

DISEÑO DE UN BIOFILM A PARTIR DE COLÁGENO DE PIELS DE TILAPIA Y DE QUITOSANO DE CAMARÓN COMO SOPORTE PARA APLICACIONES EN INGENIERÍA DE TEJIDOS

Vanessa Zamora-Mora^{1*}, María Sibaja¹, Jose Vega-Baudrit^{1,2}

1) Laboratorio de Polímeros, Escuela de Química, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica

2) Laboratorio Nacional de Nanotecnología, San José, Costa Rica. Correo electrónico: vzamora4@gmail.com

RESUMEN

Como una iniciativa para la disminución de los desechos de la actividad acuícola y pesquera en *Costa Rica*, se ha llevado a cabo la obtención de productos de mayor valor agregado, específicamente el colágeno y quitosano respectivamente. Estos polímeros naturales, surgen como componentes promisorios en la elaboración de soportes bidimensionales para la ingeniería de tejidos, con el fin de poder sustituir los soportes sintéticos, debido a que los naturales presentan una serie de ventajas como la biodegradabilidad y biocompatibilidad además, facilitan la adhesión de la célula y mantienen la función de diferenciación.

En el presente trabajo se evaluó (i) el proceso de obtención de soportes y materiales reforzados bidimensionales, por evaporación de disolvente, (ii) las características físicas, tales como absorción de humedad, propiedades de hinchamiento y porosidad, (iii) la morfología de los soportes a través de microscopía electrónica de barrido (SEM) y por microscopía de fuerza atómica (AFM), (iv) las propiedades térmicas por medio de calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Los resultados obtenidos demostraron que los biofilm presentaron buenas características de absorción, hinchamiento y propiedades térmicas, para su posterior aplicación en Ingeniería de Tejidos.

Palabras claves: colágeno, quitosano, biomateriales, biofilm, ingeniería de tejidos.

ABSTRACT

As an initiative for the reduction of waste from aquaculture and fishing in *Costa Rica*, has been carried out to obtain higher value-added products, specifically collagen and chitosan, respectively. These natural polymers, are key components in developing promising two-dimensional biofilm for tissue engineering, in order to replace the synthetic polymers because the natural polymers have a number of advantages such as biodegradability and biocompatibility also improve the adherence cell and maintain the function of differentiation.

In this study we evaluated (i) the process of obtaining two-dimensional composite by solvent evaporation, (ii) physical characteristics such as moisture absorption, swelling properties and porosity, (iii) the morphology through scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM), (iv) the thermal properties by differential scanning calorimetry (DSC). The results showed that the biofilm has good absorption characteristics, swelling and thermal properties for later use in tissue engineering.

Keywords: collagen, chitosan, biomaterials, biofilm, tissue engineering.

1. INTRODUCCIÓN:

Los biomateriales son componentes habituales, de origen natural o sintético, empleados en los procesos de reparación, restauración o incluso sustitución de tejidos u órganos humanos que han sufrido daños considerables por causas muy diversas [1].

El estudio de los biomateriales se ha desarrollado gracias a la diversidad de materiales que permiten la preparación de implementos con aplicaciones avanzadas, entre los más destacados se encuentran los materiales poliméricos debido a que son ampliamente utilizados en la fabricación de dispositivos biomédicos, donde su éxito se debe a las enormes posibilidades de fabricarlos de muy

distintas maneras con características bien determinadas, y con facilidad de conformarlos en fibras, tejidos, películas o bloques [2].

Esta versatilidad de los materiales poliméricos, abren su campo de aplicación a campos tan importantes como lo son las aplicaciones biomédicas. Específicamente en este trabajo es de gran interés aquellos biomateriales que se emplean en la ingeniería de tejidos, los cuales deben de cumplir requisitos necesarios para su selección, entre los más importantes se encuentran: un comportamiento mecánico adecuado durante suficiente tiempo para garantizar un buen proceso de regeneración, buena compatibilidad del implante, no ser tóxico, ni carcinógeno, ser metabolizado en el organismo después de cumplir su función en el caso de los polímeros biodegradables y demostrar durabilidad [2,3].

Uno de los objetivos primordiales de la ingeniería de tejidos, es el desarrollo de materiales para lograr la reparación funcional y la reconstrucción de estructuras biológicas. En este sentido se está dedicando especial atención a la obtención y caracterización de superficies de diferentes sustratos, para su aplicación en el desarrollo de andamios tridimensionales y bidimensionales. Uno de los aspectos prioritarios es el estudio y modificación de las propiedades superficiales de los sustratos, con el fin de modular su interacción con entidades biológicas tales como macromoléculas y células, por lo que el cultivo de células *in vitro*, la arquitectura del soporte y el biomaterial empleado para la elaboración del soporte son vitales para obtener excelentes resultados.

Los soportes pueden ser desarrollados usando polímeros naturales o sintéticos. Actualmente los polímeros naturales son ampliamente usados para regeneración de órganos y tejidos dado que ellos facilitan la adhesión de la célula y mantienen la función de diferenciación. En el procedimiento de regeneración de tejido, el papel de las macromoléculas demuestra ser vital, dentro de las cuales se encuentran glicosaminoglicanos (GAG), colágeno, glicoproteínas y el quitosano que puede ser considerado como un instrumento de modulación mediado por células [4].

El colágeno es un material extracelular fabricado por los fibroblastos y es una proteína fibrosa que resulta relativamente insoluble en agua. Esta proteína estructural representa en los mamíferos cerca del 30% del total de proteínas en el organismo. Su función es mecánica y de soporte, siendo un componente importante de la matriz extracelular, se encuentra especialmente en los cartílagos, huesos y pieles [5]. Además es considerado como uno de los principales materiales para construir sustitutos artificiales para tejidos u órgano dañados [6]. Los materiales usados para la fabricación de soportes, no solamente determinan propiedades físicas como la biocompatibilidad, biodegradabilidad y estabilidad mecánica, sino también provee las señales apropiadas para procesos de crecimiento celular, guiando la formación de tejidos. Por consiguiente, el colágeno es uno de los materiales favoritos para aplicaciones industriales en la ingeniería de tejidos [7].

Asimismo, el quitosano es un polisacárido catiónico lineal compuesto por dos unidades monoméricas la D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina [8]. Es un polímero natural muy recomendado ya que posee excelentes propiedades, como biodegradabilidad, biocompatibilidad, no tóxico, buena absorción, entre otros, características que unidas a su naturaleza policationica, han estimulado su empleo en diversas aplicaciones biomédicas [9]. Una de las características más prometedoras del quitosano es su excelente habilidad para ser procesado dentro de una estructura porosa para uso en transplatación celular y regeneración de tejidos [10].

Según concuerdan *Ma et al.* [11] y *Shanmugasundaram et al.* [4] un soporte actúa como un sustrato para promover la adhesión celular, ayuda en la formación de una matriz extra celular (ECM) análoga, la cual ofrece soporte mecánico a las células y manteniendo la función diferenciada sin intervenir en la proliferación y crecimiento celular. Se han empleado diversas matrices la regeneración de tejido a partir de polímeros naturales una de las más usadas son aquellas compuestas por polímeros naturales como el colágeno, debido a que es el principal componente de la matriz extracelular, además se ha venido empleando otros materiales naturales tales como el quitosano y algunos materiales artificiales.

El colágeno y el quitosano no existen juntos como mezclas en la naturaleza, pero las propiedades específicas de cada uno, han sido empleadas para producir un material que le confiere propiedades estructurales y mecánicas únicas. Los usos de estos materiales son relativamente de bajo costo, baja contaminación de los biomateriales con propiedades específicas, con un gran potencial para el desarrollo de una nueva generación de implantes [10].

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Materiales. El quitosano fue suministrado por el Laboratorio de Polímeros (POLIUNA), *Universidad Nacional (Costa Rica)*, este quitosano fue extraído a partir de las conchas de camarón *Heterocarpus vicarius*, con un grado de desacetilación del 65% el cual fue evaluado por análisis potenciométrico, el peso molecular se determinó viscosimétricamente fue de $3,62 \times 10^5$ g/mol.

El colágeno fue extraído a partir de pieles de tilapia *Oreochromis sp* y fue suministrado por el Laboratorio de Polímeros, se determinó la temperatura de desnaturalización de acuerdo a *Nagai et al.* [12] y fue de 37°C. El ácido acético (*Aldrich*) se utilizó tal y como se recibió.

2.2 Elaboración de biofilm de colágeno y quitosano. Se preparó una disolución tanto de colágeno, como de quitosano purificado al 0,5% m/v en ácido acético con agitación moderada a temperatura ambiente. Las disoluciones desgasificadas se colocaron en moldes de vidrio y se

dejaron secar a temperatura ambiente. La cantidad apropiada de disolución por adicionar al molde de vidrio varía de acuerdo al grosor deseado.

2.3. Elaboración de biofilm del complejo colágeno-quitosano. Se siguió en forma general la metodología propuesta por *Ma et al.* [11], en la cual se prepararon las disoluciones de colágeno y de quitosano al 0,5% m/v en ácido acético. Se prepararon dos mezclas de colágeno-quitosano en las siguientes relaciones 8:2 y 2:8 y se agitó moderadamente por 20 minutos. Luego se colocó en el molde de vidrio. Se siguió la metodología de secado para las películas al 100% de colágeno y quitosano.

2.4. Estudios morfológicos por medio de microscopía electrónica de barrido y Microscopía de Fuerza Atómica. El análisis morfológico de los soportes se realizó por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM) y por microscopía de fuerza atómica (AFM). Para el AFM todos los ensayos se realizaron en el modo discontinuo y con una escala de 50 μm para el escaneo de las muestras.

2.5. Absorción de humedad de los biofilm. El análisis se realizó según el DIN 50008 [13]. El análisis se efectuó a las películas del complejo colágeno-quitosano en sus dos relaciones, así como a las películas al 100% de composición de ambos biomateriales. En el análisis se empleó cinco humedades distintas con los siguientes valores: 40, 55, 70, 85 y 100%. Las muestras se cortaron en tamaños de 1 x 1 cm y el análisis se realizó por triplicado. Se determinó la masa de muestra inicial y se introdujo en los distintos recipientes de atmósferas relativas durante 24 horas. Al finalizar el ensayo se determinó la masa de las muestras y se calculó el porcentaje de humedad ganada mediante la fórmula:

$$\% \text{ humedad ganada} = \frac{M_{\text{muestra F}} - M_{\text{muestra I}}}{M_{\text{muestra I}}} 100 \quad (1)$$

Donde $M_{\text{muestra F}}$ es la masa de la muestra final, después de las 24 horas, y $M_{\text{muestra I}}$ es la masa de muestra inicial, a las 0 horas.

2.6. Análisis de hinchamiento. Se ejecutó la prueba de hinchamiento siguiendo la metodología empleada por *Ma et al.* [11] para la cual se cortaron las muestras en tamaños de 1 x 1 cm, se colocaron en 100 mL de agua destilada en un recipiente plástico. Se pesó las películas secas (M_{seca}) y posteriormente se introdujeron las películas por un período de 24 h a temperatura ambiente, y finalmente se pesaron las muestras húmedas ($M_{\text{húmeda}}$).

El porcentaje de hinchamiento fue calculado de acuerdo a la fórmula:

$$\% \text{ hinchamiento} = \frac{M_{\text{húmeda}} - M_{\text{seca}}}{M_{\text{seca}}} 100 \quad (2)$$

2.7. Análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los soportes secos fueron evaluados en un *Perkin Elmer, Pyres DSC 6*, desde los 25 hasta los 200°C a una velocidad de calentamiento de 5 grado/min, en una atmósfera inerte de gas nitrógeno como gas de purga.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Biofilm de quitosano-colágeno. Al elaborar las películas de colágeno y de quitosano y sus respectivos materiales reforzados, se tomaron en cuenta factores importantes como la forma de secado de los biopolímeros con el fin de preservar las características atribuidas a cada uno de ellos. El grosor de los diferentes biofilm es de aproximadamente 0,6 μm , el control del grosor se logró de acuerdo a la cantidad del polímero que se usó durante su preparación.

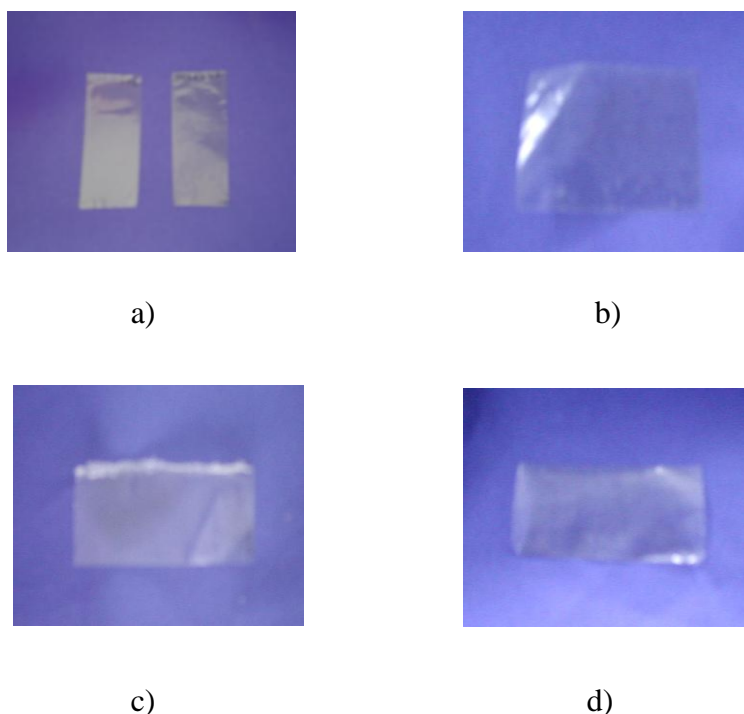
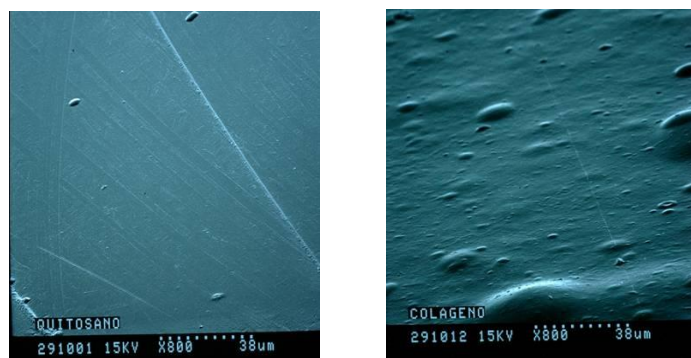


Figura 1. Biofilm de los biopolímeros colágeno y quitosano: a) quitosano al 100% de composición, b) colágeno al 100% de composición, c) material reforzado 2:8 colágeno-quitosano y d) material reforzado 8:2 colágeno-quitosano.

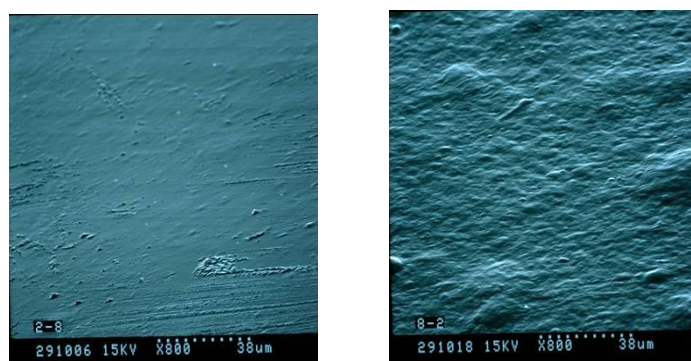
En cuanto a la apariencia física de dichas películas, como se observa en la figura 1, se observaron diferencias poco significantes, sin embargo, en cuanto a las películas de quitosano, éstas poseen un tenue color amarillo y las de colágeno tienden a ser más blanquecinas que las de quitosano.

3.2. Análisis morfológico por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía de fuerza atómica (AFM). Mediante microscopía electrónica de barrido se analizó la morfología de los cuatro soportes elaborados, los cuales presentaron homogeneidad tanto a escala

macroscópica como microscópica, como se puede evidenciar en la figura 2 y 3. Asimismo, cabe destacar que en los materiales reforzados realizados no se observan fases que indiquen la separación entre los biopolímeros empleados. La elección del colágeno como del quitosano, hace que la mezcla elaborada sea totalmente apta debido a que ambos biopolímeros son de carácter hidrófilo, es decir, que se pueden disolver en soluciones acuosas, este factor resulta de gran importancia debido que no entorpece la miscibilidad de los biopolímeros en las mezclas elaboradas.



a) b)
Figura 2. SEM de los biofilms: a) quitosano, b) colágeno (X800).



a) b)
Figura 3. SEM de los biofilms: a) material reforzado 2:8 colágeno-quitosano y b) material reforzado 8:2 colágeno-quitosano (X800).

En la Figura 2, se evidencia como la superficie del soporte de quitosano resultó con una morfología mucho más lisa que el soporte de colágeno, por lo tanto en el material reforzado, figura 3, en el cual se incrementa la concentración de colágeno (material reforzado 8:2 colágeno-quitosano) se observa que hay un incremento en la rugosidad del mismo.

En la Figura 4 se obtiene una vista transversal tanto de los soportes al 100% de composición, como de los dos materiales reforzados, se observan diferencias principalmente en la compactación de los soportes. En cuanto al soporte de quitosano se observa como está conformado por pequeñas láminas superpuestas, en cambio en el soporte de colágeno se da una mayor compactación del soporte mostrándose bastante denso.

Esta tendencia en la forma de cómo se compactan los soportes, influye directamente en las propiedades de absorción de humedad e hinchamiento. La alta compactación que se observa, promueve que los grupo O-H, formen enlaces de hidrógeno intramoleculares, por lo tanto pierde su capacidad de absorción con las moléculas de agua del medio. Asimismo, como se observa en la Figura 4, el soporte de quitosano, posee más espacios libres y, por lo tanto, una menor compactación, incrementando de acuerdo a esta morfología su propiedad de hinchamiento en comparación con los demás soportes.

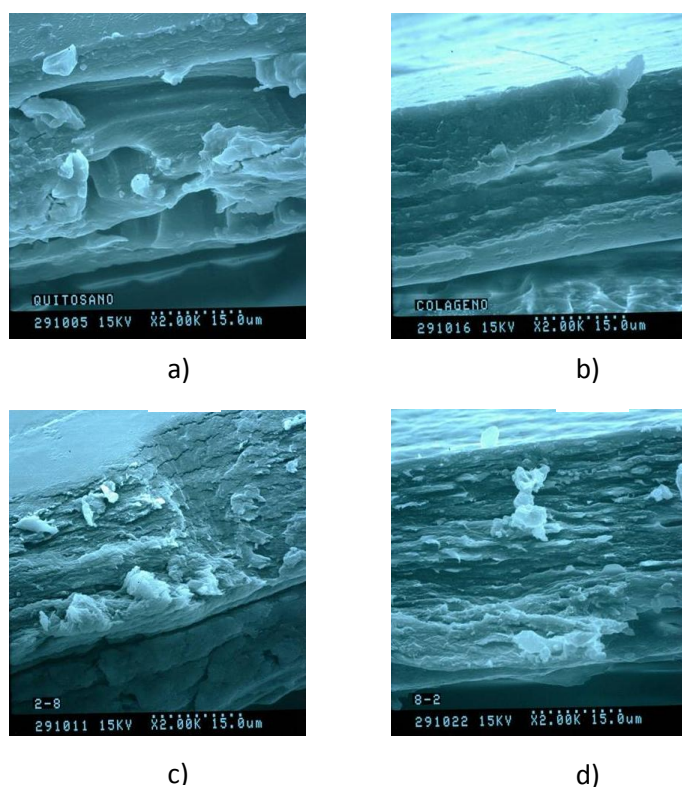
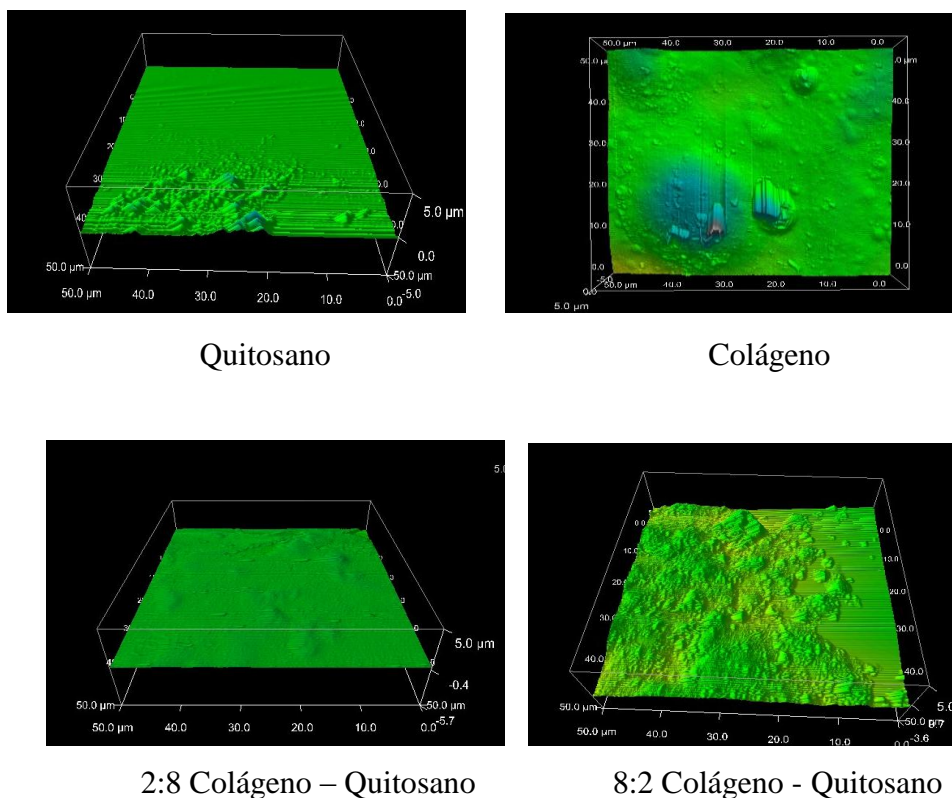


Figura 4. SEM vista transversal de los soportes: a) quitosano, b) colágeno, c) material reforzado 2:8 colágeno-quitosano y d) material reforzado 8:2 colágeno-quitosano. (X2000).

El análisis superficial de los soportes por medio de la microscopía de fuerza atómica (AFM), se obtuvieron imágenes sin evidenciar alguna porosidad en las mismas, afirmando la poca porosidad que presentaron los cuatro soportes, de acuerdo a los resultados del SEM.



2:8 Colágeno – Qitosano

8:2 Colágeno - Qitosano

Figura 5. Estudio morfológico de los soportes por medio de AFM.

En la topografía de las muestras, se encontró variaciones entre las superficies de los soportes, mostrando especialmente en el soporte de quitosano y en el material reforzado de mayor relación de éste polímero natural, una superficie bastante lisa en comparación con los soportes de colágeno y del material reforzado en su mayor relación.

Al considerar los resultados obtenidos en la microscopía electrónica de barrido (SEM), se considera que las variaciones en las superficies de los soportes se pueden atribuir a la diferencia en la compactación de los biopolímeros, debido a que el quitosano presentó un orden laminado en la formación del soporte, en oposición al colágeno.

3.3 Absorción de humedad en atmósferas con humedades relativas. La capacidad de absorción de humedad de los biofilms elaborados, depende significativamente de la estructura de cada uno de los materiales, por esta razón al observar la Figura 6, se observa una similitud bastante importante a bajos porcentajes de humedades relativas, pero la principal diferencia se da al 100% de humedad, en el cual las películas de quitosano absorben más que las de colágeno, debido a la presencia de grupos O-H libres los cuales interactúan con la molécula de agua. Por el contrario, el colágeno en su estructura está constituido por grupos O-H. Sin embargo, debido a las interacciones que presenta la fibra a lo largo de su estructura, estos grupos hidrófilos están formando enlaces de hidrógeno intramoleculares, lo que se ve reflejado en su menor capacidad de absorción de humedad.

En cuanto a los biofilms de los dos materiales reforzados, se observan que se encuentran entre los parámetros, que poseen cada uno de los biopolímeros empleados al 100% de su composición, siendo en el caso de 2:8 colágeno-quitosano, más cercano a las características del quitosano y el de 8:2 colágeno-quitosano con mayor tendencia hacia las características del colágeno.

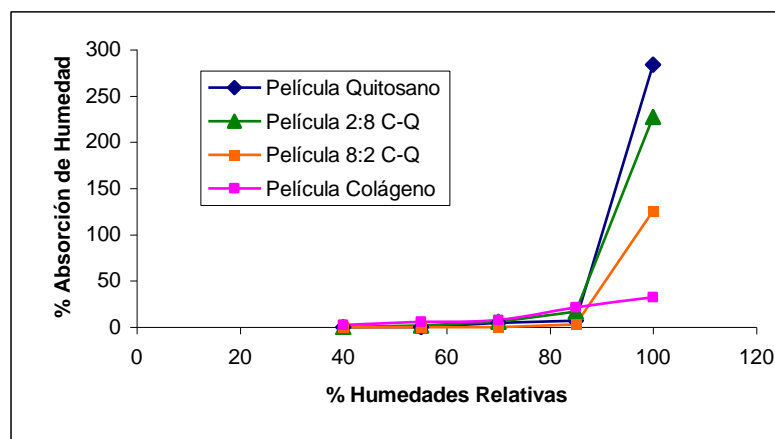


Figura 6. Absorción de humedad a diferentes atmósferas relativas de las películas de colágeno y quitosano al 100% y sus respectivos materiales reforzados.

Al considerar el tratamiento químico para la obtención de quitosano a partir de la quitina, se realiza un fuerte tratamiento con hidróxido de sodio, lo cual genera cierta cantidad de cloruro de sodio en el producto, este hecho ocurre a raíz del tratamiento inicial de la quitina con ácido, lo cual puede darse por la falta de neutralización del producto, esto conlleva que al continuar el proceso con NaOH, va a generar cantidades de cloruro de sodio en el producto final. Este cloruro de sodio, según estudios de *Phongying et al.* [14], produce obstrucción entre las interacciones de las cadenas poliméricas cuando se elabora el soporte, impidiendo de esta forma los enlaces intramoleculares, lo cual va a generar una mayor sensibilidad del polímero al medio donde se encuentre, al tener grupos como O-H y NH₂ libres, aumentando de acuerdo a *Phongying et al.* [14] propiedades como la absorción de humedad, hinchamiento y solubilidad.

3.4 Propiedades de hinchamiento. La facilidad de un biofilm para absorber agua es un aspecto muy importante al evaluar su propiedad para ingeniería de tejidos, debido a que demuestra la capacidad de retención de agua, así como su estabilidad durante el crecimiento celular. Esta propiedad hace alusión al agua presente en los poros pequeños y la que está unida a las cadenas hidrófilas del polímero [15]. Por esta razón, al determinar dicha propiedad se realizó un leve proceso de secado después de las 24 horas sumergida la muestra, por medio de un papel de filtro. Con este proceso se procuró eliminar el agua presente en los poros más grandes, debido a que ésta no contribuye a la capacidad de absorción total de la película.

Los resultados para la prueba de hinchamiento el promedio para la muestra del soporte de quitosano, fue de 132 veces el peso inicial de las películas, para el caso del material reforzado 2:8 colágeno–quitosano fue de 111, el material reforzado 8:2 colágeno – quitosano dio 86 veces y para el colágeno al 100% de composición obtuvo 82 veces su peso inicial, valores totalmente aceptables de acuerdo a *Ma et al.* [11] quienes establecen que una capacidad de hinchamiento 80 veces mayor a su peso inicial, es suficiente para poder ser aplicado en ingeniería de tejidos. Por lo que estos datos refuerzan también la tendencia, de que el quitosano posee más grupos hidrófilos libres capaces de formar enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua del medio, así como se vio en su capacidad de absorción de humedad en atmósferas relativas.

En la Figura 7, se observan los soportes después de las 24 horas, notándose una diferencia significativa en su apariencia física, al obtener en el caso de quitosano un hinchamiento muy superior al que presentó el colágeno. Los materiales reforzados presentaron ésta tendencia entre los biopolímeros empleados.

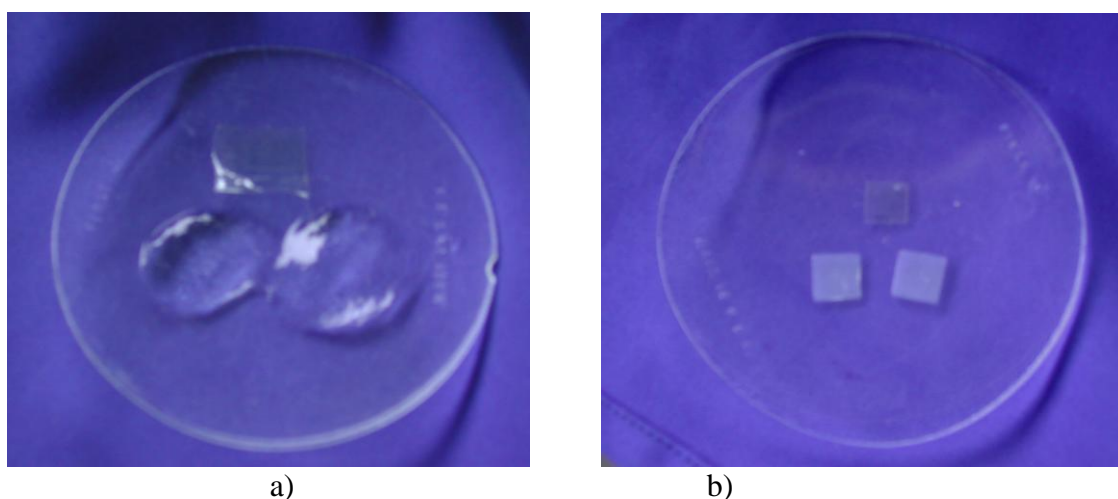


Figura 7. Resultado de la prueba de hinchamiento, 24 horas después de a) quitosano camello, b) colágeno de piel de tilapia.

Al darse un proceso de hinchamiento de los biofilmes, resulta beneficioso el uso de los mismos, debido a que demuestra su poder para absorber agua y esto provoca un cambio morfológico al darse la expansión y una tensión en las cadenas poliméricas haciendo posible que el material sea estable en tamaño y forma durante el cultivo celular [15]. Sin embargo, esta estabilidad decrece de acuerdo a los altos valores de hinchamiento, debido a que las muestras pueden llegar a formar un hidrogel, como se observó en el caso de los soportes de quitosano y del material reforzado en mayor proporción de dicho biopolímero, provocando casi la degradación del polímero en tan solo 24 horas de exposición en medios acuosos.

Respecto al quitosano, se considera que su comportamiento es dependiente del pH de la

solución empleada para dicha prueba y del grado de ionización del grupo amino del quitosano [16]. Al mismo tiempo, es importante considerar probable que las películas de quitosano posean una mayor afinidad a las moléculas de agua, que en su presentación como polvo, debido a que la molécula de quitosano en la película está protonada, consecuentemente el soporte va ser más hidrófilo que el polvo, además, de que la protonación de las moléculas, va a causar repulsión entre ellas mismas, disminuyendo las interacciones secundarias, tipo enlaces de hidrógeno intramoleculares, logrando por consiguiente espacio vacíos en la red polimérica y en los cuales puede penetrar la molécula de agua [17]. Es importante considerar que su capacidad de hinchamiento se puede regular por medio de procesos de entrecruzamiento, debido a la disminución de grupos aminos libres capaces de formar enlaces de hidrógeno.

3.5 Calorimetría diferencial de barrido. En el análisis de DSC de los diferentes biofilms, que se muestra en la Figura 8, se da una transición de tipo endotérmico, en el intervalo de temperaturas entre los 30-160°C, la cual se le atribuye a deshidratación por la pérdida de las uniones con las moléculas de agua. La entalpía de deshidratación de los diferentes soportes, se observa en la Tabla 1, mostrando el soporte de quitosano la entalpía mayor respecto a los demás, lo cual indica que se suministró una energía mayor para eliminar el agua presente en el soporte. Este hecho confirma como el soporte de quitosano posee una mayor capacidad de absorción de las moléculas de agua a su estructura, obteniendo esta tendencia en análisis como lo fue la capacidad de absorción en humedades relativas e hinchamiento. Los demás biofilms presentan una tendencia decreciente respecto al ΔH , del soporte del quitosano, con la excepción de soporte 8:2 colágeno-quitosano.

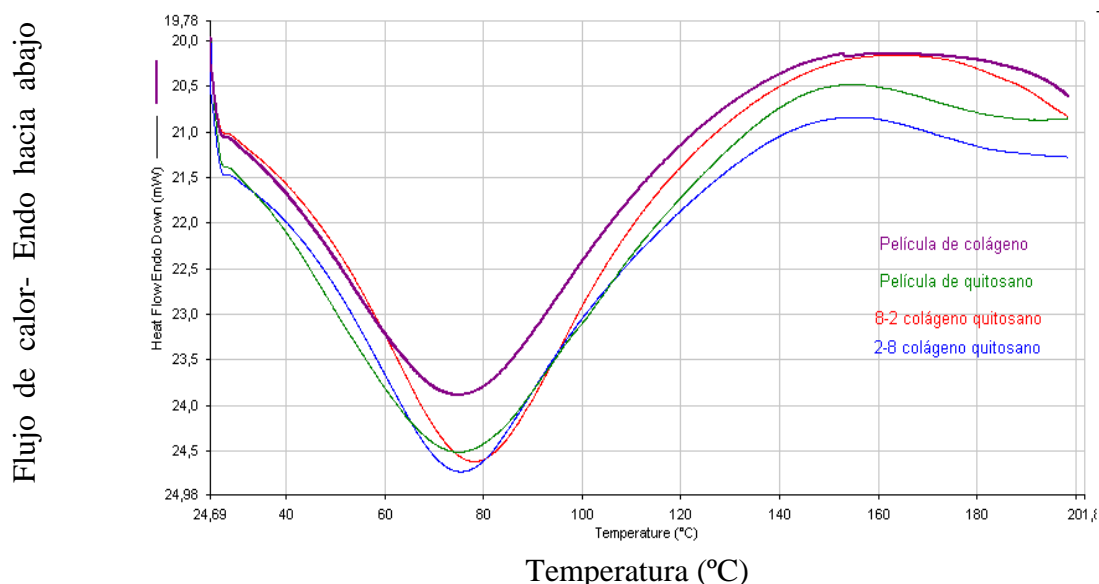


Figura 8. Curvas calorimétricas (DSC) de los soportes de colágeno y quitosano al 100% de composición y de sus respectivos materiales reforzados en relación 8:2 y 2:8.

Al final de la curva de DSC de los soportes se evidencia otro proceso térmico que da inicio, a partir de los 170 °C el cual se le atribuye a la descomposición de los biopolímeros a temperaturas mayores que las del presente análisis.

Tabla 1. ΔH de deshidratación para los distintos soportes.

<i>Soporte</i>	<i>ΔH (J/g) ($\pm 0,001$)</i>
Colágeno	291,176
8:2 Colágeno-Quitosano	328,037
2:8 Colágeno-Quitosano	309,563
Quitosano	345,603

Estudios realizados por *Giraud-Guille et al.* [18], consideran que el colágeno de pez, al poseer menor cantidad de prolina e hidroxiprolina, en comparación con el colágeno bovino, genera una menor estabilidad térmica.

4. CONCLUSIONES

La combinación del colágeno, el principal componente de la matriz extracelular y del quitosano, un polielectrolito que favorece la adhesión celular, resulta un material reforzado con buenas características de absorción, hinchamiento y propiedades térmicas, para su posterior aplicación en ingeniería de tejidos.

Los dos biofilm elaborados a partir de colágeno y quitosano, no presentaron heterogeneidad en las disoluciones, ni separación de fases en los biofilmes, como se mostró en los estudios morfológicos.

La elaboración de soportes bidimensionales, generó soportes con una alta compactación entre las cadenas poliméricas, como se observó en el SEM, lo cual repercute en forma directa en las propiedades de absorción e hinchamiento, debido a que ésta disminuye, por la escasa posibilidad de interacción con las moléculas de agua del medio y por un aumento en los enlaces de hidrógeno intramoleculares.

Los estudios morfológicos de los soportes (AFM y SEM), presentaron concordancia entre los mismo, mostrando superficies bastantes lisas las que poseen mayor cantidad de quitosano y decreciendo conforme disminuye la relación del mismo.

Se obtuvieron biofilmes compuestos de colágeno-quitosano 8:2 y 2:8 las que fueron sometidas a evaluación térmica, presentando valores altos de degradación, así como de las entalpías de deshidratación de los soportes.

La capacidad de absorción de humedad, así como la de hinchamiento, se ven influenciadas por factores tales como la compactación de las cadenas poliméricas en el soporte, la posible interacción intramolecular, grado de desacetilación y la presencia de cloruro de sodio en el quitosano.

Los biofilms preparados a partir de polímeros naturales colágeno y quitosano presentan características promisorias para estudios en el campo de la ingeniería de tejidos.

Agradecimientos. Al Laboratorio de Polímeros de la Universidad Nacional, Costa Rica por donar el quitosano y el colágeno. Al Grupo ACI S.A por donar las pieles de tilapia para la extracción de colágeno. Al Consejo Nacional de Rectores (CONARE) de *Costa Rica* y a la Escuela de Química de la *Universidad Nacional (Costa Rica)* por ayudar con el financiamiento de este trabajo

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Sastre R, de Aza S, San Román J, 2004. Biomateriales. En CYTED. *Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo*. Editorial FAENZA EDITRICE IBERICA s.l.
- [2] Vallet Regí M. *Biomateriales para sustitución y reparación de tejidos*. Informe científico. Madrid, España. Universidad de Complutense. 2006.
- [3] Armelin E. *Síntesis y caracterización de nuevas poliesteramidas: estudio de sus propiedades*. Tesis Doctoral. Barcelona, España. Universidad Politécnica de Cataluña, 2002.
- [4] Shanmugasundaram N, Ravichandran P, Neelakanta Reddy P, Ramamurty N, Pal S, Panduranga Rao K, *Biomaterials*, **22**, 1943 (2001)
- [5] Bernales D, Caride F, Lewis A, Martín L, *Revista Cubana Investigaciones Biomédicas*. Sociedad Odontológica de La Plata, Argentina, **23**, 65 (2004)
- [6] Wang X.H, Li D.P, Wang W.J, Feng Q.L, Cui F.Z, Xu Y.X, Song X.H, Mark van der Werf, *Biomaterials*, **24**, 3213 (2003)
- [7] Song E, Yeon Kimb S, Chunc T, Byunc H, Moo Leea Y, *Biomaterials*, **27**, 2951 (2006)
- [8] Berger J, Reist M, Chenite A, Felt-Baeyens O, Mayer J.M, Gurny R, *INT.J.PH.SCI*, **288**, 17 (2005)
- [9] Gupta K.C, Ravi Kumar M.N.V, *J.M.S.—Rev. Macromol. Chem. Phys.*, **C4(4)**, 273 (2000)
- [10] Sionkowska A, Wisniewski M, Skopinska J, Kennedy CJ, Wess TJ, *Biomateriales*, (2003)
- [11] Ma L, Gao C, Mao Z, Zhou J, Shen J, Hu X, Han C, *Biomaterials*, **24**, 4833 (2003)
- [12] Nagai T, Ogawa T, Nakamura T, Ito T, Nakagawa H, Fujiki K, Nakao M, Yano T, *J Sci Food Agr*, **79**, 855 (1999)
- [13] DIN 50008: Konstantklimate über waessrigen Loseungen. Deutsches Institut für Normung. Alemania.
- [14] Phongying S, Aiba S, Chirachanchai S, *Polymer*, **48**, 393 (2007)
- [15] Ma J, Wang H, He B, Chen J, *Biomaterials*, **22**, 331 (2001)
- [16] Adekogbe I, Ghanem A, *Biomaterials*, **26**, 7241 (2005)
- [17] Fernández M, Heinämäki J, Krogars K, Jörgensen A.C, Karjalainen M, Iraizoz A, Yliruusi J, *AAPS PharmSciTech*, **5**, 1 (2004)
- [18] Giraud-Guille M.M, Besseau L, Chopin C, Durand P, Herbage D, *Biomaterials*, **21**, 899 (2000)