

PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA CREMA FOTOPROTECTORA SOLAR A BASE DE NANOPARTÍCULAS QUITOSANO CON ÁCIDO ÚSNICO

O. Nino Castro M¹, Juana Chávez F², Julio Santiago C.³, María López H⁴

¹Facultad de Posgrado, UNMSM, Av. Germán Amezaga 375, Cercado de Lima, Lima, Perú. Correo electrónico: ninocastro_2005@yahoo.com

²Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad Privada Norbert Wiener, Av. Arequipa Lima 32, Perú.

³Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química e Ingeniería Química, UNMSM, Av. Germán Amezaga 375, Cercado de Lima, Lima, Perú

⁴Sección Física, Departamento de Ciencias, Facultad de Ciencias e Ingeniería Pontificia Universidad Católica del Perú; Av. Universitaria 1801, Lima 32, Perú

Recibido: Julio 2016; Aceptado: Diciembre de 2016

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación, se aisló y elucidó el ácido úsnico del líquen *Everniopsis trulla*. Por otro lado, se obtuvo y se caracterizó el quitosano a partir de los residuos orgánicos "Pluma de pota" del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) de las industrias pesqueras y junto al ácido úsnico aislado del líquen, se preparó una crema fotoprotectora, y para validar la formulación se aplicó un diseño factorial, se eligió como crema patrón a la crema Natura 8.

Para todas las cremas preparadas se ha determinado su factor de protección solar SPF (método de determinación de la transmitancia UV con una lámpara de mercurio); también se ha realizado la caracterización completa de las cremas. La crema validada tiene un 9,6% de transmitancia UV como factor de fotoprotección y la crema en base a nanopartículas tiene 7,5%, ambas son mejores en protección UV respecto al patrón crema Natura-8 que tiene 15,5%. Se comprobó su acción regeneradora de piel y el efecto antiinflamatorio de la crema validada por vía tópica en la oreja derecha del ratón con una inhibición 37,72%; finalmente, los resultados demuestran que la crema fotoprotectora califica como libre de microorganismos y apto para su uso.

Palabras claves: *Everniopsis trulla*, ácido úsnico, quitosano, nanopartículas, crema fotoprotectora.

ABSTRACT

In this research, it was isolated and elucidated usnic acid of the *Everniopsis trulla* lichen. On the other hand, the chitosan was obtained and characterized from the "pluma de pota" Giant Squid (*Dosidicus gigas*), of the Fisheries organic waste and together the isolated lichen usnic acid was prepared a photoprotective cream, and validate the formulation was applied a factorial design, it was chosen as the Natura-8 cream pattern.

For all prepared creams it has determined its sun protection factor (SPF determination method with UV transmittance mercury lamp); It has also performed the complete characterization of the creams. The cream has validated 9.6% UV transmittance factor photoprotection and cream based on nanoparticles is 7.5%, both are better in UV protection to the Natura-8 cream pattern having 15.5%. Its regenerative action and anti-inflammatory effect skin cream validated topically on the right ear of the mouse with 37.72% inhibition was found; finally, the results show that the photoresist cream qualifies as free of microorganisms and suitable for use.

Keywords: *Everniopsis trulla*, usnic acid, chitosan, nanoparticles, sunscreen cream.

INTRODUCCIÓN

El líquen es un organismo simbiótico conformado por un hongo (micobionte) y un alga (ficobionte). Mientras el hongo se encarga del abastecimiento del agua y sales minerales, el alga provee los productos fotosintéticos como los glúcidos. Se calcula que existen aproximadamente 17.000 especies dentro de 600 géneros; además producen metabolitos secundarios que son

compuestos fenólicos, los cuales se acumulan en talos del líquen (dépsidos, depsidonas, dibenzofuranos y ácidos úsnicos) [1]. En este mundo moderno, el papel más importante que desempeñan los líquenes en relación a los seres humanos, es el de bioindicadores de la contaminación del ambiente, además tienen propiedades farmacológicas, capacidad quelante, tiene acción sobre reacciones fotoquímicas ligadas a cationes y usado también como pigmento. Más de mil metabolitos secundarios han sido aislados de diversas especies de líquenes y varios de ellos poseen importantes actividades biológicas [2]. Los compuestos liquénicos son conocidos sus propiedades farmacológicas, además, tienen propiedades antioxidantes el efecto del radical del antioxidante sobre el DPPH es un método simple y realizable para cuantificar la potencia de los hidrógenos donantes. Entonces los líquenes son interesantes fuentes para nuevos antioxidantes compuestos que también podrían actuar como fotoprotectores por limitar los efectos de la luz UV [3].

Por otro lado, los científicos han clasificado la radiación ultravioleta en tres tipos UVA, UVB y UVC. La capa de ozono absorbe algunos de estos tipos, por ejemplo, la UVA no es absorbida por la capa de ozono, la radiación UVB es parcialmente absorbida y la UVC es completamente absorbida por el oxígeno y el ozono en la atmósfera. La radiación UVA y especialmente la UVB penetran en la piel y en los ojos y pueden causar los trastornos (cáncer de piel y otros trastornos cutáneos, cataratas y otros trastornos de la vista, inhibición del sistema inmunitario). Los niveles de radiación dependen de varios factores como: el ozono estratosférico, la hora del día, la época del año, la latitud, la altitud y las condiciones climáticas [4].

Los expertos recomiendan productos con un factor de protección solar de al menos 15. El número del FPS (o SPF por sus siglas en inglés) representa el nivel de protección contra las quemaduras del sol que proporcionan la pantalla solar. Un FPS 15 bloquea un 93% de los rayos UV que causan quemaduras [5].

Ante esto tenemos plantas que soportan los rayos ultravioletas del sol y viven en condiciones bien extremas del clima, tanto del sol como del frío. Se trata de los líquenes, que son organismos simbióticos (hongo y alga) [4], que en nuestro país muy poco se ha investigado desde el punto de vista químico y/o fitoquímico. En nuestro país, existe muy poca información relacionada a la investigación fitoquímica de líquenes peruanos, de allí el interés en iniciar y desarrollar esta línea de investigación. En particular, investigar al líquen *Everniopsis trulla*.

Por otro lado, se sabe que el quitosano es un polisacárido catiónico lineal compuesto por unidades de β -(1-4)-2-desoxi-2-amino-D-glucopiranosas (D-glucosamina y β -(1-4)-2-desoxi-2-acetamido-D-glucopiranosas (N-acetyl-D-glucosamina). El quitosano se obtiene por desacetilación de la quitina, la cual se encuentra presente en los exoesqueletos de los crustáceos,

moluscos, cutículas de insectos y como constituyente de las paredes de muchos hongos. Hay dos tipos de quitina α y β , la quitina de la pata es del tipo β [6].

Los parámetros importantes para caracterizar al quitosano son: grado de desacetilación (GD), peso molecular, viscosidad; estos influyen en su biodegradabilidad, solubilidad, grado de hinchamiento, actividad inmunológica, bioactividad y biocompatibilidad. Además hay otros parámetros fisicoquímicos como los porcentajes de humedad, de proteínas y de cenizas [6,7]. Los quitosanos se utilizan en las áreas farmacéuticas, biomédicas, alimentos, agricultura, ambiental y cosméticos [6].

Las nanopartículas tienen un inmenso potencial como liberación de drogas debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas. Estas partículas pueden proveer propiedades farmacológicas, terapéuticas, etc. [8]. En los últimos años se está empleando al quitosano como nanomateriales para diferentes aplicaciones: ingeniería de tejidos, liberación de fármacos, diagnóstico de cáncer y otras diversas aplicaciones de las industrias [9,10].

PARTE EXPERIMENTAL

Recolección de la muestra. La planta líquénica completa se colectó el 5 de mayo del 2013 en el departamento de *Ancash*, provincia de *Asunción*, distrito de *Chacas*, pueblo de *Canchas*; a una altitud 3.427 m. El líquen *Everniopsis trulla* fue identificada por la *Dra. Magda Chanco*, del *Museo de Historia Natural – UNMSM*.

Determinación de fenoles. Se realizó mediante la técnica de *Folin–Ciocalteu*, la cual se basa en la propiedad de los compuestos fenólicos de reaccionar frente a agentes oxidantes. Este reactivo contiene molibdato y tungstato sódico que al reaccionar con los compuestos fenólicos presentes, forman complejos fosfomolibdico – fosfotúngstico. En medio básico la transferencia de electrones reduce estos complejos a óxidos de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), cromógenos de color azul intenso que son proporcionales a la cantidad de grupos fenólicos presentes en la molécula de interés. La lectura de la absorbancia del complejo se realizó a 760 nm en un espectrómetro ultravioleta–visible. Se realizó una curva de calibración con ácido gálico (patrón). Los resultados fueron expresados en mg de ácido gálico equivalentes por gramo de extracto de líquen [11, 12]. Para la preparación de la solución patrón, preparación de la muestra, preparación de la curva de calibración se realizó lo que indica la bibliografía [11].

Determinación de la actividad antioxidante. El radical DPPH posee un electrón desapareado, lo cual le confiere un color violeta observado en la respectiva banda de absorción alrededor de los 517 nm. El parámetro que se midió es el porcentaje de reducción del DPPH (Q) frente a la muestra, llamado también de inhibición. Se define Q con la siguiente ecuación:

$$Q = 100 \cdot \left(1 - \frac{A_{muestra}}{A_{control}} \right)^i$$

donde $A_{muestra}$ es la absorbancia de la muestra y $A_{control}$ la absorbancia del reactivo DPPH. Para la preparación de las soluciones patrones, muestra problema, se utilizó la metodología de la bibliografía [12].

Aislamiento del ácido úsnico. Se maceró un kilogramo de liquen seco y molido, con cloroformo, por un periodo de 3 días, con dos repeticiones, obteniéndose un volumen de 3,5 litros; este extracto se concentró a 200 mL y se dejó en reposo, a 0°C, se formó un sólido cristalino amarillo, luego se realizó la purificación por recristalización sucesivas hasta obtener un sólido cristalino amarillo (compuesto A), su punto de fusión fue de 203°C, éstos cristales se enviaron al extranjero para su análisis espectroscópico [13,14].

Obtención del quitosano. Se obtiene a partir de la desproteización (NaOH 10%, agitando y calentando a 60°C durante 2 horas), de las plumas de pota, obteniéndose quitina, el cual se lleva a un proceso de desacetilación (tratar con soluciones de NaOH al 50%, agitando y calentando a 100°C por dos horas); luego, se lava con agua destilada sucesivamente hasta alcanzar pH neutro y se llevó a secar a la estufa al vacío a 80°C durante 4 horas. Finalmente al quitosano obtenido se realizan los análisis fisicoquímicos: porcentaje de humedad, cenizas, nitrógeno, grado desacetilación, peso molecular y viscosidad para caracterizarla [6,7].

Despolimerización del quitosano. Para ello se prepara una solución de quitosano en ácido acético al cual se añade 20 mL de solución de nitrito de sodio por 2, 4, y 6 horas. Así se obtienen diferentes tipos de quitosano variando solo el peso molecular [15].

Preparación de nanopartículas de quitosano. Se prepara empezando con la solución de quitosano (500 mL de 0,1 M de ácido acético, 2,5 mg/mL) luego se añade gota a gota la solución de ácido úsnico (solución acetónica 1 mg/mL), después se añade, la solución de TPP (20 mL de 1,5 mg/mL); se continua agitando a 1.200 rpm. Finalmente la solución se llevó al atomizador a las condiciones: T = 200°C, tiempo = 30 minutos, Set Fan = 100%, Set The = 15 Segundos, bomba peristáltica = 10%. Finalmente este sólido muy fino se lleva al análisis de SEM e IR [9,10].

Preparación de la crema. Se colocó en un erlenmeyer la fase acuosa: el agua destilada (86,00 mL), texapòn (0,70 g), glicerina (3,00 g) y someter a calentamiento hasta 75°C. Agregar quitosano solubilizado. En otro erlenmeyer se colocó la fase oleosa: la cera Lanette SX (9,00 g) vaselina líquida (2,0 g), el metilparabeno (0,10 g) y el propilparabeno (0,05 g) y el ácido úsnico, hasta fusión total. Luego cuando ambas fases estuvieron entre 75 a 80°C, agregar la fase acuosa sobre la oleosa y agitar con bagueta vigorosamente hasta la formación de la crema, luego se

colocó esta mezcla en el homogenizador durante 5 minutos. Se dejó enfriar y posteriormente se envasó en frasco adecuado y rotulado [16].

Las cantidades de ácido úsnico y quitosano se variaron, para ello se tomaron en cuenta diferentes informaciones y se aplicó el diseño factorial 2x2, (ver Tabla 1) en donde las variables son: el porcentaje en peso del quitosano (0,5 y 1,0%) y el porcentaje en peso del ácido úsnico (0,5 y 1,0%), con este diseño [17]. Se obtuvieron un conjunto de pruebas de combinaciones para preparar cuatro tipos de cremas en diferentes concentraciones de quitosano y ácido úsnico, y el parámetro para definir cuál es el mejor será determinar su factor de protección solar (FPS) empleando el método de lámpara de mercurio [18].

Según los resultados del FPS de la Tabla 2, se elegirá la mejor mezcla (composición de quitosano y ácido úsnico), luego se preparó otras cremas: con quitosano solo, ácido úsnico solo, nanopartículas de quitosano y ácido úsnico, nanopartículas de quitosano con ácido úsnico y con óxido de cinc; también formulación de crema del producto (complejo metálico) de reacción del ácido úsnico con el cinc y finalmente una crema con el producto (reacción) entre el quitosano y ácido úsnico.

Tabla 1. Conjunto de formulación según el diseño factorial 2x2.

<i>FORMULACIÓN No.</i>	<i>COMPOSICIÓN DE CADA FORMULACIÓN</i>
1	A: 0,5% Qno + 0,5% AU
2	B: 1,0% Qno + 0,5% AU
3	C: 0,5% Qno + 1,0% AU
4	D: 1,0% Qno + 1,0% AU

Análisis de las cremas. Para la caracterización fisicoquímica (densidad, porcentaje de humedad, el porcentaje de cenizas, determinación de extensibilidad, pH, prueba en la estufa, prueba de centrifugación se realizó el proceso de la referencia [16–19]). Caracterización química (el porcentaje de proteína, el porcentaje de grasa, índice de saponificación (IS), índice de acidez (IA) e índice de peróxidos (IP) [20]). Además, la caracterización cosmética, se ha desarrollado el test de SPF (*Sun Protection Factor*) para ello se ha empleado una lámpara de mercurio (Figura 1) acoplado a un programa *Pasco captone*.

Análisis de Incorporación de ácido úsnico por UV–Visible.— se realiza una extracción con cloroformo, y luego medir esta solución orgánica su absorbancia a 284 nm, finalmente se calcula el grado de encapsulamiento del ácido úsnico con la curva de calibrado [21].



Figura 1. Equipo para medir la transmitancia y la absorción de la muestra.

Evaluación microbiológica. La crema fotoprotectora es nuestra muestra, se pesó 1 g de la muestra de crema fotoprotectora y se homogeneizó con 8 mL de agua peptonada al 0,1% y 1 mL de Tween 80, para hacer una dilución de 10^{-1} . La muestra a la dilución 10^{-1} , fue sembrada en diversos medios de aislamiento. Para la evaluación de aerobios mesófilos totales la muestra fue sembrada por incorporación en *Agar Plate Count* (APC), y se incubó a 30°C durante 3 días. Para la enumeración de levaduras y mohos la muestra se sembró por incorporación en *Agar Papa Dextrosa* (APD) y se incubó a 25°C durante 7 días. Se realizó la evaluación en la presencia de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* según indica la bibliografía [22].

Análisis antiinflamatorio de la crema fotoprotectora. Consiste en la inducción de inflamación por aplicación de xilol, principal responsable de la acción irritante, en el pabellón de la oreja del ratón, la evaluación de la técnica está dada por la medición de la respuesta inflamatoria que se traduce por el aumento de peso que se produce en el área lesionada. Se utilizaron 49 ratones cepa Balb/C53/CNPB *Mus musculus* y se procedió la metodología según la bibliografía indica [22]. Los ratones recibieron en la oreja derecha e izquierda el agente irritante en la cara externa e interna con un hisopo estéril con pequeña cantidad de xilol frotando por cinco veces cada cara menos el grupo control (crema base). Aplicada la sustancia flogógena se dejó transcurrir 20 minutos luego se procedió aplicar por vía tópica las crema elaborada con el ácido úsnico y el quitosano en una concentraciones (0,5% de cada uno), se usó como estándar: diclofenaco 1% gel y betametasona 0,05% crema. Transcurridas 4 horas se sacrificaron al animal de experimentación (ratones) por dislocación cervical y luego se procede a cortar una porción de ambas orejas utilizando un sacabocados (6 mm de diámetro). El porcentaje de inhibición se calculó mediante la siguiente fórmula [22]:

$$\% \text{ inhibicion} = 100 \cdot \frac{\Delta \text{ peso grupo control} - \Delta \text{ peso tratamiento}}{\Delta \text{ peso grupo control}}$$

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados de los análisis cualitativo. La marcha fitoquímica y las reacciones de coloración del liquen nos indica que la especie en estudio contiene fenoles, taninos, ácidos fenólicos, aminoácidos, esteroides, triterpenos, dépsidos, depsidonas, dibenzofuranos, etc.

Elucidación del compuesto A. Es soluble en cloroformo y acetona, parcialmente soluble en etanol e insoluble en agua; tiene un punto de fusión de 203–204°C. Se realizó una cromatografía en capa fina usando el sistema de disolvente (tolueno/acetato de etilo/ácido acético glacial 6:4:1 v/v/v), se aspersó con una solución de H₂SO₄ en MeOH 10%, observándose una sola mancha con un R_f 0,45 idéntico al de una muestra de ácido úsnico. Se midió la rotación óptica del compuesto, calculándose el $[\alpha]_D = + 492$, a 25°C en cloroformo (c = 0,52). El espectro IR, sus bandas nos indican presencia de grupos de OH, COOH, CHO, C–O–C. Su espectro ultravioleta visible (UV–V) tiene dos bandas bien definidas cuyas máximas absorciones son 233 y 283 nm, ver Figura 2B. En el espectro de RMN–C¹³ medido en CDCl₃, se observa que los carbonos de los carbonilos de los grupos del –COMe están bien desplazados a 200,29 (C–14) y 201,73 (C–17) ppm; para los metilos aromáticos los valores son 27,88 (C–13) y 7,50 (C–16) ppm; para el desplazamiento 98,27 ppm se analizando bien el espectro se concluye que hay una sola señal para dos tipos de carbonos con desplazamientos muy cercanos (C–4 y C–6); en general se observa que hay valores de desplazamiento muy parecidos entre el compuesto A y el ácido úsnico [1, 13], ver la Tabla 2.

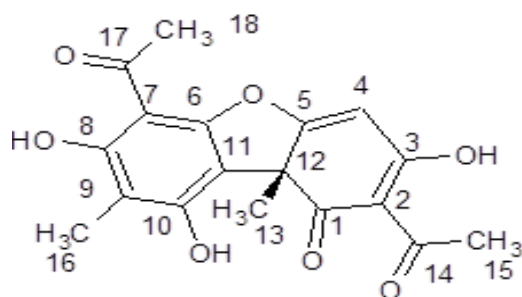
Analizando el espectro de masa, nos indica que se trata del compuesto C₁₈H₁₆O₇ cuyo peso molecular es 344,0 g·mol⁻¹ y sus fragmentos son: 260, 233(100), 217, 161. Coincide exactamente con los datos de la referencia [5]. En base a los espectros de RMN–H¹ y RMN–C¹³, y a las otras informaciones se propone que el compuesto A es el (+) – ácido úsnico, C₁₈H₁₆O₇, cuya estructura química se indica en la Figura 2A.

Para la determinación del contenido de fenoles totales. Se midió la absorbancia de las soluciones de ácido gálico patrón (ver Tabla 4), con estos datos se obtuvo la gráfica la curva patrón (ver Figura 3), así se obtiene una ecuación para calcular la concentración del ácido gálico. Empleando la siguiente fórmula, se relacionó la concentración del ácido gálico con la absorbancia: Acido gálico = (Absorbancia + 0,0771)/0,0991. Para el análisis de la muestra problema M1 (extracto etanólico del liquen), se tiene que el peso de la muestra fue de 3,6 mg (disuelto en 50mL

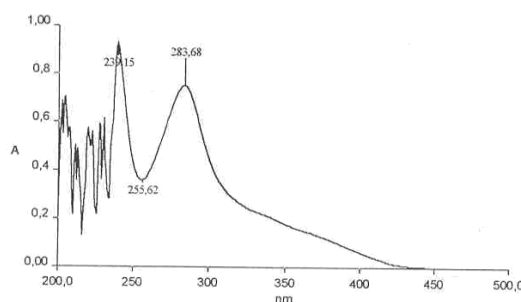
de agua) y su absorbancia medido en promedio fue de 0,2903 entonces la concentración de ácido gálico 3,7073 mg/L, realizando los cálculos tenemos 50,5 mg de ácido gálico por gramos de extracto; para la otra muestra (compuesto A) (ver Tabla 4).

Tabla 2. Comparación de desplazamientos de RMN ¹³C del compuesto A y del ácido úsnico.

N°. C	δ del ácido Úsnico ¹⁴	δ de Sólido A	N°. C	δ del ácido Úsnico ¹⁴	δ de Sólido A
C-1	198,2	197,966	C-10	164,1	163,775
C-2	179,4	179,273	C-11	105,4	105,151
C-3	155,1	155,127	C-12	59,2	59,0032
C-4	98,3	98,2731	C-13	27,4	27,8844
C-5	101,7	101,433	C-14	200,1	200,290
C-6	99,8	98,2731	C-15	32,0	32,0949
C-7	109,5	109,208	C-16	7,7	7,5084
C-8	157,6	157,405	C-17	201,3	201,730
C-9	104,2	103,892	C-18	30,9	31,2602



a) Compuesto A(d-Ácido úsnico)



b) Espectro UV visible del compuesto amarillo

Figura 2. a) Estructura química del ácido úsnico (compuesto A), y b) espectro UV-visible del compuesto A.

Determinación de la actividad antioxidante. En la Tabla 5 se resume las absorbancias promedio y el porcentaje de inhibición de DDPH (Q) dependiendo de la concentración de ácido gálico (mg/mL). En la Tabla 6 esta los valores para la muestra M1. Se observó que la muestra M1 consumió el 50% de reactivo DPPH a una concentración cercana a 100 mg/mL (ver Tabla 6), mientras que el ácido gálico consumió el 50% de reactivo DPPH a una concentración aproximada de 9,5 mg/mL (ver Tabla 5).

Tabla 3. Absorbancias el estándar de ácido gálico a 760 nm.

Concentración (mg/L)	Absorbancia en promedio
1	0,0308
2	0,1065
3	0,2215
4	0,3244
5	0,4172

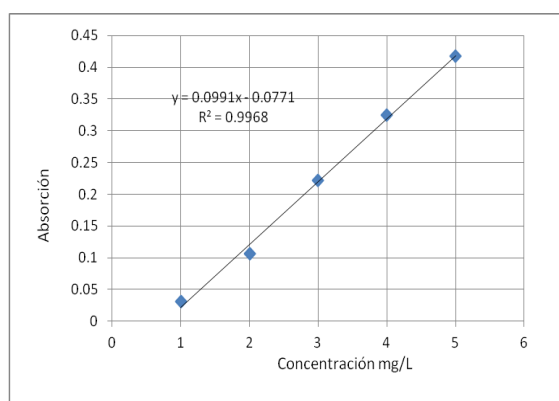


Figura 3. Curva de calibración.

Tabla 4. Contenido de fenoles totales en la extracto liquénico y en los compuestos A.

Código	Muestra	Peso (mg)	Absorbancia promedio	Concentración ácido gálico (mg/L)	mg de ácido gálico equivalentes por gramo de muestra
M1	Extracto	3,6	0,2903	3,7073	50,5
M2	Acido úsnico (sólido A)	1,3	0,1233	2,0221	77,7

Tabla 5. Absorbancias promedio y valor de Q del ácido gálico.

Concentración ácido gálico (mg/mL)	Absorbancia promedio	Q (%)
0	0,5012 ± 0,009	0
0,1	0,4133 ± 0,007	17,5
0,25	0,3839 ± 0,008	23,4
0,5	0,3571 ± 0,005	28,8
1	0,3374 ± 0,007	32,7
5	0,2694 ± 0,001	46,2
10	0,2337 ± 0,003	53,4
30	0,1956 ± 0,005	61,0
45	0,1872 ± 0,001	62,6

Tabla 6. Absorbancia promedio y el valor Q de M1.

Concentración de la muestra en mg/L	EXTRACTO M1	
	Absorbancia promedio	Q (%)
0	0,6544	0
5	0,5745	12,2
25	0,5002	23,6
50	0,4465	31,8
75	0,3945	39,7
100	0,3035	53,6
125	0,2432	62,8
150	0,2012	69,3
175	0,1776	72,8
200	0,1544	76,4

Obtención del quitosano. Inicialmente se ha caracterizado la materia prima, que son los residuos orgánicos llamado “pluma de pota”, son cartílagos del calamar gigante (*Dosidicus gigas*), su caracterización está en la Tabla 7, en segundo lugar, se caracteriza a la quitina y quitosano [6,7]. estos parámetros lo tenemos en la Tabla 8. Además, se realiza la despolimerización del quitosano para tener un quitosano de bajo peso molecular, así tenemos 3 tipos de quitosanos y su respectiva caracterización [6,7,15], ver Tabla 9.

Preparación de las nanopartículas. Inicialmente se preparó la solución de quitosano (500 mL de 0,1 M de ácido acético, 2,5 mg/mL), luego sobre esta agrega la solución de ácido úsnico (100 mL, en acetonitrilo a 1 mg/mL) gota a gota con agitación a 1.200 rpm; luego se añade la solución de TPP (100 mL de 1,5 mg/mL), siempre agitando continuamente. Esta solución que ya está formada las nanopartículas aunque al observar visualmente no se observa sólidos, pero con el rayo láser se observa una línea roja continua en toda la solución, es decir cumple el efecto *Tyndall*. Finalmente para obtener el sólido de nanopartículas se lleva esta solución al atomizador (*SPRAY DRYER* modelo TP-S15), a las siguientes condiciones: T° = 200°C, tiempo = 30 minutos, Set Fan= 100%, Set The = 15 segundos y bomba peristáltica = 10%.

Tabla 7. Caracterización de la pluma de pota.

<i>Parámetro</i>	<i>Valores obtenidos</i>
Porcentaje de humedad	47,6%
Porcentaje de cenizas	21,4%
Porcentaje de nitrógeno	35,4%
Porcentaje de quitina	32,3%
Porcentaje de quitosano	23,8%

Tabla 8. Caracterización del quitosano obtenido.

<i>Muestra</i>	<i>Porcentaje de humedad</i>	<i>Porcentaje de Cenizas</i>	<i>Porcentaje de nitrógeno</i>	<i>Porcentaje de DA</i>	<i>Viscosidad</i>	<i>Peso molecular</i>
Quitina	15,6	0,21	8,2	52,8	No se aplica	No se aplica
Quitosano	14,5	0,15	7,6	89,1 (RMN-H) 90,2 (UV)	780 cP	1.080 kDa

Para la caracterización de las nanopartículas (sistema Qno + AU + TPP) se realiza un análisis de SEM de la universidad PUCP (microscopio electrónico de barrido Quanta 650), en la

Figura 4, se observa que las nanopartículas son de forma esféricas y con algunas aglomeraciones, el tamaño varía de 300 a 700 nm. Por otro lado, analizando los espectros de IR se observa que hay diferencia al comparar los espectros del quitosano, ácido úsnico y de la nanopartículas véanse las Figuras 5 y 6, respectivamente, por ejemplo, la señal a 3.400 cm^{-1} , presencia de OH del Qno ó del AU ha disminuido la banda, a 1.550 cm^{-1} igualmente se observa un cambio entre el Qno y AU con el espectro de las nanopartículas se observa que ha disminuido y solo aparece como un hombro, finalmente el pico a 1.700 cm^{-1} la banda del C = O ha desaparecido.

Tabla 9. Caracterización de los quitosano despolimerizados.

Quitosanos	Porcentaje de humedad	Porcentaje de cenizas	Porcentaje de nitrógeno	Grado de desacetilación	Viscosidad Intrínseca $[\eta]$	Peso molecular kDa
Qno-A	14,1%	0,27%	7,9%	80%	609	877
Qno-B	7,5%	0,38%	7,4%	80%	281	381
Qno-C	8,6%	0,41%	7,5%	80%	98	123

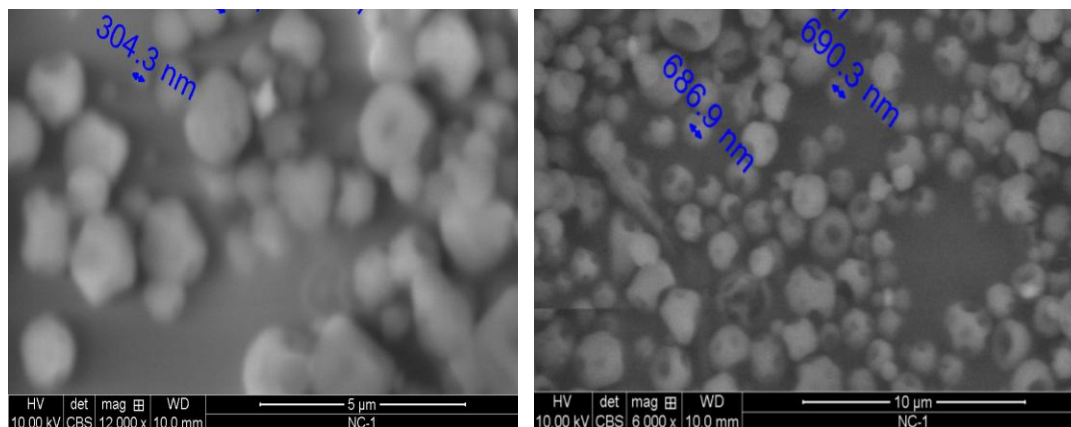


Figura 4. Fotos del análisis de SEM del sistema Qno + AU + TPP.

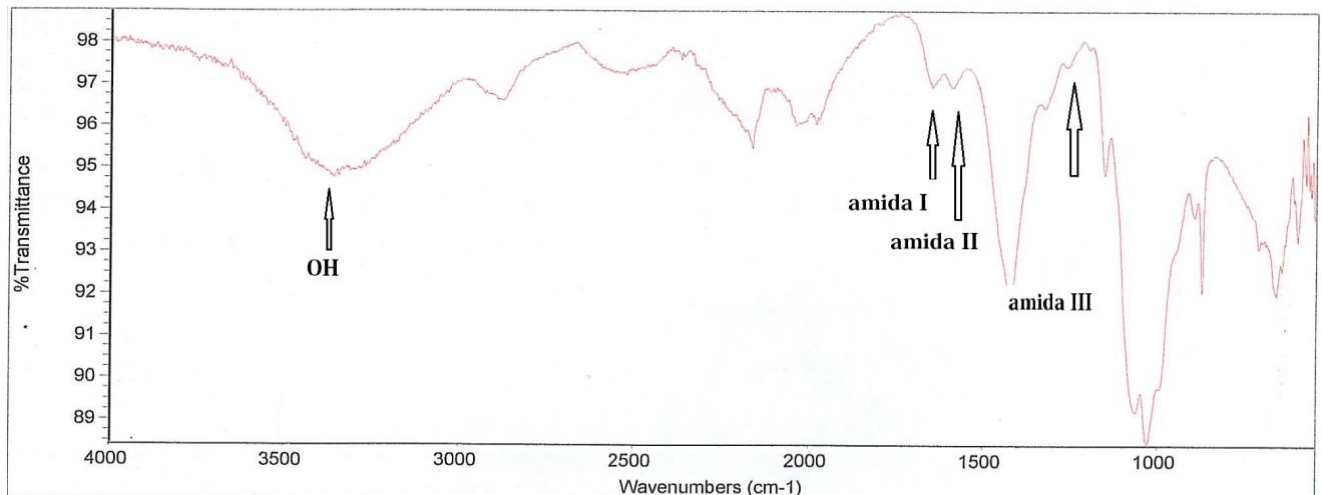


Figura 5. Espectro IR del quitosano (Qno).

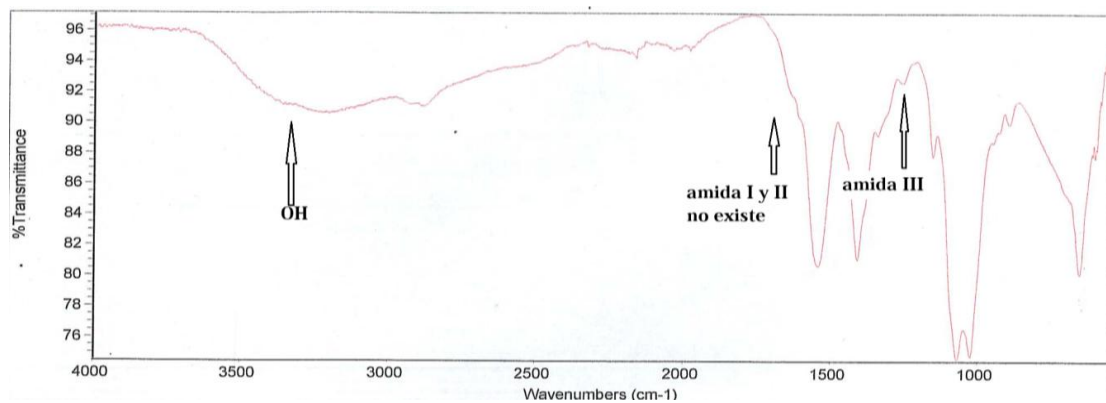


Figura 6. Espectro de IR de las nanopartículas (Qno + AU + TPP).

Reacción del quitosano con el ácido úsnico (Reacción bases de *Schiff*), el R-NH₂ representa el quitosano que se disuelve en etanol con ácido acético en dos días luego se añadió una solución etanólico del ácido úsnico y se deja en reflujo durante 6 horas, al final se obtuvo un sólido amarillo que fue recristalizado con etanol-agua (5:1), ver Figura 7.

Se analiza los espectros de infrarrojo en la forma de ATR de cada componente (ver Figura 8), se observa que la señal de OH ha disminuido la banda, la banda alrededor de 2.000 cm⁻¹ a aumentado y es más pronunciado esto se debe al enlace C = N formado entre el quitosano y el ácido úsnico.

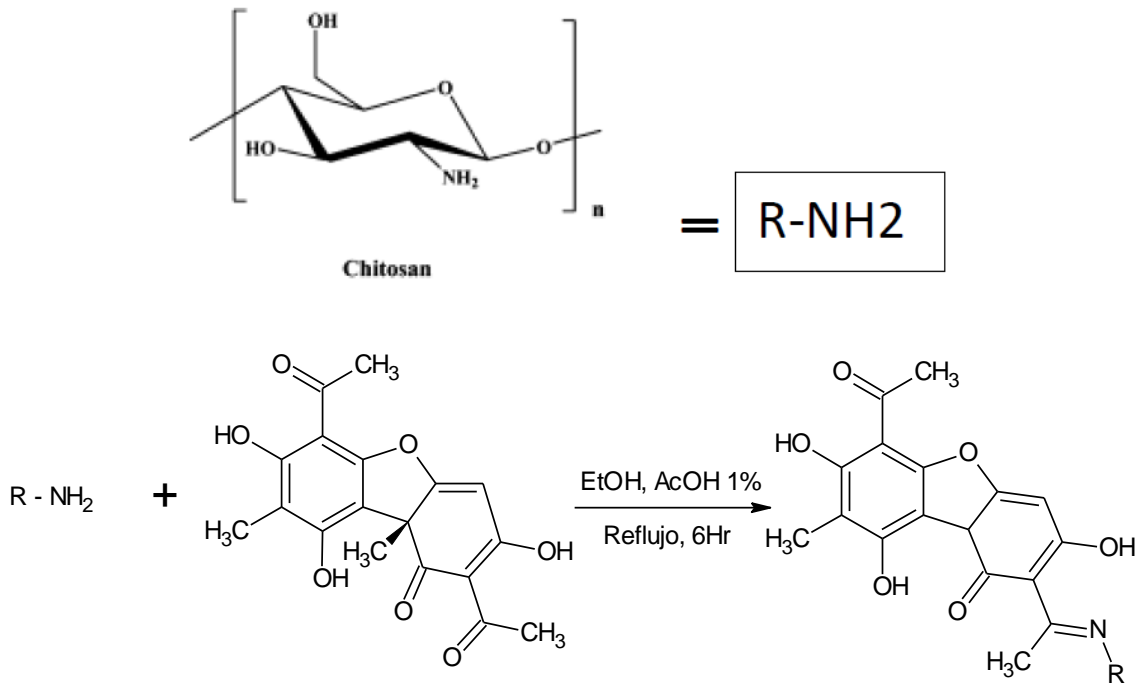


Figura 7. Reacción del quitosano con el ácido úsnico.

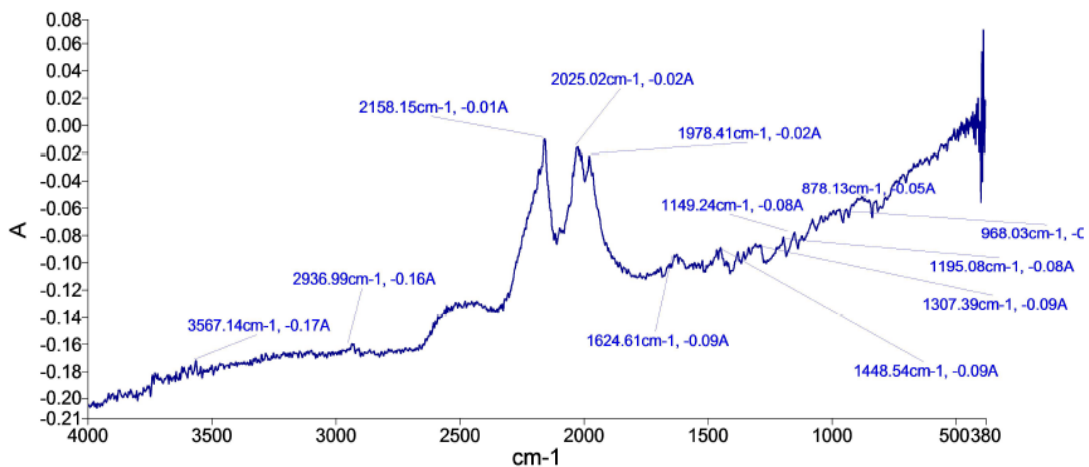


Figura 8. Espectro Infrarrojo del producto de reacción entre el Qno y AU.

Preparación de la crema. Si realiza de la siguiente forma: primero se prepara la fase acuosa en la cual se mezcla: el agua destilada (86,00 mL), texapón (0,70 g), la glicerina (3,00 g) y someter al calor hasta 75°C. Agregar quitosano solubilizado 0,5 g y en otro vaso se coloca la fase oleosa para ello se mezcla: la cera Lanette SX (9,00 g) vaselina líquida (2,0 g), el metilparabeno (0,10 g), el propilparabeno (0,05 g) y ácido úsnico; agitando y calentando hasta fusión total, a 75°C. Cuando ambas fases estén entre 75 y 80°C, se agrega la fase acuosa sobre la oleosa y se agita vigorosamente hasta la homogenizar la mezcla, dejamos enfriar y guardamos en un frasco adecuado y rotulando el contenido.

Obtención de la crema validada. Se aplica un diseño experimental en este caso aplicamos un diseño factorial 2x2, para el cual nuestras variables son dos: la concentración del ácido úsnico (0–1%) y el concentración de quitosano (0–1%), al final se obtuvo un tabla y se tiene que preparar 4 formulaciones (A, B, C, y D) ver Tabla 1. Y lo que se analizará será de cada crema su factor de protección para determinar que formulación es la mejor.

En la Tabla 10 se observan los resultados de las 4 formulaciones, a partir de los cuales se concluye que la formulación A es la mejor porque su transmitancia es la más baja (9,6%) entre la 4 formulaciones, es decir la diferencia (90,4%) es lo que absorbe. Además en esa tabla se observa los factores de fotoprotección solar de otras formulaciones, por ejemplo, agregando solo quitosano, solo ácido úsnico, etc (véase la Tabla 10), esto nos indica que al combinar Qno y AU la crema protege mejor de solo Qno o solo AU. Además, si sintetizamos nanopartículas de Qno con AU, su factor de protección será mejor, pero esto implica que el costo se eleva. Pero si además, formulamos agregando el ZnO (sustancia fotoprotectora inorgánica) aumenta más la protección solar a 7,5%. Aplicando la ecuación de Mansur [20], el FPS nos dio 8,8 para la crema (Qnoc+cAU).

Por otro lado, también realizamos una crema con el producto de la reacción entre el Qno y AU, y su factor de protección es bastante bueno 13,9% respecto a la crema con el quitosano solo y el ácido úsnico solo. De igual forma, si comparamos la crema formada con el producto del complejo formado entre el ácido úsnico y el cinc, esta es mejor como fotoprotectora respecto a sus componentes individuales.

Caracterización de la crema validada. En la Figura 9.A se muestran 3 tubos (3 tipos de cremas en donde se ha variado las condiciones de agitación para homogeneizar), de las cuales se observan que en las dos primeras hay formación de dos fases (la primera mayor que la segunda) esto es debido que la crema formada falta homogeneizar bien, mientras que el tercer tubo es homogéneo y estable a la prueba de centrifuga de hasta 4.000 rpm durante 30 minutos. Entonces con este tipo de proceso de homogenización se han desarrollado todas las cremas.

Tabla 10. Resultados del factor de protección solar (FPS) de todas las cremas.

<i>LA MUESTRA</i>		<i>% transmitancia de la muestra</i>
<i>CÓDIGO</i>	<i>DESCRIPCIÓN</i>	
A	Qno 0,5% + AU 0,5%	9,6
B	Qno 1,0% + AU 0,5%	10,0
C	Qno 0,5% + AU 1,0%	14,0
D	Qno 1,0 % + AU 1,0%	25,0
E	Qno 0,5%	38,8

F	AU 0,5%	18,1
G	ZnO 0,5%	32,9
H	Nanopartículas (AU + Qno) 1%	7,9
I	Nanopartículas (Qno + ZnO) 1%	26,2
J	Nanopartículas(AU + Qno + ZnO) 1%	7,5
K	Reacción AU + Qno	13,9
L	Reacción AU + Zn	22,2
Patrón	NATURA-8	16,0

El resultado de los análisis fisicoquímicos de la crema como producto son: no tiene olor, con parcialmente adherencia, hay una ligera separación de fases, el pH = 5,6 – 5,8 durante 3 meses, en la prueba de dilución, se observó un emulsión lechosa cuando se agregó los 50 mL de agua a 1 gramo de crema, esto implica que el sistema de preparación de la crema es de O/W, ya que permitieron la dilución de la crema. Prueba de extensibilidad o esparcimiento, la distancia del diámetro del círculo formado es de 12,6 cm. Otras características fisicoquímicos son: densidad: 0,658 g/mL; porcentaje de humedad: 15,71 y de cenizas: 0,43.

Resultado de las encuestas del análisis sensorial, aproximadamente un 55–60% de personas encuestadas opina que la crema mantiene la integridad de forma, de poco brillo, baja firmeza, no es muy pegajoso, de mediana cohesión, se forma el pico con la yema de los dedos, tiene humedad media, se desliza bien, no deja residuo, se absorbe bien en la piel, da frescor, etc.

En la prueba de lavado, después de colocar la crema, 1 gramo sobre la mano y luego se aplica un chorro de agua continua, se observa que se puede lavar completamente. Prueba de centrifugación, se observa que 30 minutos de centrifugar a 1.000 rpm, se forma dos fases la parte acuosa (fase inferior) es en promedio la quinta parte de la otra fase), ver Figura 9. La influencia de la temperatura, en esta prueba no se ha observado ningún cambio en el color ni olor, solo que la muestra está seco.

Se realizó también una prueba de estabilidad frente a la radiación UV/IR solar en el tiempo (“envejecimiento a 24, 48, y 72 horas”); en 24 horas la crema es estable a la radiación continua, esto equivale a 2 meses de estabilidad de la crema como producto, y la muestra de 48 horas hay un ligero cambio en el color respecto al a crema inicial mientras que a 72 horas es mucho más evidente este cambio, su color es más amarillo; todo esto indica que la crema validada es estable a la radiación solar hasta por 2 meses de exposición directa cuando se guarda en un frasco transparente

y a temperatura ambiente. Por otro lado, se realizó una caracterización química y los resultados se encuentran en la Tabla 11.

Tabla 11. Caracterización química de la crema validada

CARACTERISTICAS QUIMICA	
% de proteínas	0,08%
% de grasa:	3,93% en base humedad
Índice de saponificación	5,77 mg KOH / gramo de crema
Índice de acidez	3,78 mg KOH / gramo de crema
Índice de peróxidos	0 mEqO ₂ /Kg crema.



Tipo A1 Tipo A2 Tipo A

Figura 9. Prueba de centrifuga a la crema tipo A, A1 y A2.

En la parte farmacológica, los resultados indican que la crema (Qno + AU) tiene la propiedad antiinflamatoria de mediano poder, equivalente al diclofenaco y a la betametasona, ver los resultados en la Tabla 12. Se considera como actividad antiinflamatoria moderada la inhibición del edema del 35 al 65% y como buen efecto antiinflamatorio un valor mayor de 65% [22].

Los resultados experimentales de la calidad microbiológica. Las especificaciones como límite máximo se han considerado en referencia a la *Secretaría General de la Comunidad Andina*, según Resolución 1.482. Se ha determinado cantidad de microorganismos aerobios mesófilos, mohos y levaduras como mínimo $\leq 5 \cdot 10^3$ UFC/g y ausencia de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabla 12. Resultados de la propiedad antiinflamatoria de la crema.

Tratamientos	% Inhibición edema
Control (blanco)	0,00%
Diclofenaco 1%	32,27%
Betametasona 0,05%	37,27%
Crema c/ ácido úsnico 0,5% y Qno 0,5%	37,72%

CONCLUSIONES

Se aisló al compuesto liquénico: compuesto A (Ácido úsnico).

El contenido de fenóles totales del extracto del liquen *Everniopsis trulla* alcanzó ser de 50,5 y para los compuesto A y B 77,7; y 68,8 mg de ácido gálico/g de muestra. Se logró determinar la actividad antioxidante en el extracto del liquen (M1) con mayor contenido de compuestos fenólicos, mediante el empleo del reactivo DPPH. Se obtuvo un valor de CI_{50} a una concentración cercana a 100 mg/mL.

Se ha realizado una crema validada con un diseño experimental (diseño factorial 2x2) a partir de ello se logró realizar un crema bastante estable y de buena calidad a la cual se realizó una análisis sensorial, análisis fisicoquímicos, químicos, etc. Se ha realizado nanopartículas (Qno + AU) y caracterizado por SEM y IR. Con la cual se ha desarrollado una crema fotoprotectora y al compararlo con la crema normal mezcla simple de Qno + AU, la fotoprotección es mejor con el sistema de nanopartículas de 9,6 a 7,5% pero ambos son mejores que el patrón (crema fotoprotectora NATURA 8).

Se comprobó efecto antiinflamatorio de las cremas 0,5% contenido de ácido úsnico aislado del liquen *Everniopsis trulla* (sólido A), por vía tópica en la oreja derecha del ratón con una inhibición 37,72%. Los resultados demuestran que el producto (crema fotoprotectora) ha sido elaborada en condiciones asépticas e higiénico-sanitarias óptimas, demostrado por la ausencia de potenciales patógenos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Asimismo, los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos, mohos y levaduras se encuentra dentro de los límites permisibles para este tipo de productos. En conclusión, el producto en mención se califica como libre de microorganismos y apto para su uso.

Agradecimientos. Se agradece a la *Dra. Magda Chanco*, por la identificación botánica; al *Dr. J. Elix* de la *Universidad Nacional de Australia* por el análisis de HPLC, a la *Dra. María Caramantín Soriano* por los análisis de RMN- H^1 y RMN- C^{13} , y al *Dr. Arturo San Feliciano* por los análisis de espectrometría de masas.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Kika HN, Vilegas W, *Química Nova Brasil*, **21**,110 (1998)
- [2] Zambare VP, Christopher LP, *Pharmaceutical Biology*, **50(6)**,778 (2012)
- [3] Luo, Yamamoto Y, Liu Y, Sung JJ, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **20(11)**, 1524 (2010)
- [4] La Agencia de Protección de los Estados Unidos, EPA 430-K-01-009, 2001, setiembre, 1-30.
- [5] La OSHA 3168(2000), 1-20.
- [6] Pastor A "*Quitina y Quitosano: Obtención, Caracterización y Aplicaciones*". CYTED. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú, Perú, 2004
- [7] Fuentes LB, Pastor A, *Rev. Soc. Quím. Perú*, **75(1)**, 3 (2009)
- [8] Gomaa Y, El-Khordagui L, Boraei N, Darwish I, *Carbohydrate polymers*, **81**, 234 (2010)

- [9] Garrastazu G, Santos R, Albernaz M S, Canema D, *European J. Pharmaceutics & biopharmaceutics*”, (2013)
- [10] Nogueiro B, Rocha B, Santos L, Alves A, *Trends in food Science & technology*, **31**, 138 (2013)
- [11] Cruzado M, Pastor A, Castro MON, Cedrón JC, *Rev. Soc. Quím. Perú*, **79(1)**, 57 (2013)
- [12] Manojlovic N, Rankovic B, Kosanic M, Vasiljevic P, *Phytomedicine*, **19**, 1166 (2012)
- [13] Castro MON, Cedrón JC, *Rev. Soc. Quím. Perú*, **79(2)**, 144 (2013)
- [14] Huneck S, Yoshimura I "*Identificación of lichen substances*". Berlin: Springer-Verlag, 1996
- [15] Salazar MC, Valderrama A, *Rev. Soc. Quím. Perú*, **79(3)**, 195 (2013)
- [16] Casas "Curso teórico-práctico: desarrollo y formulaciones de protectores solares", del 24-26 febrero de 2015, Química Suiza Industrial.
- [17] Pérez P, Nieto OM, Bilbao O, López A, González L, *Revista Cubana de plantas medicinales*, 47(2), 239 (2013)
- [18] Abreu Dutra E, Almanca GD, Kedor Hackmann ER, Rocha Miritello MI, *Revista Brasileira de Ciências farmacéuticas*, **40(3)**, 381 (2004)
- [19] Latimer GW "Official methods of analysis of AOAC international", 19th edition, vol. 1 y 2, USA, 2012, capítulos 1, 3, 4, 15 y 17
- [20] Farmacopeia Brasileira, 5ª edición, Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria, Editora Fiocruz, Brasilia 2010
- [21] Castro M., O.N., *Rev. Soc. Quím. Perú*, **76(4)**, 389 (2010)
- [22] Seydel JK, Wiese M "*Drug-membrane interactions. Analysis, drug distribution and modeling*". Wiley-VCH, 2002
-