs

Fuente: elaboración propia

Tabla 29. Cálculo de densidad

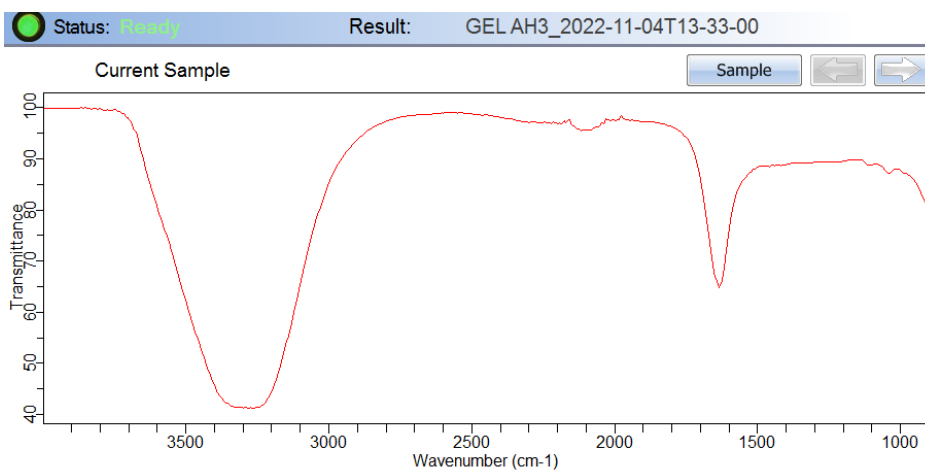
Masa del picnómetro	25,3650
Masa picnómetro + suero	51,1005
Masa del suero	25,7355
Volumen del picnómetro	25,218
Densidad del suero	$25,7355 / 25,218 = 1,0205 \text{ g/ml}$

Fuente: elaboración propia

Entre los factores que pueden influir en el desarrollo de microorganismos se destacan: componentes, pH, disponibilidad de oxígeno, estructura biológica, poder conservante y también la cantidad de agentes antimicrobianos, esto es lo que determina la formación de microorganismos en el producto cosmético⁶⁹. En los resultados de las pruebas microbiológicas

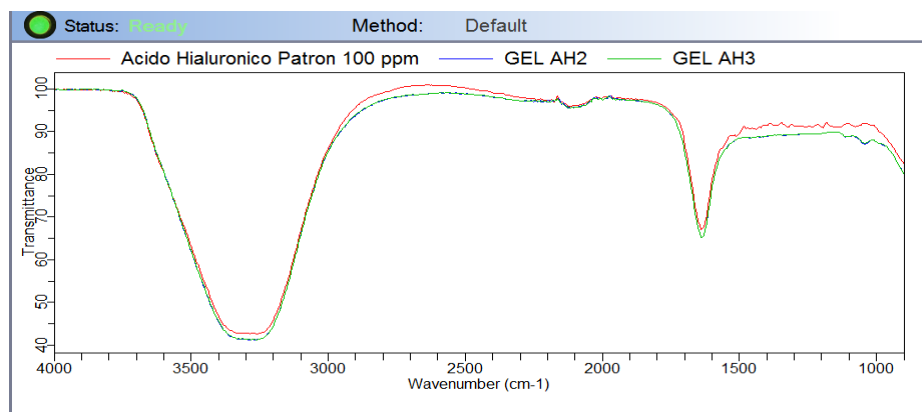
El RCTA especifica que se deben de realizar pruebas químicas de identificación y también de contenido de la sustancia activa en este caso es el ácido hialurónico. Se realizó identificación de compuestos mediante espectroscopia infrarroja como se hizo en el primer objetivo, además de la misma manera para identificar y poder cuantificar la cantidad de ácido hialurónico contenido en el suero, se realizó un análisis por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Figura 43. Espectro infrarrojo del gel con ácido hialurónico.



Fuente: elaboración propia

Figura 44. Superposición de dos muestras de gel con respecto a un patrón de ácido hialurónico.

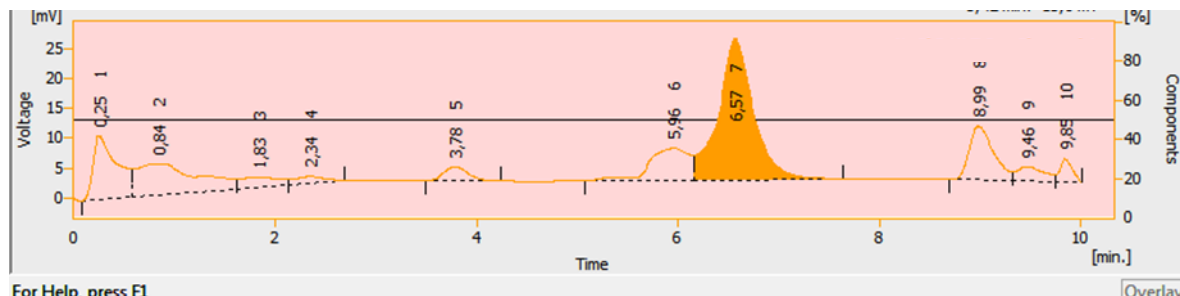


Fuente: elaboración propia.

Como se puede observar en las dos figuras anteriores, existe semejanza entre las curvas generadas por el espectro fotógrafo, de esta manera se puede reconocer que hay presencia de estructuras correspondientes a ácido hialurónico, tomando en cuenta también que hay otro tipo de sustancias que puedan presentar grupos funcionales que expresen estas

curvas. Para la determinación de la cantidad de ácido hialurónico se utilizaron espectros de HPLC, los cuales se pueden observar en la figura 39 y 40.

Figura 45. Espectro del gel utilizando equipo HPLC como método de análisis.



Fuente: elaboración propia.

En este espectro se puede observar el pico característico del ácido hialurónico con tiempo de retención en 6,577 min, con un área específica de 571, 423 mV x s. Es importante recordar que esta área, representa tan solo 120 mL del total de 244 mL de la muestra 6. Entonces se debe realizar un cálculo para determinar si el gel contiene la cantidad esperada de ácido hialurónico agregado durante el proceso de formulación.

La cantidad de mg de ácido hialurónico en 244 mL es de 38,1011, pero al multiplicarlo por el volumen utilizado en la formulación sería de 0,120 mL, este cálculo se genera de la siguiente manera

$$\text{Muestra 6:} \quad x = \frac{837,2986 - 79,875}{9,7011}$$

$$\text{Utilizando área 1,2 y 3:} \quad x = 78,0760 \text{ ppm}$$

Promedio: 837,2986 mVxs

Concentración x Factor de dilución (balón / pipeta)

$$78,0760 \text{ ppm} \times \left(\frac{10\text{mL}}{5\text{mL}}\right) = 156,1521 \text{ ppm o mg/L}$$

$$156,1521 \text{ mg/L} \times 0,120 \text{ mL} = 18,7382 \text{ mg}$$

Se podría concluir que la cantidad de miligramos presentes en el gel es de 18,7382. Gracias a la utilización del HPLC se puede determinar la cantidad de ácido hialurónico en la muestra de gel de la siguiente manera:

La lectura de una de las muestras fue de 571, 423 mV_{xs}, entonces:

$$\text{Muestra de gel: } x = \frac{571,423 - 79,875}{9,7011}$$

$$\text{Utilizando área 1,2 y 3: } x = 50,6693 \text{ ppm}$$

Promedio: 837,2986 mV_{xs}

Concentración x Factor de dilución (balón / pipeta)

$$50,6693 \text{ ppm} \times \left(\frac{10\text{mL}}{5\text{mL}}\right) = 101,3386 \text{ ppm o mg/L}$$

$$101,3386 \text{ mg/L} \times 0,200 = 20,1677 \text{ mg}$$

De esta manera se puede realizar un acercamiento acerca de cuánto ácido hialurónico está contenido en las muestras de gel. Es importante recalcar en este punto, que las lecturas en HPLC difícilmente generan áreas parecidas para la determinación de ácido hialurónico, esto quiere decir que, aunque según el cálculo haya una pequeña diferencia en la cantidad de AH en el gel con respecto a lo agregado, no quiere decir que los datos son erróneos. Una de las situaciones que se sospecha que pudo haber generado esto, es que a la hora de tomar la alícuota para el análisis, moléculas de ácido hialurónico se concentraron de mayor forma en esa área de extracción en específico, lo que generó al aumento de área en la lectura.

Dentro de las especificaciones del RCTA se mencionan diferentes límites microbianos que debe presentar la formulación con respecto a cosméticos que se apliquen en el contorno de ojos como lo es el suero que se formuló en esta investigación. Según los parámetros, el recuento total de mesófilos aerobios debe ser menor a 5×10^2 UFC/g, mientras que el recuento total de mohos y levaduras debería ser menor a 10^2 UFC/g.

De acuerdo a las pruebas microbiológicas realizadas en el laboratorio MICROLABS, el recuento total de microorganismos aerobios es de 12000, mientras que el recuento total para mohos y levaduras es de 38 400. Estos son parámetros que se encuentran bastante elevados, con respecto a los límites microbianos que se describen en el reglamento. Una de las posibles causas de este tipo de crecimiento bacteriano podría ser por la cantidad de preservante antimicrobiano que se utilizó, además de que no se agregó otro tipo de preservante como propilparabeno o excipiente como EDTA, los cuales proporcionan una

acción sinérgica al estar en un mismo producto, de esta manera se potencia la acción antimicrobiana⁶⁷.

Con respecto a la presencia de organismos patógenos, en la figura 46 se puede descartar la presencia de los 3 organismos patógenos. Es importante recordar que el metilparabeno no posee tanta acción contra bacterias, de hecho posee más acción preservante contra bacterias gram + (*S aureus*, que con gram – (*E coli*, *Pseudomona*), el metilparabeno posee una buena eficacia contra hongos y levaduras⁶⁷.

Figura 46. Reporte del laboratorio MICROLABS sobre el gel analizado.

REPORTE DE LABORATORIO				
MOUESTRA (s)	ANALISIS-DESCRIPCION	RESULTADOS	UNIDAD	OTROS
Gel Cosmético	Suero Cosmético			
	Recuento Total Aerobico	12 000	UFC/g	FDA
	Escherichia coli	< 10	UFC/g	FDA
	Staphylococcus aureus	< 10	UFC/g	FDA
	Pseudomonas sp.	< 10	UFC/g	FDA
	Hongos y Levaduras	38 400	UFC/g	FDA

Fuente: Laboratorio MICROLABS

La presencia de estos y otros posibles microorganismos en la formulación se ve afectada directamente por los diferentes excipientes que se utilizaron. Dentro de estos excipientes y el que se encuentra en mayor cantidad es el agua, esta sustancia esencial para la vida también se ve contaminada por diferentes microorganismos, de hecho, muchas enfermedades pueden surgir a partir de la contaminación del agua debido a proliferación microbiana en la misma.

El hallazgo de diferentes microorganismos en el agua indica que su hallazgo está asociado a infecciones recientes o a presencia de materia orgánica y condiciones de Ph, humedad y temperatura que faciliten su reproducción y de manera consecuente su

supervivencia. Algunos microorganismos poseen diferentes características que las hacen tener ventajas sobre otros organismos⁷⁰.

Dentro de las bacterias establecidas como contaminantes del agua pertenecientes a gran negativas se mencionan *Pseudomona*, *Flavobacterium*, *Aeromonas*, *Vibrio* y *Bordetella*. Algunos microorganismos como *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* y *Citrobacter* se encuentran en grandes cantidades en fuentes de agua, vegetación y suelos, por lo que no se relaciona con contaminación fecal. Uno de los factores importantes a tomar en cuenta es que especies de géneros *Enterobacter* (*E coli*) y *Klebsiella* coloniza tuberías de agua y tanques de almacenamiento, que forman biopelículas cuando hay presencia de nutrientes, además temperaturas cálidas, bajas concentraciones de desinfectante y tiempos largos de almacenamiento pueden estimular la supervivencia de estos seres vivos⁷⁰.

Además, especies de pseudomonas (bacilos aerobios, gran -), poseen una densa capa de polisacáridos que actúan como una barrera fisicoquímica capaz de proteger al microorganismo frente al cloro residual. Estas bacterias, han sido aisladas de equipos destiladores, agua potable, tanques cisterna, tanques domiciliarios, redes de distribución de agua para consumo humano, demostrando de esta manera que poseen gran capacidad para sobrevivir y multiplicarse incluso en aguas sometidas a procesos de desinfección⁷⁰.

El *S. aureus* es un microorganismo estafilococo de tipo gran positivo, tiene una fácil propagación y actualmente ha sido una de las cepas más frecuentes en aparecer. Además, el porcentaje de personas portadoras de *S. aureus* es de aproximadamente un 20-50% de la población general, siendo las manos la principal vía de contaminación y es la parte del cuerpo que manipula los instrumentos de laboratorio⁷⁰.

Con respecto a lo anterior, la contaminación por este microorganismo y por otros, puede haber comenzado desde la extracción del ácido hialurónico en la primera parte del experimento. También se puede haber generado por un lavado deficiente en los diferentes instrumentos de laboratorio en el proceso de extracción o también en filtraciones, almacenaje, dificultad al lavar instrumentos como pipetas, goteros las cuales podrían tener algún tipo de cepa contenido en su estructura de vidrio.

Otra de las probables causas es que los reactivos son utilizados por gran número de personas, las cuales pueden tener sus manos o superficies corporales con poblaciones bacterianas y ser transportadas a los contenedores de reactivos mediante espátulas u otros instrumentos que se utilicen para extraer material del envase, de esta manera los microorganismos pueden sobrevivir y, por lo tanto, generar una contaminación posterior en la formulación farmacéutica realizada en este proyecto.

CAPÍTULO V- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Mediante la cuantificación del analito, se puede concluir que se da una mayor liberación de ácido hialurónico con el proceso de cloruro de sodio, aunque pareciera contradictorio las cantidades que se extrajeron con el proceso de disolución fueron mayores con respecto al proceso enzimático.
- Las cantidades de ácido hialurónico que se pudieron extraer con el proceso enzimático son: 0.67, 0.56, y 6,40 de las muestras 1,2 y 3 respectivamente.
- Las cantidades de ácido hialurónico que se extrajeron utilizando el método con disolución de cloruro de sodio 0,5 M son: 4.34, 2.61 y 38,10 de las muestras 4,5,6 respectivamente.
- Se realizaron varias formulaciones con diversidad de excipientes para determinar cuál era la más adecuada y se eligió el carbómero como agente gelificante debido a que presentaba menor cantidad de partículas visibles, además de que su color era más atractivo.
- Las pruebas físicas demuestran que la formulación posee un pH de 6, densidad de 1,0205 g/ml y una velocidad de 196 mPAxs, determinada con el rotor 1 a 60 rpm.
- Según las pruebas microbiológicas realizadas en el laboratorio MICROLABS, la formulación se encuentra fuera de los parámetros de límites microbianos, incumpliendo con los recuentos de mohos, levaduras y anaerobios totales.

5.2 Recomendaciones

Es importante tener las disoluciones, fase móvil, instrumentos, reactivos y demás variables listas antes de empezar el procedimiento, o ir adelantando diferentes disoluciones u otros procesos, mientras los procesos más lentos como secado de membranas, proceso enzimático, mediciones en HPLC para no desperdiciar tiempo debido a que el proceso es lento.

Otra de las recomendaciones es mantener en observación la calidad de la fase móvil debido a que se pueden generar productos turbios que puedan afectar el filtro de la bomba y consecuentemente, el espectro.

Una de las recomendaciones más importantes es conseguir un procesador potente, o también un molinillo de café para llevar a polvo las membranas secas, debido a que en el laboratorio no hay procesadores que puedan realizar esta tarea, de hecho parte de una muestra se quemó debido a que el procesador se calentó mucho.

Tamizar los ingredientes sólidos es un paso fundamental, debido a que se pueden generar inconsistencias en la disolución, generando de esta manera que la formulación no sea homogénea.

En el momento que se va a agregar la trietanolamina, se debe parar la agitación intensa y continuar agitación con espátula, debido a que se genera gran cantidad de burbujas dentro del gel, lo que imposibilita la medición de densidad y viscosidad.

Es importante utilizar mascarilla y guantes cuando se realiza la formulación, no solo para evitar contaminación microbiana sino también que excipientes como el carbopol 940 cuando se tamiza tiende a generar nubes de polvo, lo que produce irritación de mucosas y es bastante molesto para el formulador.

Se recomienda utilizar varios conservantes antimicrobianos en conjunto, para que tengan un efecto sinérgico y puedan evitar la presencia de gran número de agentes patógenos, no se recomienda el uso de benzoato de sodio debido a que puede generar disminución de viscosidad en el gel de carbopol.

Uno de los aspectos importantes a tomar en cuenta es que no se realizó una determinación del porcentaje de error, lo cual es un paso muy importante debido a que el método de extracción fue realizado por otra persona, además de que se utilizó una curva de calibración de otro trabajo.

CAPÍTULO VI- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Martínez I. Corriente galvánica aplicada a la estética, en la ionización de ácido hialurónico como principio activo en el tratamiento de la deshidratación cutánea facial en pacientes de sexo femenino, de 25 a 35 años de edad que acuden al Centro Estético Mariana Mosquera Samán, en la ciudad de Guayaquil, de diciembre de 2013 a febrero del 2014 [Internet]. 2014; 6:4-8. Disponible en: <http://repositorio.ucsg.edu.ec/bitstream/3317/1842/1/T-UCSG-PRE-MED-NUTRI53.pdf>
2. Yoo J, Kim J, Yang H, Park K. Effects of eggshell membrane hydrolysates on UVB-radiation-induced wrinkle formation in SKH-1 hairless mice. NIH [Internet]. 2015; 35:58-65. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4682498/>
3. Alcalde M. Ácido hialurónico en aplicación tópica. Acofar. [Internet]. 2020; 1:6-10. Disponible en: <https://revistaacofar.com/wp-content/uploads/2020/12/N-567.-Noviembre-Diciembre-2020.pdf>
4. Scardovi S, Goglian A, Gendra P, Gendra, C. Clinical study of the efficacy, duration and adverse effects of Hyaluronic Acid implants in the Oral-Maxillofacial area. Redalyc [Internet]. 2017; 19:77-82. Disponible en: <https://www.redalyc.org/jatsRepo/4796/479654215009/479654215009.pdf>
5. Chavéz Feijoó A. Tesis de Diseño de un sistema de extracción de ácido hialurónico y colágeno a partir de membranas de cascaras de huevo para aplicaciones cosméticas. Tesis para obtención del título de ingeniera química. Ecuador. Universidad San Francisco de Quito. 2021. Disponible en: <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/11210/1/140817.pdf>
6. Cocul'ová A, Krajcovic H. Isolation of the hyaluronic acid from the eggshell membranes. Int Journ Scie and Comm [Internet]. 2018; 3:91-95. Disponible en: <http://www.ijsac.net/sites/default/files/2018-05/3.4.07.pdf>
7. Chan G, Estrada F, Sagastume M. Utilización de la yema y clara liofilizada y cáscara pulverizada del huevo de gallina para la fabricación de una línea cosmética con fines de cuidado de la piel. Tesis de grado. Guatemala. Universidad de San Carlos. 2016.

8. Campos F, Gómez E Cortez, F, Chamut S. Hialuronic acid in the eggshell of *Salvator merianae* (Squamata: Teiidae). *Rev Agro Nor Arg.* [Internet]. 2020; 40: 62-65 Disponible en: <https://ranar.faz.unt.edu.ar/index.php/ranar/article/view/77>
9. Heaney R, Robinson D. The isolation and characterisation of hyaluronic acid in eggshell. *SciELO* [Internet]. 1976; 18:42-48. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1009103/>
10. Guerra A, Gómez E. El ácido hialurónico y sus aplicaciones en dermatología. *Actas Dermosifiliogr* [Internet]. 1998; 89:435-443. Disponible en: <https://www.actasdermo.org/es-el-acidohialuronico-sus-aplicaciones-articulo-13003360>
11. Long F, Adams R, Devore D. Preparation of hyaluronic acid from eggshell membrane. *PCT* [Internet]. 2004: 2-14. Disponible en: <https://patents.google.com/patent/WO2004080388A2/en>
12. Oba, C, Ohara H, Morifuji M, Ito K., Ichikawa S., Kawahata K, et al. Collagen hydrolysate intake improves the loss of epidermal barrier function and skin elasticity induced by UVB irradiation in hairless. *Photodermatology, photoimmunology and photomedicine* [Internet]. 2013; 29, 204-211. Disponible en: doi: 10.1111 / phpp.12051
13. Urbano E. Extracción a escala de laboratorio del complejo de proteínas presentes en las membranas intersticiales de residuos de cáscaras de huevo de gallina (*Gallus Domesticus*) mediante el proceso de hidrólisis alcalina. Tesis para obtención del título de ingeniera química. Ecuador. Escuela Politécnica Nacional. 2015. Disponible en: <https://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/10458>
14. Chi Y, Liu R, Lin M, Chi Y. A novel process to separate the eggshells membranas and eggshells via flash evaporation. *FDT* [Internet]. 2022. 42:2-4. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/cta/a/hSyyKYR774rtbdtHvsLpBnL/?format=pdf&lang=en>
doi: <https://doi.org/10.1590/fst.07522>
15. Pesarin D, Rovinaru C. Separation methods of the eggshell membranas from eggshell. *MDPI* [Internet]. 2019. 22:1. Disponible en: <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/proceedings-29-00122-v2.pdf>

16. Gómez Oviedo J. Tesis de Extracción del ácido hialurónico a partir de las membranas testáceas presentes en las cáscaras de huevo mediante hidrólisis enzimática con pepsina en la Universidad Internacional de las Américas, en los años 2021- 2022. Universidad Internacional de las Américas. San José, Costa Rica. 2022. Disponible en: <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Tesis%20Joselin%20Go%CC%81mez%20Oviedo.pdf>
17. García J, Alonso P. Anatomía y fisiología de la piel. *Pediatr Int.* [Internet]. 2021; 3:3-5. Disponible en: https://www.pediatriaintegral.es/wp-content/uploads/2021/xxv03/07/n3-156e1-13_RB_JesusGarcia.pdf
18. Pastushenko I, Prieto-Torres L, Gilaberte YC, Blanpain C. Células madre de la piel: en la frontera entre el laboratorio y la clínica. Parte I: células madre epidérmicas. *Actas Dermosifiliogr.* [Internet]. 2015; 106: 25-28
19. Lisset M, Cedeño R, Rivero R, Rivero J, García D, Bordón L. La teoría del estrés oxidativo como causa directa del envejecimiento celular. *Medisur.* [Internet]. 2018; 15: 4-7. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/medisur/msu-2018/msu1851.pdf>
20. Ruiz M, Morales E. Aproximación del tratamiento del envejecimiento cutáneo. *Ars Pharm.* [Internet]. 2015; 56: 3-7. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S2340-98942015000400001&script=sci_arttext&tlng=pt
21. Guinot C, Malvy D, Ambroisine L. Relative contribution of intrinsic vs extrinsic factors to skin aging as determined by a validated skin age score. *Arch Dermatol.* [Internet]. 2012; 138: 3. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=1153630&pid=S2340-9894201500040000100001&lng=es
22. Vargas T, Alexandra P. Caracterización morfológica, productiva y genética de la gallina criolla del Ecuador. Tesis doctoral. Ecuador: Universidad de Córdoba; 2020.
23. Troncoso H, Rodríguez D. El huevo y formación del cascarón. Los avicultores y su entorno. [Internet]. 2014; 74:4-20. Disponible en: <https://idoc.pub/documents/formacion-del-huevo-de-gallina-1430xo10524j>

24. Young Hester P. Breeder hen influence on nutrient availability for the embryo and hatchling. Elsevier. [Internet]. 2017; 1:4-15. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800879-9.00006-8>
25. Ramírez L, Cortés M, Micanguer A. El huevo de gallina y su procesamiento industrial: una revisión. Revista Biotecnológica. [Internet]. 2022; 20: 221-239. doi: <https://doi.org/10.18684/rbsaa.v20.n1.2022.1438>
26. Fernández F, Pérez M, Dadashi S, Gómez C, Sanz P. Impacto f magnetic assisted freezing in the physicochemical and functional properties of egg components. Innovate Food Science and Emerging Technologies. [Internet]. 2017; 44:131-138. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.11.006>
27. Mora Erazo J. Comparación de parámetros físico-químicos de huevos criollos y comerciales en el cantón Mocache. Tesis de grado. Quevedo, Ecuador. Universidad Estatal de Quevedo. 2018.
28. Canóvas F, Abellán M, García A, Luque A, Pérez S, Sánchez M. Randomised clinical trial to analyse efficacy of eggshell membrane to improve joint functionality in knee osteoarthritis. MDPI. [Internet]. 2022; 14: 2-4. doi: <https://doi.org/10.3390/nu14112340>
29. Shao X, Ye W. Preventive effect of egg membrane protein supplementation on dragon boat sports injury under the monitoring of artificial intelligence and big data. Hindawi. [Internet]. 2021; 2-5. doi: <https://doi.org/10.1155/2021/9112010>
30. Kokkonen H, Soderstrom J, Rocklov G, Hallmans K. Up-regulation of cytokines and chemokines predates the onset of rheumatoid arthritis. Arthritis & rheumatism. [Internet]. 2017; 62: 389-391. doi: 10.1002/art.27186
31. Macías M, Espinoza P, Suazo S, Jimenez A, Rubio F, Breve L. Aplicación clínica del ácido hialurónico. Rev Fac Cienc Méd. [Internet]. 2015; 1:42-47
32. Corte D, Yañez R, Esquivel C. Use of hyaluronic acid as an alternative for reconstruction of interdental papilla. Medigraphic. [Internet]. 2017; 21:3-7. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/rom/v21n3/1870-199X-rom-21-03-00205.pdf>

33. Ponce de León P, Foresto P, Valverde J. Estudio de la captación de ácido hialurónico por áscaris lumbricoides. *Acto bioquim Clin Lat.* [Internet]. 2011; 26: 626. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53516748008>
34. Oliveira Z, Albano M, Namba M, Rodriguez G, Silva T. Efeito dos ácidos hialurónicos como condroprotectores em modelo experimental de osteoartrose. *Rev Bras Ortop.* [Internet]. 2014; 49:12-22. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0102361613001720>
35. Monterrosa A, Portela K. Manejo de la atrofia vulvovaginal posmenopáusicas. *Rev chil obstet ginecol.* [Internet]. 2014; 79: 489-495. Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/rchog/v79n6/art06.pdf>
36. Jiménez A, Ruiz de León G, Pacheco E, Gutierrez J. Actualización en microimplantes de relleno perioral atendiendo a su permanencia. *Rev Esp Crug Oral y Maxilof.* [Internet]. 2013; 35:59-68. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/maxi/v35n2/original2.pdf>
37. María Cansino González. Ácido hialurónico y piel. Tesis de grado. Sevilla, España. Universidad de Sevilla. 2021.
38. Fallacara A, Baldini E, Manfredini S, Vertuani S. Hyaluronic acid in the third millennium. *Polymers.* [Internet]. 2018;10:20-47. doi: 10.3390/polym10070701
39. Gupta R, Lall R, Srivastava A, Sinha A. Hyaluronic acid: molecular mechanisms and therapeutic trajectory. *Front Vet Sci.* [Internet]. 2019;6:192. doi: 10.3389/fvets.2019.00192
40. Nien K, Hsum W, Lai C, Hing B, Wei Z. Hyaluronic Acid-Mediated Drug Delivery System Targeting for Inflammatory Skin Diseases: A Mini Review. *Frontiers in Pharmacology.* [Internet]. 2020; 11:1105. doi: 10.3389/fphar.2020.01105
41. Zhang Y, Xia Q, Li Y, He Z, Li Z, Guo T. CD44 assists the topical anti-psoriatic efficacy of curcumin-loaded hyaluronan-modified ethosomes: A new strategy for clustering drug in inflammatory skin. *Theranostics.* [Internet]. 2019;9:48. doi: 10.7150/thno.29715
42. Goebel a, Neubert R, Wohlrab J. Dermal targeting of tacrolimus using colloidal carrier systems. *Int J. Pharm.* [Internet]. 2011;404:159-168. doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.11.029

43. Wan T, Pan W, Long Y, Yu K, Liu S, Ruan W. Effects of nanoparticles with hydrotropic nicotinamide on tacrolimus: Permeability through psoriatic skin and antipsoriatic and antiproliferative activities. *Int. J. Nanomedicine*. [Internet]. 2017;12:1485. doi: 10.2147/IJN.S126210
44. Du H, Liu P, Zhu J, Lan J, Zhang L. Hyaluronic Acid Based Dissolving Microneedle Patch Loaded with Methotrexate for Improved Treatment of Psoriasis. *ACS Interfaces*. [Internet]. 2019;11:46. doi: 10.1021/acsami.9b15668
45. Bieber T, D'Erme A, Akdis C, Lauener R, Schappi G. Clinical phenotypes and endophenotypes of atopic dermatitis: Where are we, and where should we go?. *J. Allergy Clin Immunol*. [Internet]. 2017;139:58-64. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61909-7
46. Sathishkumar D, Moss C. Topical therapy in atopic dermatitis in children. *Indian J. Dermatol*. [Internet]. 2016; 61:656-661. doi: 10.4103/0019-5154.193677
47. Bukhari S, Roswandi N, Waqas M, Habib H, Hussain F, Khan S. Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: A review of recent updates and pre-clinical and clinical investigations on cosmetic and nutricosmetic effects. *Int. J. Biol. Macromol*. [Internet]. 2018;120:1682-1695. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.188
48. Symonette C, Kaur M, Tan X, Tolg C, Ma J, Perera F. Hyaluronan-Phosphatidylethanolamine Polymers Form Pericellular Coats on Keratinocytes and Promote Basal Keratinocyte Proliferation. *BioMed. Res. Int*. [Internet]. 2014. doi: 10.1155/2014/727459
49. Zhuo F, Abourehab M, Hussain Z. Hyaluronic acid decorated tacrolimus-loaded nanoparticles: Efficient approach to maximize dermal targeting and anti-dermatitis efficacy. *Carbohydr. Polym*. [Internet]. 2018; 197:478-489. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.06.023
50. María Arquímedes Morán. ¿Qué es un cosmético?. *ANMAT*. [Internet]. 2019; 1:2-8. Disponible en: <https://idoc.pub/documents/definicion-de-cosmetico-9n0kwpm88k4v>
51. Robinson D, Vega J, Palm M, Bell M. Multicenter evaluation of a topical hyaluronic acid serum. *Journal of Cosmetic Dermatology*. [Internet]. 2022; 21:3848-3858. doi: doi.org/10.1111/jocd.15241

52. Embelton, F. The Best Face Serum To Transform Your Skin. Marie Claire. [Internet]. 2020. Disponible en: <https://www.marieclaire.co.uk/beauty/skincare/best-face-serum-24325>
53. Allasia M, Sarmiento P. Producción de ácido hialurónico por fermentación microbiana. Tesis de licenciatura en ingeniería química. Chile: Universidad Tecnológica Nacional; 2016.
54. Chávez Feijoó A. Diseño de un sistema de extracción de ácido hialurónico y colágeno a partir de membranas de cascaras de huevo para aplicaciones cosméticas. Tesis de licenciatura en ingeniería química. Quito, Perú: Universidad de San Francisco de Quito; 2021.
55. Alparce N, Kumar A, Noomhorn A. Sequential extraction of Hyaluronic Acid and Collagen from chicken eggshell membrane. Innovations in food ingredients & food safety. [Internet]. 2021: 13-25. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Anil-Anal/publication/352815078_Sequential_Extraction_of_Hyaluronic_Acid_and_Collagen_from_Chicken_Eggshell_Membrane/links/60dabfeb299bf1ea9ecb5a66/Sequential-Extraction-of-Hyaluronic-Acid-and-Collagen-from-Chicken-Eggshell-Membrane.pdf
56. Suarez O, Morales Y. Basic principles of high performance liquid chromatography for the separation and analysis of mixtures. Semilleros: Formacion investigativa. [Internet]. 2018; 4:8-10. Disponible en: <https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/7731/1/6131978-2018-1-IQ.pdf>
57. Cubillo Torres Maira. Espectros infrarrojo. Rev Boliv Quimica. [Internet]. 2019; 2: 4-18. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/429530239/Espectros-infrarrojo-docx>
58. Consejo de Ministros de Integración Económica de Centroamérica. Reglamento Técnico Centroamericano 71.03.45:07. 4ta ed. 2008.
59. Otero Ortega A. Enfoques de investigación. [Internet]. Primera edición. Colombia. Universidad de la Costa. 2018. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Alfredo-Otero-Ortega/publication/326905435_ENFOQUES_DE_INVESTIGACION/links/5b6b7f9992851ca650526dfd/ENFOQUES-DE-INVESTIGACION.pdf
60. Parreño Urquiza Á. Metodología de investigación en salud. [Internet]. Primera edición. Ecuador. Aval ESPOCH. 2016. Disponible en: <https://e->

campus.uia.ac.cr/pluginfile.php/700516/mod_resource/content/1/MANUAL%20.%20Inve stigacion%20en%20Ciencias%20de%20la%20Salud.pdf

61. Campos G, Lule N. La observación, un método para el estudio de la realidad. Dialnet. [Internet]. 2012; 7:45-60. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3979972>

62. Abdallah M, Fernández N, Matias A, Rosario M. Hyaluronic acid and Chondroitin sulfate from marine and terrestrial sources: Extraction and purification methods. Carbohydrate Polymers [Internet]. 2020; 243:1-9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116441>

63. Balleter A, Cubero N. Método de obtención de un producto cicatrizante. WIPO. [Internet]. 2016; 10: 5-49. Disponible en: <https://patentimages.storage.googleapis.com/3c/05/00/9a09ebd6d7f692/WO2016055676A1.pdf>

64. Acevedo Gómez, A. Caracterización de pepsina de sábalo (*Prochilodus lineatus*): Evaluación de su potencial aplicación industrial. Tesis doctoral. Buenos Aires, Argentina. Universidad Nacional del Nordeste. 2019.

65. Toribio B, Yañez C, Torres H. Espectro Infrarrojo. Elsevier [Internet]. 2019; 3-4. Disponible en: https://www.academia.edu/26238328/ESPECTRO_INFRRARROJO

66. Ruckmani K, Saleem Z, Pavne K, Muneera M, Thusleem O. Determination of sodium hyaluronate in pharmaceutical formulations by HPLC–UV. [Internet]. 2013; 3:324-329. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2013.02.001>

67. Chang R, Sheskey J, Quinn M. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Pharmaceutical Press. [Internet]. 2009; 6:313-784. Disponible en: <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Handbook%20of%20Pharmaceutical%20Excipients.pdf>

68. Consejo de Ministros de Integración Económica de Centroamérica. Reglamento Técnico Centroamericano 71.03.36:07. 4ta ed. 2008.

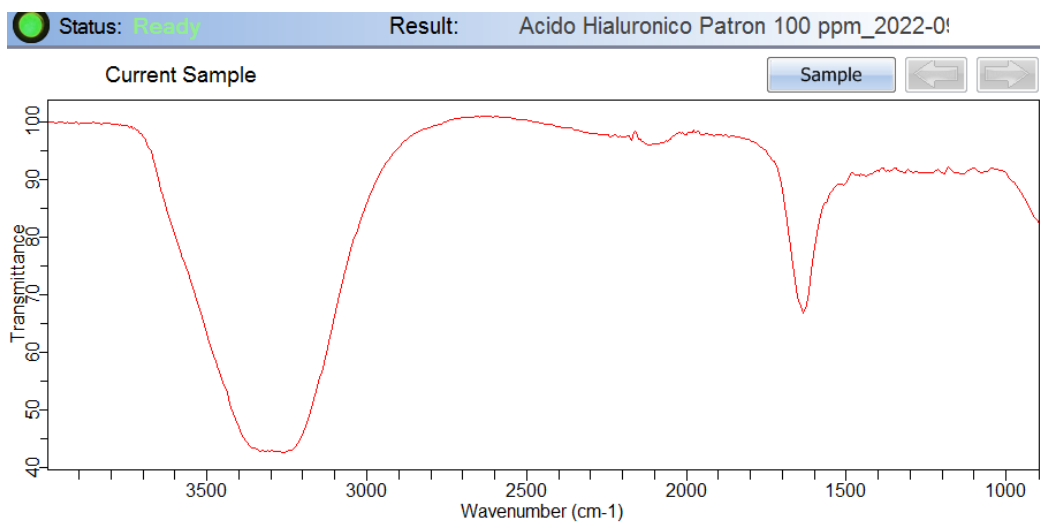
69. Malena G, Gruszycki R, Pérez C, Nuñez B, Chiappeta A, Gimenez C. Formulation of cosmetic products from *Curcubita argyrosperma* C. seed oil. Revista Colombiana de

Ciencias Químicas. [Internet]. 2020; 49: 12-18. doi:
<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v49n1.87031>

70. Ríos S, Agudelo M, Gutiérrez L. Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. Rev. Fac. Nac. Salud Publica. [Internet]. 2017; 35(2): 236-247. doi: 10.17533/udea.rfnsp.v35n2a08

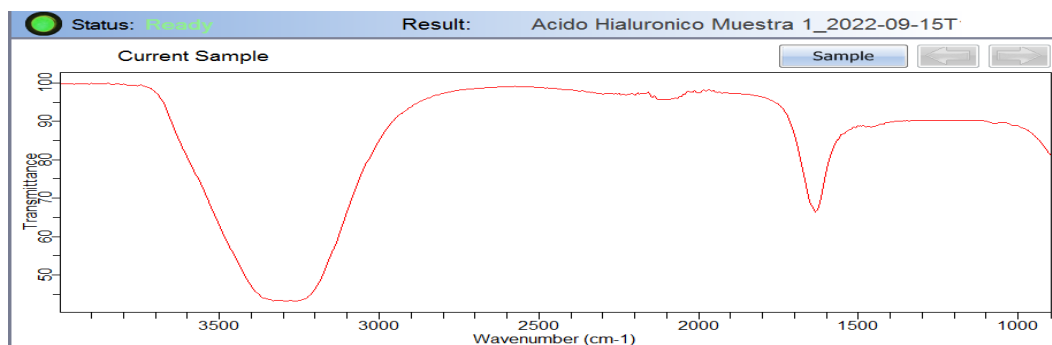
CAPÍTULO VII- ANEXOS

Anexo 1. Espectro infrarrojo de estándar de ácido hialurónico 100 ppm.



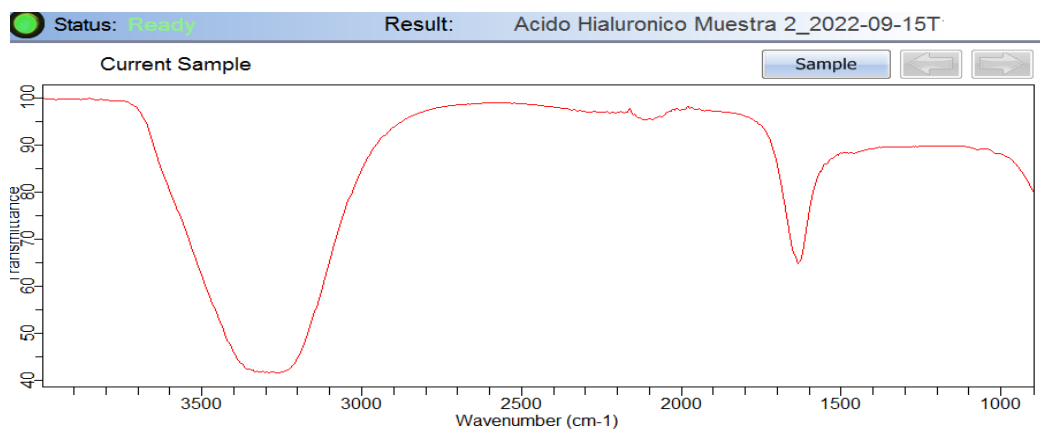
Fuente: elaboración propia.

Anexo 2. Espectro infrarrojo de muestra 1.



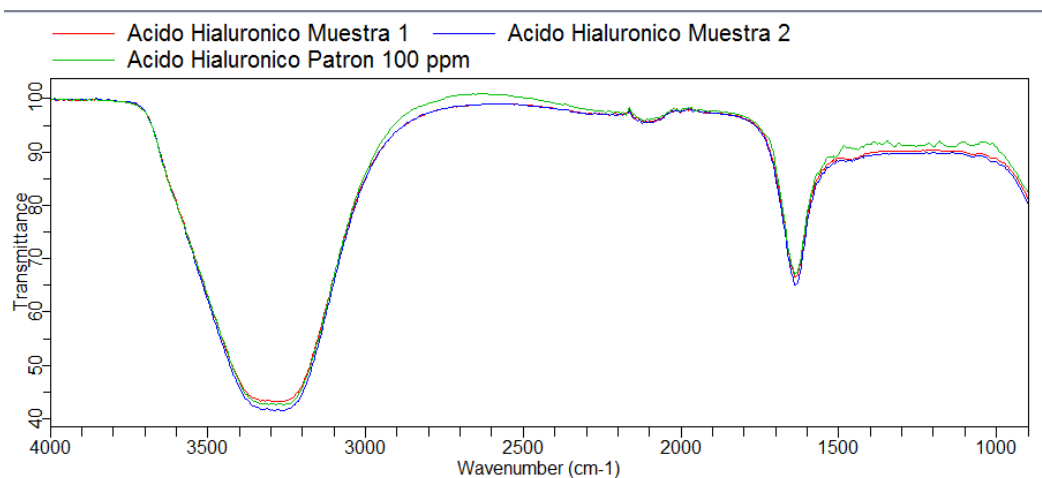
Fuente: elaboración propia.

Anexo 3. Espectro infrarrojo de muestra 2



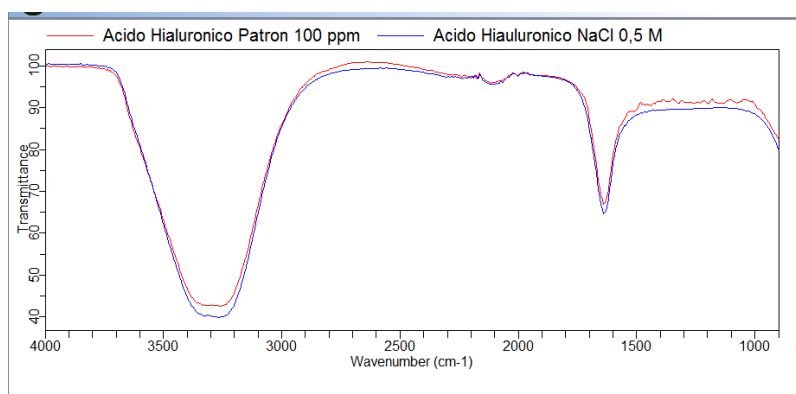
Fuente: elaboración propia.

Anexo 4. Superposición de espectro de muestras enzimáticas contra patrón de ácido hialurónico.



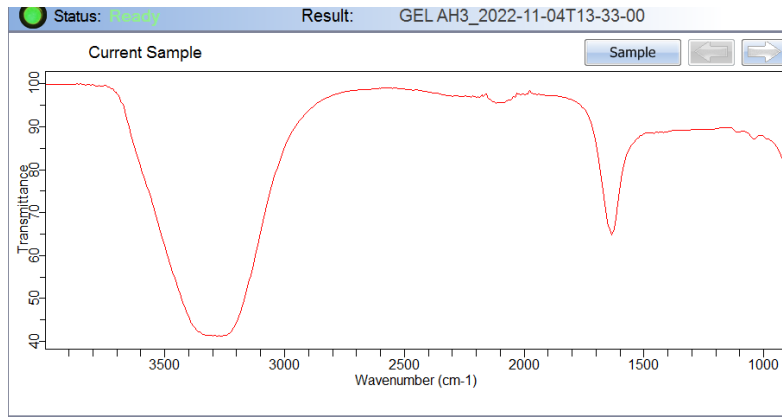
Fuente: elaboración propia.

Anexo 5. Superposición de espectro de la muestra 6 contra patrón de ácido hialurónico.



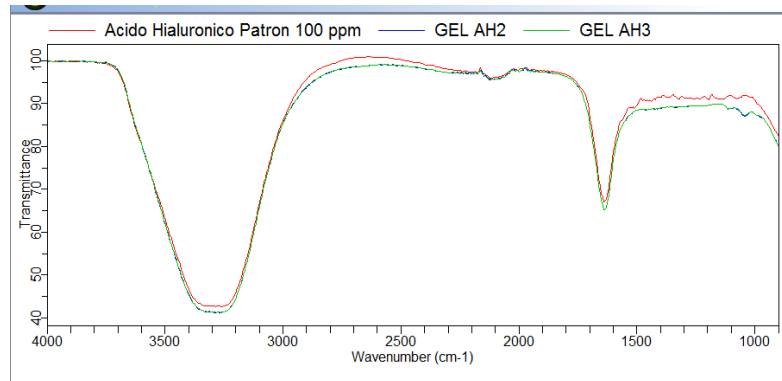
Fuente: elaboración propia.

Anexo 6. Espectro infrarrojo del suero con ácido hialurónico al 0,01%.



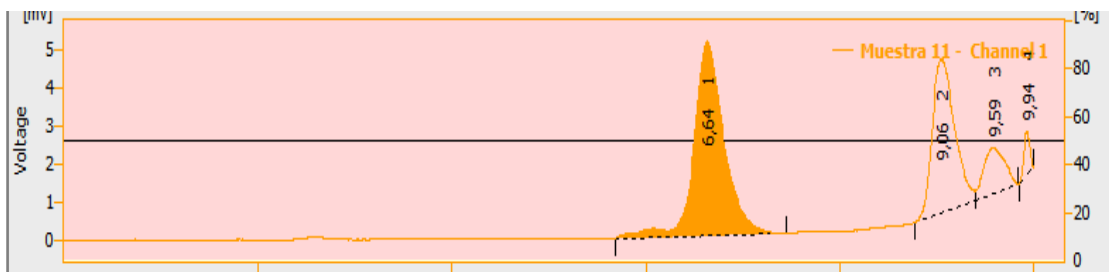
Fuente: elaboración propia.

Anexo 7. Superposición del espectro del gel contra el espectro de patrón de ácido hialurónico.



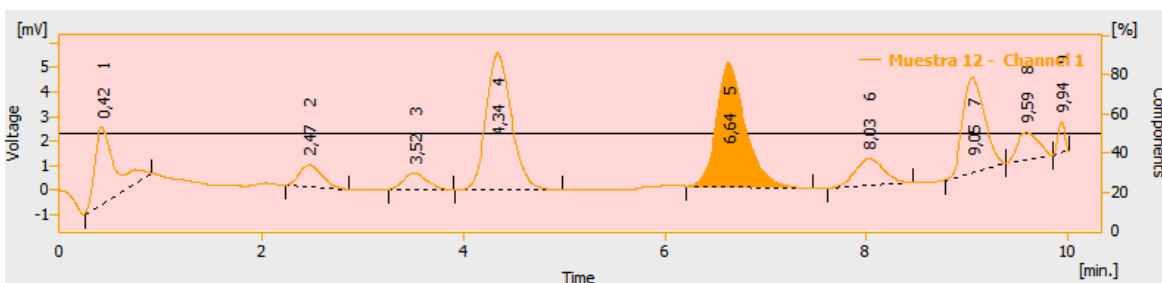
Fuente: elaboración propia.

Anexo 8. Espectro HPLC de muestra 1.1



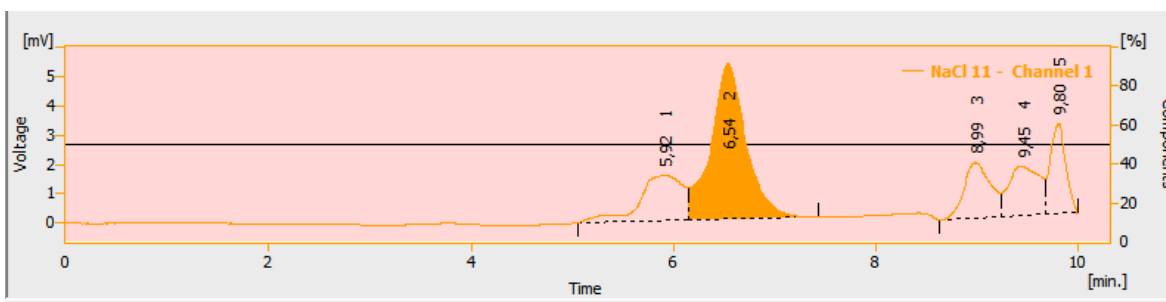
Fuente: elaboración propia.

Anexo 9. Espectro HPLC de muestra 1.2



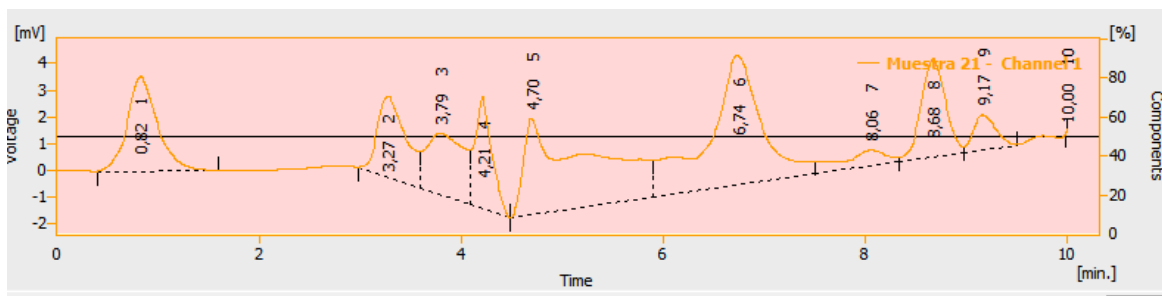
Fuente: elaboración propia.

Anexo 10. Espectro HPLC de muestra 1.3



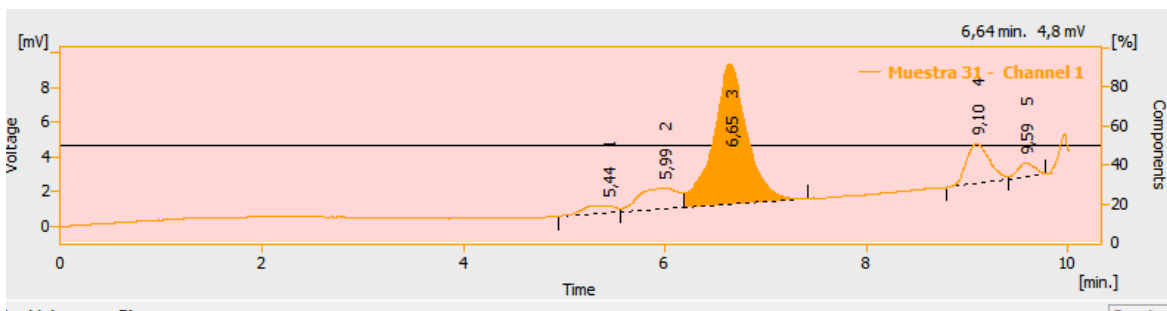
Fuente: elaboración propia.

Anexo 11. Espectro HPLC de muestra 2.1



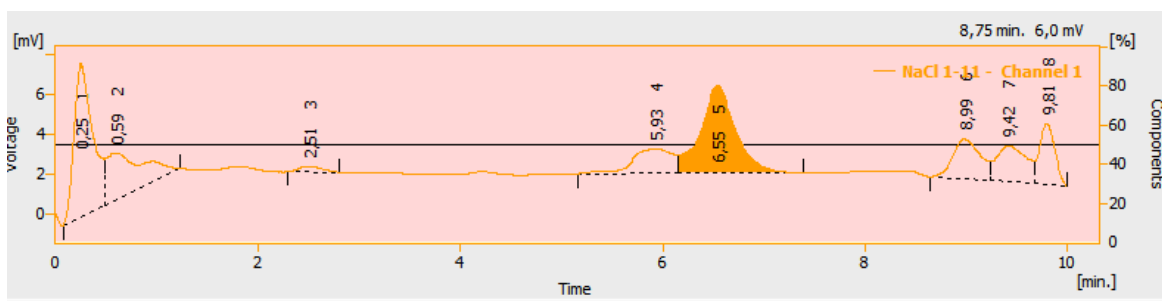
Fuente: elaboración propia.

Anexo 12. Espectro HPLC de muestra 2.2



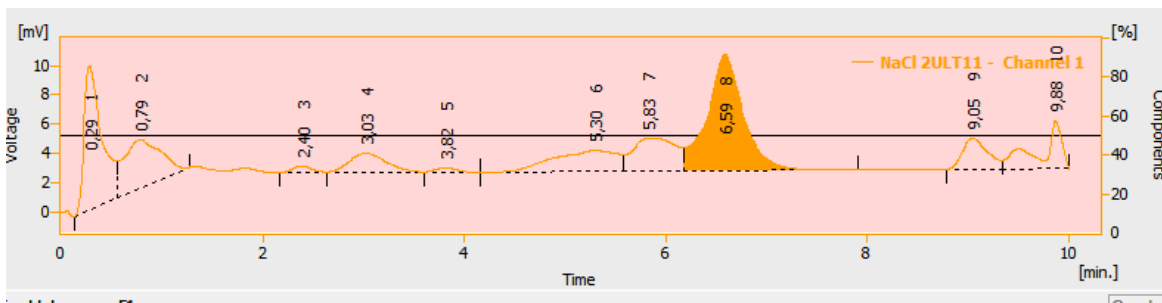
Fuente: elaboración propia.

Anexo 13. Espectro HPLC de muestra 2.3



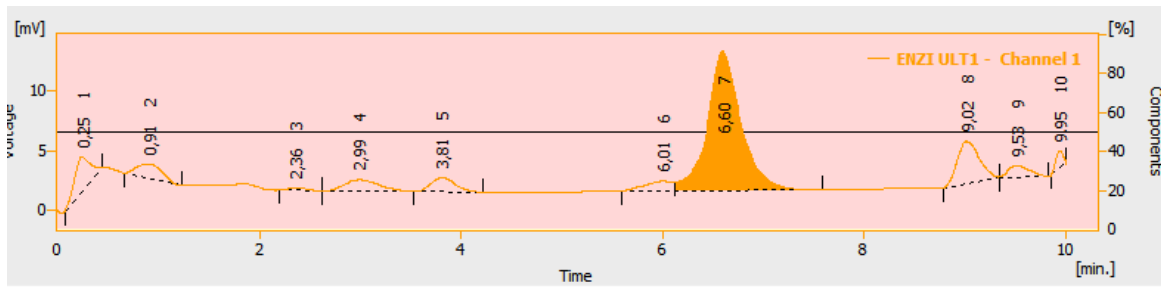
Fuente: elaboración propia.

Anexo 14. Espectro HPLC de muestra 3.1



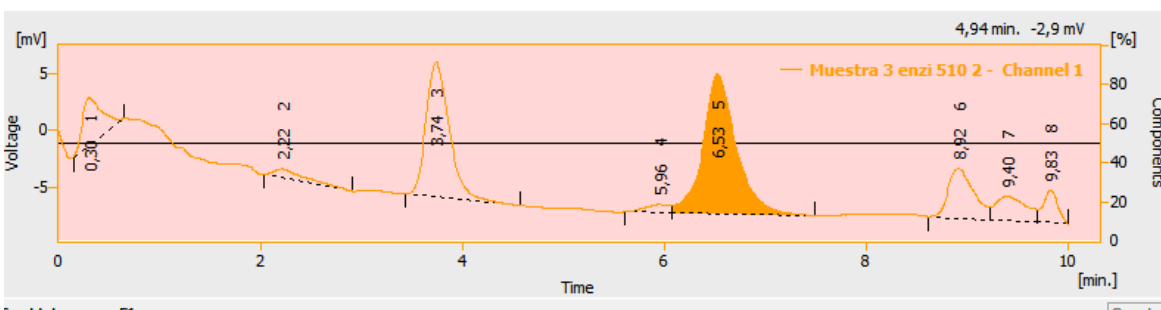
Fuente: elaboración propia.

Anexo 15. Espectro HPLC de muestra 3.2



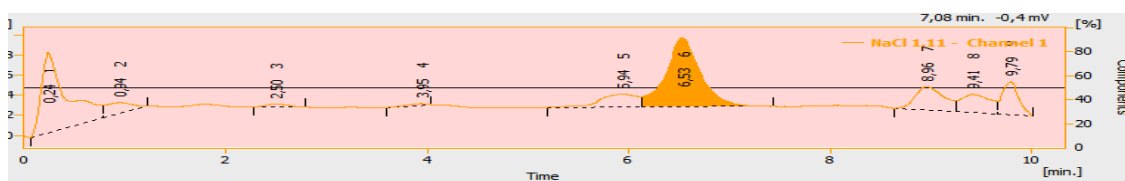
Fuente: elaboración propia.

Anexo 16. Espectro HPLC de muestra 3.3



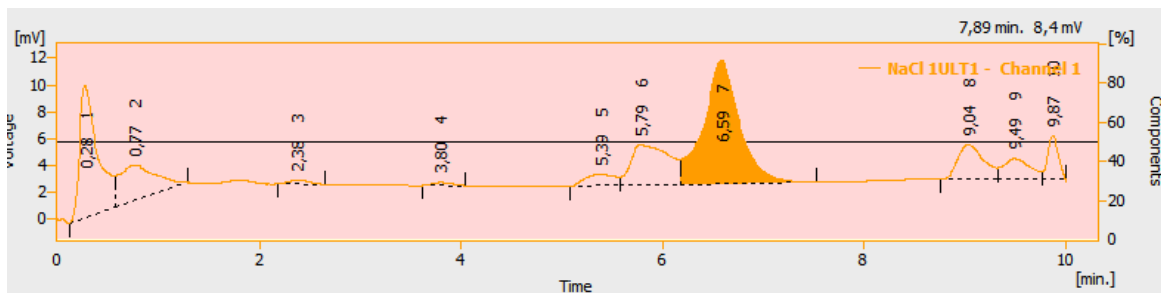
Fuente: elaboración propia.

Anexo 17. Espectro HPLC de muestra 4.1



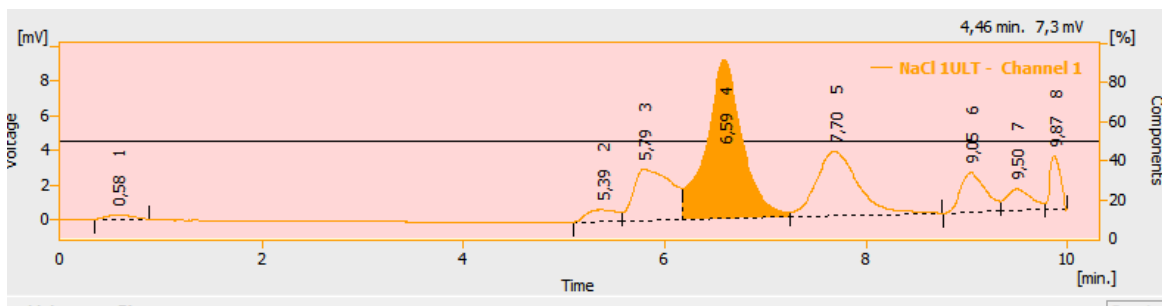
Fuente: elaboración propia.

Anexo 18. Espectro HPLC de muestra 4.2



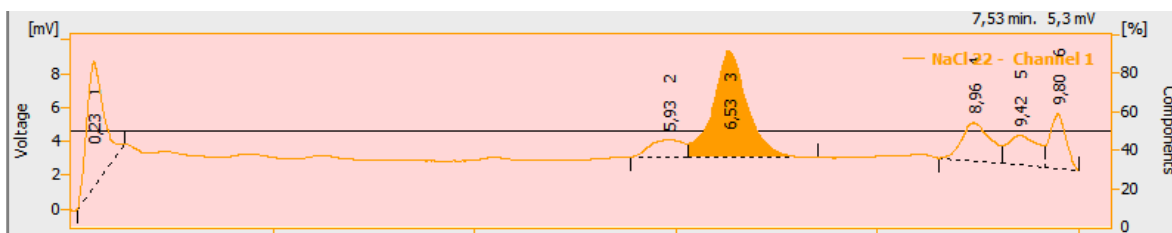
Fuente: elaboración propia.

Anexo 19. Espectro HPLC de muestra 4.3



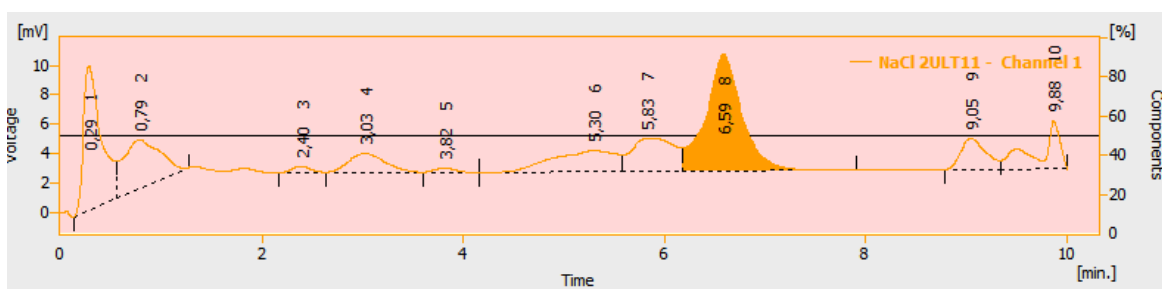
Fuente: elaboración propia.

Anexo 20. Espectro HPLC de muestra 5.2



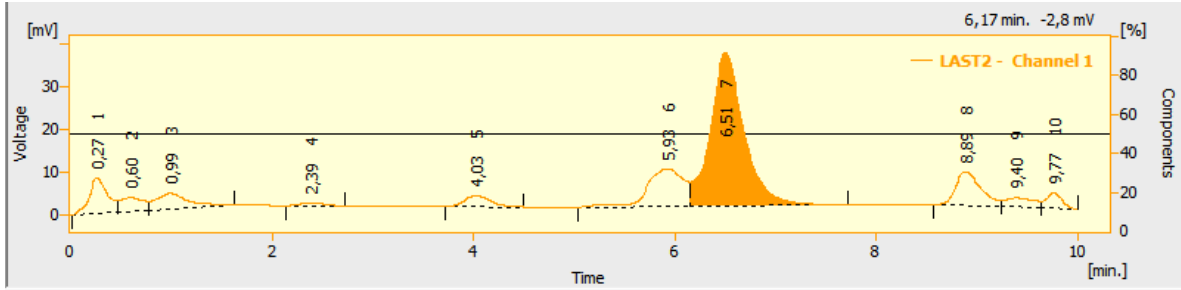
Fuente: elaboración propia.

Anexo 21. Espectro HPLC de muestra 5.3



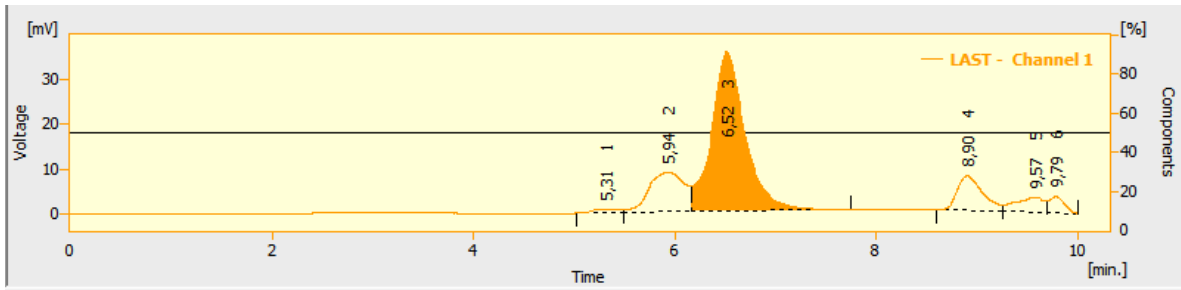
Fuente: elaboración propia.

Anexo 22. Espectro HPLC de muestra 6.1



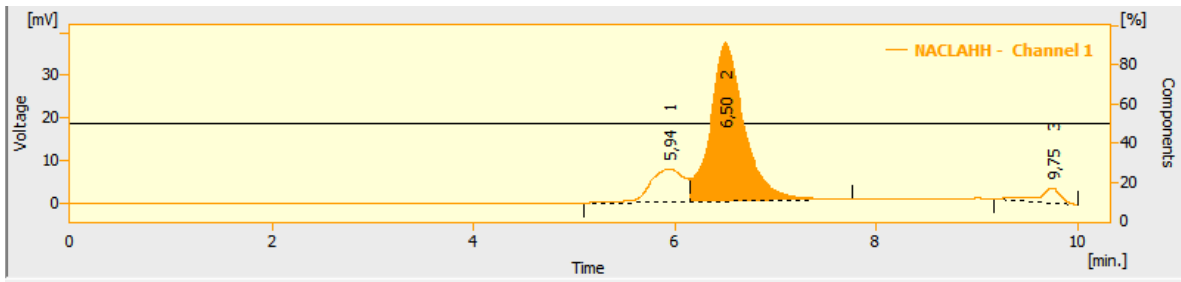
Fuente: elaboración propia.

Anexo 23. Espectro HPLC de muestra 6.2



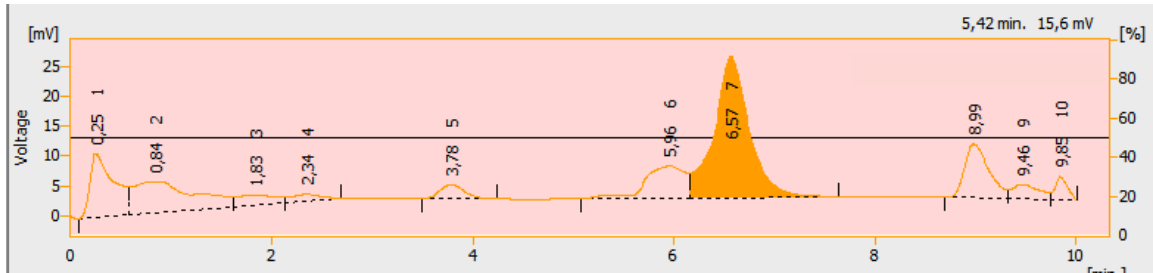
Fuente: elaboración propia.

Anexo 24. Espectro HPLC de muestra 6.3



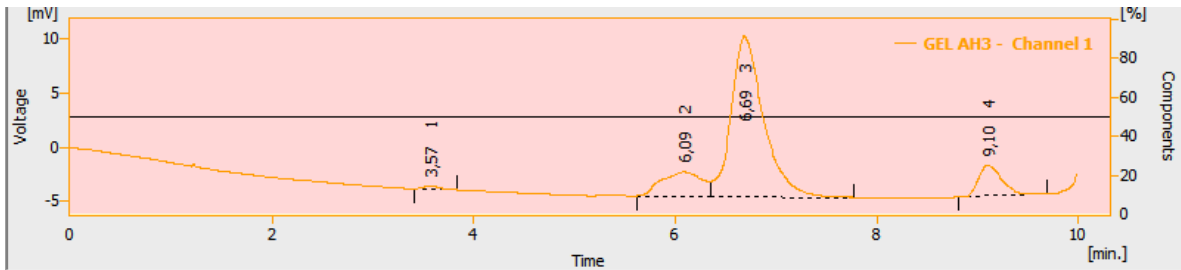
Fuente: elaboración propia.

Anexo 25. Espectro HPLC de muestra 7.1 (gel)



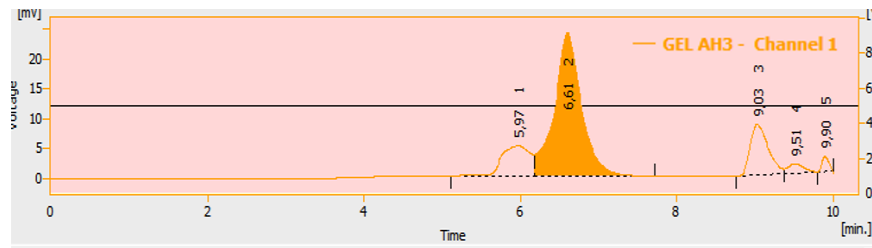
Fuente: elaboración propia.

Anexo 26. Espectro HPLC de muestra 7.2 (gel)



Fuente: elaboración propia.

Anexo 27. Espectro HPLC de muestra 7.3 (gel)



Fuente: elaboración propia.

Anexo 28. Etiqueta de la formulación farmacéutica.



Fuente: elaboración propia.