

## Evaluación tridimensional de la topografía de superficie de la piel: aplicación a estudios de efectividad de principios activos.

■ Autores: Susanna Castel<sup>1</sup>, Xavier Sanjuán<sup>2,3</sup>, Manuel Reina<sup>2,3</sup>, Senen Vilaró<sup>2,3</sup>.

1 Unidad de Microscopia Confocal y Micromanipulación Celular. Servicios Científico-Técnicos, Universidad de Barcelona. Parque Científico de Barcelona. Josep Samitier, 1-5 08028 Barcelona.

2 Celltec UB. Universidad de Barcelona, Facultad de Biología. Diagonal, 645. 08028 Barcelona

3 Advancell (Advanced in vitro Cell Technologies, SL). Parque Científico de Barcelona. Josep Samitier, 1-5 08028 Barcelona.

### Análisis del relieve cutáneo a partir de improntas de silicona

En los últimos años se han desarrollado nuevos métodos para el estudio de la topografía de la superficie de la piel que permiten el análisis cuantitativo del relieve cutáneo incluyendo también la cuantificación de la severidad de las arrugas presentes en la piel. La mayoría de los métodos utilizados son adaptaciones de los minuciosos estudios que se llevan a cabo en la industria metalúrgica y/o en microelectrónica, campos en los que se iniciaron y perfeccionaron los estudios de topografía de superficies.

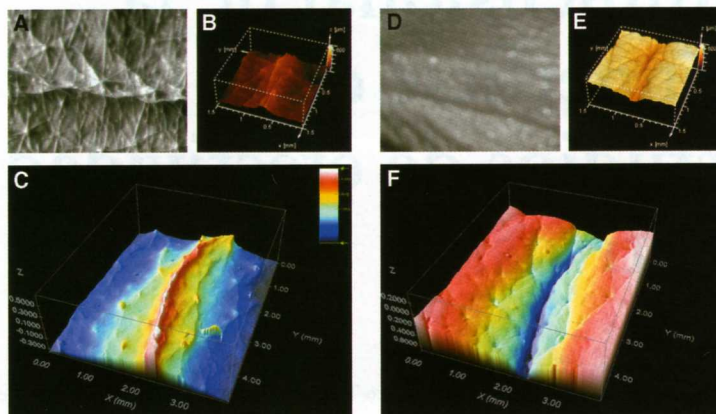
El análisis tridimensional de la topografía de superficie de la piel es un método cuantitativo no invasivo y que permite monitorizar cambios en la superficie de la piel que ocurren en tiempos relativamente largos desde horas a días o semanas. Es una técnica de gran utilidad en dermatología y cosmetología y que se ha utilizado para evaluar numéricamente y de una manera objetiva la evolución de la superficie de la piel en tratamientos tópicos

contra el foto-envejecimiento<sup>1-4</sup>, en estudios epidemiológicos de enfermedades de la piel<sup>5</sup>, en tratamientos de remodelaje de la piel con láser<sup>6,7</sup> y en estudios del efecto de principios activos antiarrugas<sup>8</sup>.

La superficie cutánea se puede analizar utilizando métodos indirectos en los que los parámetros de rugosidad se obtienen a partir del análisis efectuado en imágenes digitales de las sombras obtenidas al iluminar las réplicas de la piel con un cierto ángulo. Aunque estos métodos se suelen utilizar bastante en Japón, en Europa y Estados Unidos los métodos más utilizados son los que evalúan la rugosidad directamente sobre la réplica de la piel, ya sean perfilométricos o topográficos. Los métodos que analizan la rugosidad en un único perfil también son conocidos como perfilometría 2D ya que proporcionan la información de rugosidad y profundidad (parámetros respecto al eje z) a lo largo de una única línea (eje x), es decir información en las coordenadas xz. En un análisis tridimensional (3D) o topográfico la información proporcionada refleja la realidad en xyz, es decir, proporcionan

información de rugosidad y profundidad (parámetros respecto al eje z) en toda una superficie (coordenadas xy).

En cualquier caso, en ambos tipos de estudios se suelen utilizar improntas de silicona que proporcionan una réplica exacta "en negativo" de la zona de la piel en estudio. Las imágenes que forman parte del bloque izquierdo de la figura 1 (1A, 1B y 1C) corresponden a fotografías y a representaciones tridimensionales de improntas de silicona o réplicas de la piel que en realidad son un negativo "exacto" de la piel. Así, en una réplica las arrugas se observan como elevaciones, montañas o "picos" aunque realmente en la piel sean surcos o "valles". En cambio, en las imágenes del bloque derecho de la figura, las arrugas están representadas realmente por "valles o surcos" ya que la imagen 1D es una fotografía real de la piel y las representaciones tridimensionales corresponden al "negativo" de las réplicas (1E, 1F) por lo que equivalen a una imagen "real" de la piel.



**Figura 1**

**Réplicas de la en silicona.** A, Fotografía de una zona del macro-relieve de una réplica de piel humana en silicona. Topografías de superficie de una zona de macro-relieve de réplicas de piel obtenidas por microscopia confocal (B) y por perfilometría óptica confocal (C). D, Fotografía de una zona de macro-relieve de piel humana. Topografías de superficie de réplicas de piel a las que previamente se les ha aplicado un proceso matemático de inversión en z: E, microscopia confocal, F, perfilometría óptica confocal.

Al realizar los análisis sobre las réplicas de la piel, la obtención éstas es un paso crítico en el análisis de la superficie cutánea ya que de su estandarización y dependerá en buena parte la fiabilidad del estudio. El método de obtención de réplicas fue ampliamente descrito y estandarizado por Gary L. Grove a finales de los 80 y principios de los 90 y desde entonces ha sido ampliamente utilizado en estudios en dermatología y cosmetología<sup>3,4,8</sup>. La zona más susceptible de estudio es la zona peri-orbital o del "contorno de ojos" ya que es una zona en donde además de poder observar los cambios en el *micro-relieve* (hendiduras o arrugas de hasta 50  $\mu\text{m}$  de profundidad) suelen aparecer arrugas más profundas (*macro-relieve*, o arrugas de más de 50  $\mu\text{m}$  de profundidad) que puede llegar a tener más de medio milímetro de profundidad: las temidas "patas de gallo". Para

la obtención de réplicas de la piel, especialmente en las zonas de la cara, es necesario seguir un protocolo estricto que incluye desde el tipo de silicona a utilizar hasta la preparación y relajación del paciente/voluntario para evitar artefactos debidos a cambios en la expresión facial. Una vez obtenidas las réplicas de la piel o improntas en silicona se procederá a una evaluación visual inicial para decidir si son o no aptas para ser incluidas en un estudio de análisis tridimensional.

#### Métodos de estudio del relieve cutáneo: perfilometría y topografía.

En décadas pasadas, en los estudios de rugosidad de superficies y entre ellos los de evaluación de la superficie cutánea se utilizaba la perfilometría 2D, inicialmente la perfilometría de contacto y posteriormente la perfilometría

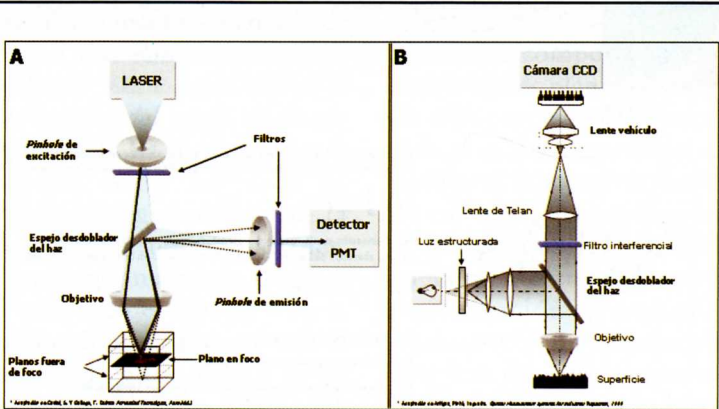
óptica. Se obtenía la información del perfil correspondiente a una única línea y en los estudios de evaluación de la rugosidad en réplicas de piel humana se intentaban trazar varias líneas con diferentes coordenadas que permitiesen minimizar errores de dirección y que facilitasen una posterior medida en otra réplica de la misma zona después de un tratamiento. En el caso de estudios de perfilometría óptica factores como el ángulo y la distancia entre el punto de iluminación y la muestra o el tipo y color de la silicona utilizada pueden influenciar gravemente en las medidas (las siliconas de color blanco reflejan mucho mejor la luz y dan mejor resultado que las de colores oscuros). Las medidas Norte-Sur se obtienen utilizando una iluminación perpendicular mientras que las efectuadas de Este a Oeste se realizan con iluminación en paralelo<sup>3,8</sup>. El hecho de que actualmente existan en el mercado modelos de perfilómetros ópticos a un precio relativamente asequible hace que estos aparatos sean muy utilizados en análisis de superficies cutáneas, sobretudo en estudios de micro-relieve. Si se intentan medir arrugas del macro-relieve y si su ángulo de inclinación es superior a los 35° (como pasa en la mayoría de los casos) los perfilómetros ópticos tienen demasiados problemas de captación ya que al perder muchos puntos de información, proporcionan medidas erróneas y/o incompletas. En estos casos la microscopia confocal y la perfilometría óptica confocal se revelan como las técnicas más adecuadas para el análisis del macro-relieve cutáneo al ser las más precisas y las de mayor poder resolutivo.

Tanto la microscopia confocal como la perfilometría óptica son técnicas de *análisis tridimensional* muy útiles en la evaluación de la topografía de la superficie cutánea<sup>9,10</sup>. Ambas técnicas, aunque utilizando metodologías diferentes, proporcionan como resultado final un mapa de información real xyz de toda la superficie analizada de la muestra, no de una o varias líneas como en el caso de la perfilometría. El conjunto final de datos obtenido del análisis permite un análisis global de toda la superficie o parcial, es decir, se puede obtener siempre la información perfilométrica de cualquier punto de la superficie analizada, tanto en la dirección xz como en la yz.

hacia la lente del objetivo (Figura 2A). A continuación, el vértice del haz ilumina un único punto de la muestra localizado a la profundidad deseada en el objeto de estudio (plano focal). El rayo reflejado por la superficie de la muestra en ese punto retorna por el objetivo y atraviesa una segunda apertura confocal o “pinhole de emisión”, situada justo delante del detector. La función de la primera ranura es reducir al máximo el diámetro del haz de luz incidente para minimizar posibles aberraciones y la de la segunda, en cambio, es evitar que la luz proveniente de zonas de fuera del plano focal llegue hasta el detector. De este modo, la luz reflejada procedente de planos que estén fuera de foco no pasará por

estudios de análisis de topografía de superficies se realiza barridos para obtener diferentes imágenes xy a lo largo del eje z. De esta manera se obtiene un conjunto de imágenes y de información de la luminosidad en x,y,z. A partir de esta información, posteriores análisis informáticos realizados con softwares específicos para el estudio tridimensional permitirán obtener cualquier información respecto a la topografía de la superficie, incluyendo perfiles y parámetros<sup>11,12</sup>. Algunos de los inconvenientes de la microscopia confocal son el precio de los equipos necesarios para el análisis, el tiempo empleado en el rastreo tridimensional de la muestra y la gran cantidad de megabytes que genera la información acumulada de cada uno de los análisis.

Recientemente se ha desarrollado un nuevo sistema óptico basado en el concepto de la microscopia confocal y utilizando la tecnología de un perfilómetro óptico: el *perfilómetro óptico confocal*<sup>13</sup>. Este sistema, aunque en un principio estaba pensado para análisis de mayor precisión (incluso a nivel de nanomedidas), es capaz de realizar el análisis topográfico tridimensional de réplicas de la piel con igual o mayor resolución que un microscopio confocal pero solucionando dos de sus mayores inconvenientes que son la gran cantidad de tiempo invertido en el análisis y la gran cantidad de memoria utilizada por la información del análisis. Al reducir considerablemente el tiempo invertido en cada análisis individual se pueden aumentar considerablemente el área de la zona de estudio de cada paciente mejorando considerablemente la estadística obtenida para cada uno de ellos. En el perfilómetro óptico



**Figura 2**  
Esquema simplificado del funcionamiento de un microscopio confocal (A) y de un perfilómetro óptico confocal (B).

El microscopio confocal (CSLM, de *Confocal Scanning Laser Microscope*) utiliza objetivos de alta apertura numérica, un láser como fuente de iluminación, fotomultiplicadores como detectores y un sistema de filtros, espejos y prismas que dirigen y separan los diferentes haces de luz. En un CSLM el haz de luz pasa a través de una primera ranura confocal o “pinhole de excitación”

la apertura confocal situada delante del detector y será rechazada. El hecho de que se ilumine y se detecte la luz de un único punto consigue minimizar los fenómenos de refracción y, consecuentemente, aumentar la resolución de la imagen. Ahora bien para obtener la imagen de toda una sección óptica o imagen confocal (2D) será preciso hacer un barrido de la muestra. De manera general, en

confocal la abertura o *pinhole* que encontraríamos en un CSLM es substituida por un patrón de luz estructurado consistente en un conjunto de rendijas paralelas y el fotodetector es reemplazado por una CCD (Figura 2B). En vez de medir la información confocal punto a punto, el perfilómetro óptico confocal capta la información de todos los puntos que se encuentran en cada línea de iluminación. Esta función es realizada por la CCD ya que al digitalizar la información correspondiente a cada píxel actúa como fotodetector y como pinhole al mismo tiempo. De esta manera, el sistema es capaz de obtener información confocal de varios miles de puntos por segundo. Al igual que en un CSLM, en un perfilómetro óptico confocal es necesario un movimiento en el eje z (que en este caso se realiza con un motor piezoeléctrico) para obtener la información tridimensional. Además del procedimiento indicado, el sistema utiliza diferentes algoritmos de procesamiento de datos para obtener imágenes mucho más contrastadas y de una resolución axial de hasta un 30% más que un sistema CSLM estándar. Como se ha comentado antes, utilizando un perfilómetro óptico confocal en lugar de un microscopio confocal además de obtener de una mayor resolución se reduce considerablemente el tiempo invertido por unidad de área analizada. Así, por ejemplo, se invirtió aproximadamente el mismo tiempo en la captación por microscopia confocal de la topografía de superficie de la imagen 1B que en la captación por perfilometría óptica confocal de la imagen 1C, con la diferencia que la primera corresponde a una superficie de 2.25 mm<sup>2</sup> y la de la

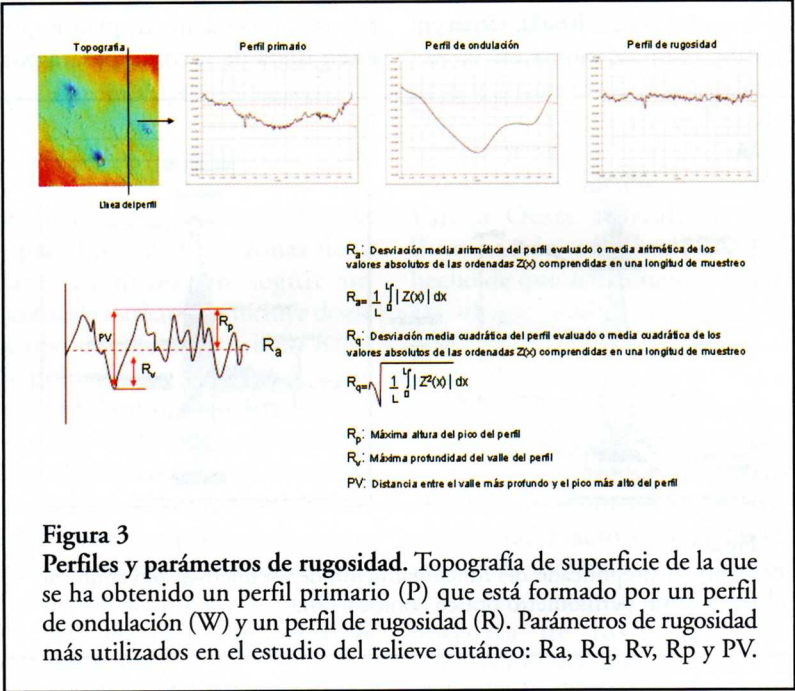
segunda a una de 12 mm<sup>2</sup>.

**Análisis cuantitativo de la topografía de superficie: parámetros de rugosidad**

El análisis de la topografía de una superficie hace referencia a las posibles desviaciones que tendría respecto a una superficie lisa y plana. De este modo en un análisis cuantitativo podemos encontrar un componente de ondulación y un componente de rugosidad (Figura 3). En el caso del estudio de la superficie de la piel en improntas de silicona debemos separar el componente de

réplicas. Actualmente ya existen sistemas de análisis topográfico tridimensional capaces de proporcionar los datos de manera que sea posible la separación mediante la aplicación de filtros selectivos para un posterior análisis independiente.

En realidad, la topografía de superficie no se puede medir directamente, ya que no es posible asignar un único valor a cada superficie. Sin embargo, si que es posible medir algunas características inherentes a la topografía de la superficie o *parámetros*: P, parámetros calculados sobre el



ondulación y quedarnos con el componente de rugosidad que es el que realmente nos interesa. La rugosidad, o irregularidades aleatorias de la superficie, suele ser inherente a la superficie de estudio mientras que la ondulación, o irregularidades más separadas, se suelen atribuir a los rasgos faciales propiamente dichos o a factores externos en la obtención de las

perfil primario; R, parámetros de rugosidad y W, parámetros de ondulación. En algunos casos se pueden encontrar representados erróneamente como parámetros R parámetros calculados sobre el perfil primario, es decir, parámetros calculados sobre un perfil al que no se le ha aplicado ningún filtro selectivo y que por tanto incluye el componente de ondulación. En

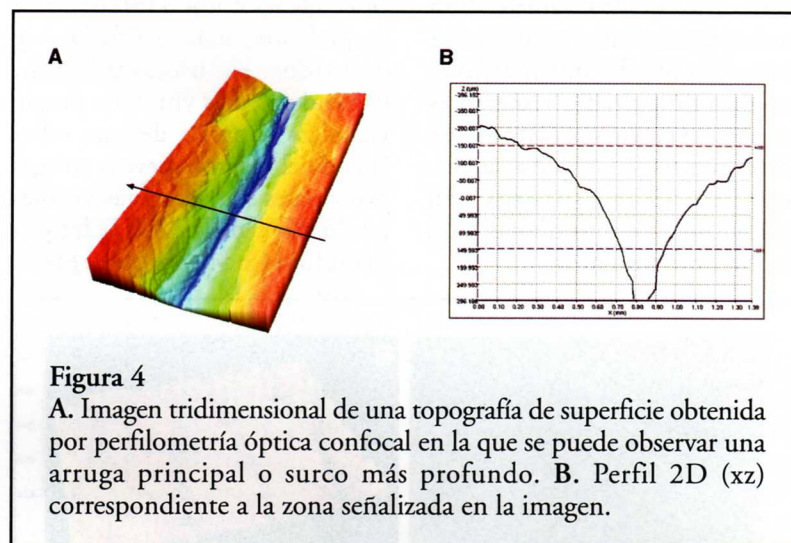
estos casos los parámetros tendrían que expresarse utilizando la nomenclatura P en lugar de ser expresados como parámetros R. Los parámetros están definidos en términos perfilométricos ya que se han ido desarrollando en función de los primeros datos obtenidos en perfilometría de contacto. De hecho, las normativas actuales que siguen los sistemas de análisis tridimensional, la ISO 4287 (UNE EN ISO 4287) y/o la DIN 4768, aún hacen referencia a descripciones exclusivamente perfilométricas tanto en la descripción y formulación de los parámetros como en los filtros de corte<sup>14</sup>.

Los parámetros más utilizados son los descritos en la ISO 4287 y de entre ellos el más estandarizado de todos el  $R_a$ , *Roughness average* o *Desviación media aritmética de la línea media del perfil evaluado* (Figura 3). El  $R_a$  es un parámetro muy útil en la detección de variaciones generales en la topografía de la superficie pero que, sin embargo, no puede detectar diferencias en el espacio y en la distribución o la presencia o ausencia de picos altos o valles profundos. El  $R_q$  o *Desviación media cuadrática del perfil*, (también conocido como RMS o *Root-Mean-Square*) tiene un mayor significado estadístico porque representa la desviación estándar de los picos del perfil. Otros parámetros que son de gran utilidad en este tipo de estudios son aquellos que sirven para determinar la profundidad y la amplitud de las arrugas de la piel. Para ello utilizaremos parámetros como el PV o la distancia "pico a valle", el  $R_p$  o máxima altura del punto máximo de rugosidad por encima de la línea media del perfil o el  $R_v$  o máxima profundidad del punto más inferior

por debajo de la línea media del perfil.

La medida tridimensional de

bidimensional (xz o yz) de cualquier punto se puede obtener en cualquier momento tal y como se puede observar en la figura 4.



superficies comporta que otros componentes planos, cilíndricos y/o esféricos del objeto en estudio puedan también contribuir en las medidas de la superficie analizada. Sin embargo, y como bien indica su nombre, la ISO 4287 está inicialmente pensada para la especificación *geométrica* de productos y no contempla la existencia de estos componentes. Dichos componentes ya han sido evaluados y descritos<sup>15</sup> y aunque la actualización de la normativa ISO aún está pendiente, algunos fabricantes de equipos de análisis tridimensional ya están incluyendo la tecnología necesaria para su evaluación y substracción mediante filtros<sup>16</sup>. Así, el análisis tridimensional de la topografía de superficies se está utilizando cada vez más en el estudio tanto del micro- como del macro-relieve cutáneo substituyendo a los métodos de análisis bidimensionales y perfilométricos. Al ser estudios realmente tridimensionales, la información perfilométrica

### Evaluación de la modificación de la topografía de superficie de la piel mediante tratamientos cosméticos

Si observamos detenidamente la piel humana en toda su extensión encontraremos un relieve muy diferente tanto en forma como en tamaño según las personas, su edad, tipo de piel y zona del cuerpo. El micro-relieve lo encontramos en todo el cuerpo y a todas las edades. Está formado por una red de triángulos y rombos, de una profundidad máxima de unas 50  $\mu\text{m}$ , salpicada de folículos pilosos y de aberturas al exterior de glándulas sebáceas (Figura 5). En cambio, el macro-relieve más estudiado es el facial y lo forman lo que solemos llamar "arrugas", con una profundidad que puede ir desde las 50 a las 500  $\mu\text{m}$ , llegando incluso a superar el milímetro en casos de edad avanzada. Las más profundas, y también más

susceptibles de ser estudiadas en tratamientos cosméticos y/o médicos son las de la frente, el contorno de los ojos y las comisuras de los labios. Son precisamente estas arrugas, las más profundas las que presentan mayores dificultades y/o errores en los estudios clásicos de perfilometría y, las que a su vez, son de gran interés en cosmetología como dianas para posibles tratamientos.

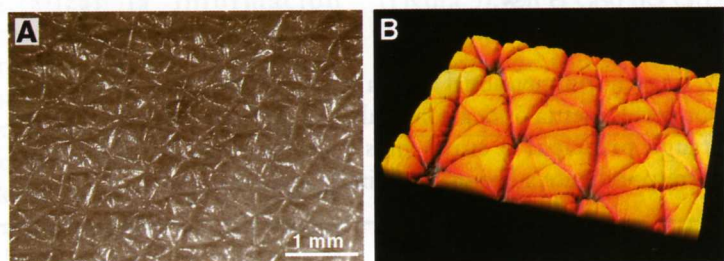
textura fina con líneas proyectadas en varias direcciones. Sin embargo, a partir de los 30-40 años la textura de la piel se vuelve más irregular en la que las líneas o los surcos de la piel son más profundos y definidos en una dirección, haciéndolos más visibles a simple vista. Es a partir de esta edad cuando el macro-relieve o arrugas principales se hacen más visibles por lo que cada vez más se buscan principios activos capaces de

es decir, presentaban alguna alteración o error que fue detectado en el exhaustivo análisis macroscópico previo al análisis topográfico.

Como resultado del estudio pudimos observar que la rugosidad general de esta zona se reducía en un 25% a las cuatro semanas de tratamiento y que la profundidad de las arrugas se reducía en un 31%. Las gráficas representadas en la figura 4C y 4D corresponden a las disminuciones de rugosidad y profundidad de las arrugas observadas en el conjunto de pacientes que van desde el 18 al 32 % de disminución de la rugosidad y del 22 al 38% en el caso de la profundidad de las arrugas.

Cabe destacar también que siempre es conveniente establecer correlaciones entre los resultados perfilométricos y las observaciones clínicas así como otras técnicas de medición del estado de la piel que se suelen estudiar en paralelo, como por ejemplo la Corneometría (mide el grado de hidratación de la piel). Aunque su efecto es pasajero, el grado de hidratación de la piel influye en gran manera en el estado de la topografía de la superficie de la piel. Así, el grado de hidratación de la piel suele afectar en gran manera a la profundidad de las arrugas y a la rugosidad general de la piel, es decir, cuanto mayor es el nivel de hidratación menor parece ser la profundidad de los surcos<sup>5,17</sup>.

En conclusión, los avances tecnológicos actuales en el análisis topográfico de superficie permiten disponer de herramientas metodológicas muy poderosas y de alta precisión, para establecer el comportamiento de la piel humana,



**Figura 5**  
A. Fotografía de una zona del micro-relieve cutáneo. B. Imagen tridimensional del micro-relieve cutáneo obtenida por perfilometría óptica confocal.

En un ensayo típico de evaluación del efecto antiarrugas en la zona periorbital de un preparado cosmético se realizan las réplicas de la zona del contorno de los ojos de los pacientes justo antes de empezar el tratamiento y a diferentes tiempos una vez iniciado. Los tiempos de estudio pueden variar bastante según la naturaleza del producto en cuestión, pero lo habitual es que la duración del estudio sea como mínimo de un mes con una toma de muestras a las dos y a las cuatro semanas del inicio. El número de pacientes a incluir en el estudio, el rango de edad y el tipo de piel puede ser variable. Hemos de tener en cuenta que la edad de los pacientes o voluntarios suele ser un factor clave en la respuesta de la piel a los productos; la piel de una persona joven, de unos 20-25 años, una

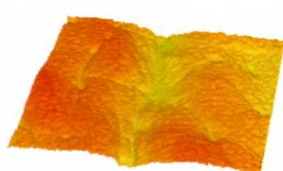
atenuar los surcos más profundos y que, por lo tanto, tendrán que ser testados en pacientes de un rango de edad adecuado (40-60 años).

Como ejemplo, en la figura 6 se observa una topografía de superficie de la zona periorbital de un mismo paciente antes (A) y después (B) de 4 semanas de tratamiento con un producto cosmético antiarrugas. Las imágenes pertenecen a un estudio típico de la aplicación de un producto cosmético en el contorno de los ojos. El grupo de pacientes estaba formado por 25 mujeres de entre 35 y 60 años que se aplicaron de manera sistemática el producto dos veces al día, aunque algunas pacientes (en concreto 3) tuvieron que ser excluidas del análisis porque las réplicas de la piel eran técnicamente inutilizables,

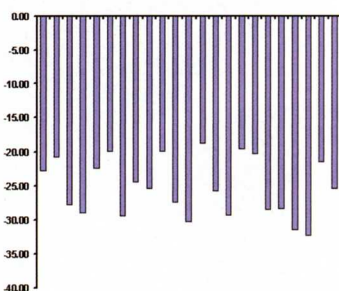
A



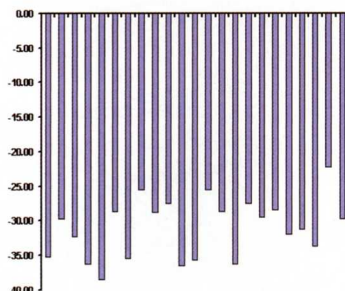
B



C

Rugosidad ( $R_q$ )

D

Profundidad de la arruga ( $R_v$ )

**Figura 6**

Imagen tridimensional obtenida por microscopia confocal de una arruga principal correspondiente al macro-relieve de la zona peri-orbital antes (A) y después de un mes de tratamiento con un producto anti-arrugas (B). Porcentajes de disminución observados en cada paciente del parámetro de rugosidad  $R_q$  (C) y de la profundidad máxima de las arrugas ( $R_v$ ) (D) después de un mes de tratamiento.

de modo no invasivo. De entre las técnicas disponibles, destacan la microscopia confocal y la perfilometría confocal, las cuales permiten analizar de modo rápido y preciso la superficie de la piel en toda su amplitud y profundidad.

## Bibliografía

1. Traikovich SS. Use of topical ascorbic acid and its effects on photodamaged skin topography. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999; 125: 1091-8.
2. Creidi P, Vienne MP, Ochonisky S, Lauze C, et al. Profilometric evaluation of photodamage after topical retinaldehyde and retinoic acid treatment. *J Am Acad Dermatol* 1998; 39: 960-5.
3. Grove GL, Grove MJ. Effects of topical retinoids on photoaged skin as measured by optical profilometry. *Methods Enzymol* 1990; 190: 360-71.

4. Grove GL, Grove MJ, Leyden JJ, Lufano L, et al. Skin replica analysis of photodamaged skin after therapy with tretinoin emollient cream. *J Am Acad Dermatol* 1991; 25: 231-7.
5. Eberlein-König B, Schafer T, Huss-Marp J, Darso U, et al. Skin surface pH, stratum corneum hydration, trans-epidermal water loss and skin roughness related to atopic eczema and skin dryness in a population of primary school children. *Acta Derm Venereol* 2000; 80: 188-91.
6. Haedersdal M, Egekvist H, Efsen J, Bjerring P. Skin pigmentation and texture changes after hair removal with the normal-mode ruby laser. *Acta Derm Venereol* 1999; 79: 465-8.
7. Fournier N, Dahan S, Barneon G, Diridollou S, et al. Nonablative remodeling: clinical, histologic, ultrasound imaging, and profilometric evaluation of a 1540 nm Er: glass laser. *Dermatol Surg* 2001; 27: 799-806.

8. Grove GL, Grove MJ, Leyden JJ. Optical profilometry: an objective method for quantification of facial wrinkles. *J Am Acad Dermatol* 1989; 21: 631-7.

9. Artigas R, Pintó A, Laguarda F. Three-dimensional micromasurement on smooth and rough surfaces with a new confocal optical profiler. *The ESO/SPIE International Symposium on Industrial Lasers & Inspection* 1999;

10. Rhouzlane A, Makki S, Millet J, Humbert P. La microscopie confocale: intérêt pour l'analyse du relief cutané. Un outil d'évaluation dermo-cosmétique". *International Journal of Cosmetic Science* 2002; 24: 349

11. Al-Nawas B, Grotz KA, Gotz H, Heinrich G, et al. Validation of three-dimensional surface characterising methods: scanning electron microscopy and confocal laser scanning microscopy. *Scanning* 2001; 23: 227-31.

12. Castel S, Gallego F. Microscopia confocal: una excelente herramienta para estudios en biomedicina y ciencias de materiales. *Ibérica: actualidad tecnológica* 2003; 84: 174-177.

13. Laguarda F, Al-Khatib I, Artigas R. Laser Profiler based on the Depth from Focus Principle. *Journal of Optics* 1998; 29: 236-240.

14. Norma Española UNE-EN ISO 4287. Especificación geométrica de productos (GPS); Calidad superficial: Método del perfil; Términos y parámetros del estado superficial (ISO 4287:1997 + Technical Corrigendum 1). 1999.

15. Udupa G, Singaperumal M, Sirohi RS, Kothiyal MP. Characterization of surface topography by confocal microscopy: II. The micro and macro surface irregularities. *Measurement Science and Technology* 2000; 315-329.

16. Laguarda F, Artigas R, Pintó A, Al-Khatib I. Micromasurements on smooth surfaces with a new Confocal Optical Profiler. In: *Intelligent Systems and Advanced Manufacturing* (Boston:1998;

17. Casadó F. Técnicas Biofísicas no invasivas para determinar la eficacia de productos antiarrugas. *Noticias de Cosmética y Perfumería* 2000; 251: 3-8