

SINTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES DE QUITOSANO OBTENIDO A PARTIR DEL CAMARÓN LANGOSTINO (*Pleuroncodes planipes*) CON POTENCIALES APLICACIONES BIOMEDICAS

Andrés Sánchez B¹, María Sibaja B², José Vega-Baudrit³, Sergio Madrigal C²

- 1) Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica
- 2) Laboratorio de Polímeros-POLIUNA, Escuela de Química, Universidad Nacional, Apartado 86-3000 Heredia., Heredia, Costa Rica. Correo electrónico: maria.sibaja@gmail.com
- 3) Laboratorio de Nanotecnología-LANOTEC-CENAT, San José, Costa Rica

Recibido: 8 Enero 2007; Aceptado: Mayo 2007

RESUMEN

Actualmente el uso de biomateriales para el tratamiento de heridas es un área de interés para los investigadores y personal médico, a tal punto que la ingeniería de tejidos busca soluciones mediante la utilización de estos productos en interesantes aplicaciones en cirugía y reparación de tejidos dañados.

El objetivo general de este trabajo es caracterizar física y químicamente el quitosano que proviene de los desechos de la industrialización del camarón langostino *Pleuroncodes planipes*. Posteriormente, obtener hidrogeles de quitosano entrecruzados con agentes químicos (glutaraldehído y glioxal) y caracterizarlos física y químicamente. La importancia de esta investigación radica en el hecho de que permite proporcionar información en cuanto a la potencial utilización de soportes de quitosano para lograr una mayor eficiencia en la producción de células epidérmicas en futuras aplicaciones biomédicas.

Con los resultados obtenidos se determinó que el hidrogel de quitosano entrecruzado con glioxal al 20%, posee las mejores condiciones para ser empleado, en investigaciones posteriores, como soporte para el crecimiento de fibroblastos humanos.

Palabras clave: desechos marinos, hidrogel, quitina, quitosano, biomaterial, biomedicina.

ABSTRACT

Nowadays, the wound treatment is an active area, with many interest for scientists and medical personal, at this point tissue engineering has searching solutions using biomedical products with low cost, obtain from biomaterials with applications in surgery and repair damage tissue.

Main objective of this research is determining the physical and chemical characteristics of chitosan, obtained from waste marine product of shrimp shell *Pleuroncodes planipes*, with the purpose to obtain chitosan hydrogels crosslinked with chemical agents (glutaraldehyde and glyoxal) and determined their physical, chemical and morphological characteristics. The relevance of this research is to give information of the potential use of chitosan scaffolds to improve epidermal cell growth for the production of skin substitutes, in future biomedical applications.

The hydrogel with the best characteristics for future application in tissue engineering, as scaffolding material for the growth of human fibroblast is the chitosan hydrogel cross linked with 20% v/v of glyoxal.

Palabras clave: marine waste, hydrogel, quitina, chitosan, biomaterial, biomedicine.

1. INTRODUCCIÓN

La estructura molecular de la quitina (véase la Figura 1) presenta similitudes con la de la celulosa; la diferencia entre sus cadenas radica en el segundo carbono, el cual presenta un grupo acetamida en la quitina y un grupo hidroxilo en la celulosa (Abram, 2004). Básicamente la quitina es un polímero de cadena lineal formado por poli[β -(1-4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glucopiranosas], con un peso molecular alto (Kato et al. 2003).

Por otra parte, el quitosano (Figura 2) es el producto parcialmente desacetilado de la quitina. 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-acetil-D-glucosamina) (Sastre et al., 2004); presenta una configuración helicoidal tridimensional estabilizada mediante de enlaces de hidrógeno entre los monómeros que lo forman (Andradel et al., 2003).

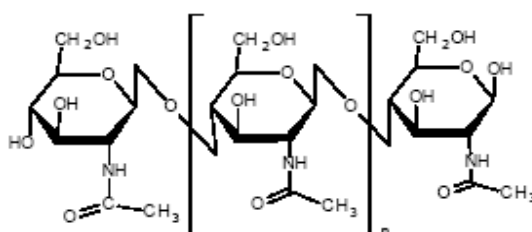


Figura 1. Estructura molecular de la quitina.

El quitosano presenta un potencial e interesante valor económico, debido a sus versátiles actividades biológicas y aplicaciones químicas (Gagne y Simpson, 1993; Brine y Austin, 1981), el quitosano es biodegradable, biocompatible, pues no se produce respuesta del sistema inmune y no tóxico, características que unidas a su naturaleza policationica, han estimulado su empleo en diversas aplicaciones biomédicas (Dhanikula y Panchagnula, 2004).

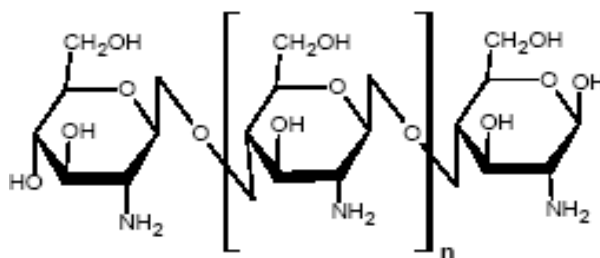


Figura 2. Estructura molecular del quitosano.

La capacidad del quitosano de formar películas o soportes ha permitido su aplicación dentro de los campos de ingeniería de tejidos y liberación de drogas, debido tanto a sus propiedades mecánicas como a su baja tasa de biodegradación (Rojas et al. 2004). Los soportes de quitosano pueden servir para mantener, reforzar y en algunos casos organizar la regeneración tisular; como matriz puede ser utilizada para liberar materiales bioactivos o influenciar directamente el crecimiento celular. En aplicaciones que involucran cultivo celular se requiere la incorporación de matrices poliméricas biodegradables, las cuales deben contar con una microestructura porosa y compatibilidad con las células en crecimiento (Roh y Kwon, 2002).

Por otra parte, se ha determinado que las unidades estructurales del quitosano, la glucosamina y la N-acetilglucosamina, están presentes en diferentes glicosaminoglicanos (GAG), los cuales son heteropolisacáridos lineales y aniónicos presentes en las matrices extracelulares de los tejidos humanos. Normalmente los GAG se encuentran unidos covalentemente a proteínas centrales y forman los proteoglicanos, los cuales tienen la función de organizar y dar funcionamiento adecuado a la matriz extracelular (Abram, 2004). Debido a que el quitosano presenta un carácter catiónico puede mantener una carga positiva a pH ácido, confiriéndole la capacidad de interactuar con las superficies celulares y proteínas plasmáticas, combinando interacciones específicas tipo GAG con otras inespecíficas asociadas a su carga.

Investigaciones llevadas a cabo por Saintigny et al. (1993) los cuales utilizaron sustituyentes dérmicos obtenidos a partir de copolímeros de quitosano-colágeno, determinaron que la adición de quitosano aumenta la adhesión celular, favoreciendo la proliferación de

fibroblastos y queratinocitos; sin causar respuesta inmune y permitiendo una vascularización y colonización adecuada de fibroblastos, obteniéndose así una matriz organizada con poca formación de granulación y tejido cicatrizado.

Estudios clínicos realizados por *Damour et al.* (1994), utilizando sustratos dérmicos de quitosano-colágeno-glicosaminoglicanos (GAG), mostraron resultados prometedores en tejidos quemados, sin presentar rechazo en ratas y humanos. Este sustrato estimuló la vascularización y la colonización del tejido quemado por parte de los fibroblastos. Los resultados obtenidos tanto “*in vitro*” como “*in vivo*” indicaron la formación de una epidermis continua y diferenciada la cual presentó adherencia con el área de la herida a los 15 días. Estos estudios se encuentran entre las aplicaciones más avanzadas utilizando quitosano como base estructural para la reparación de heridas y tejidos.

Para comprobar la afinidad de los fibroblastos con el quitosano *Chuang et al.* (1999) determinaron la interacción de la línea de fibroblastos L-929 con hidrogeles de quitosano-polialcohol vinílico (PVA), los cuales favorecieron la adhesión y crecimiento celular “*in vitro*”, con una proliferación considerable y estimulación de la respuesta celular. Este estudio, en conjunto con los mencionados anteriormente, ilustran que mediante la incorporación de aditivos químicos, las propiedades de los hidrogeles de quitosano en presencia de fibroblastos pueden ser suprimidas o favorecidas dependiendo del aditivo utilizado.

Los hidrogeles como soportes para ingeniería de tejidos, actúan como guía para el desarrollo de tejidos “*in vitro*” e “*in vivo*”, los polímeros utilizados para la fabricación de los soportes deben asemejar las matrices extracelulares presentes en los tejidos; es por esta razón que los hidrogeles han sido sumamente investigados para este tipo de aplicación, específicamente para reemplazo de tejido blando, ya que los hidrogeles presentan la capacidad de retener agua en su estructura polimérica de la misma forma en que retienen proteínas bioactivas. Los hidrogeles usados en ingeniería de tejidos presentan poros, los cuales tienen la funcionalidad de permitir que las células vivas se acomoden adecuadamente o se diseñan para que se disuelvan o degraden, liberando factores de crecimiento y por ende creando poros en los cuales las células puedan penetrar y proliferar.

Las ventajas que presentan los hidrogeles es su capacidad de brindar un ambiente favorable para las proteínas, la capacidad de moldearse en diferentes formas y su alta

biocompatibilidad; sin embargo, presentan limitaciones como baja resistencia mecánica y dificultad para esterilizar.

Por otra parte, los hidrogeles obtenidos a partir de quitosano presentan una buena biocompatibilidad, baja degradación y un procesamiento sumamente fácil; la capacidad de estos hidrogeles de hincharse y deshidratarse depende de la composición y medio en el cual se obtuvo el gel (Abram, 2004).

Según Berger *et al.* (2004), los hidrogeles de quitosano entrecruzados se clasifican como hidrogeles iónicos y covalentes. Estos últimos se dividen en tres grupos: quitosano entrecruzado consigo mismo, redes poliméricas híbridas y redes de polímeros interpenetrados. El entrecruzamiento involucra naturalmente dos unidades estructurales, las cuales pueden o no pertenecer a la misma cadena polimérica. Las principales interacciones que se presentan en este tipo de hidrogel corresponden a enlaces covalentes; pero incluso se pueden presentar otras interacciones como enlaces de hidrógeno e interacciones hidrófobas, las cuales se forman entre unidades acetiladas del quitosano, como se observa en la Figura 3. No obstante entre mayor sea el grado de entrecruzamiento tienden a predominar los enlaces covalentes. Entre los agentes entrecruzantes más empleados se encuentran los dialdehídos como el glioxal y glutaraldehído. La reacción se da entre el grupo aldehído que forma un enlace imina covalente con los grupos amino primarios del quitosano, debido a la resonancia establecida con enlaces dobles adyacentes vía reacción de Schiff (Abram, 2004).



Figura 3. Hidrogel de quitosano entrecruzado covalentemente. Fuente: Berger *et al.*, 2004.

Según Esquivel (2005) las aminas reaccionan con compuestos carbonílicos por medio de una adición nucleofílica. Si la amina es primaria el producto de adición final se deshidrata para formar una imina. Los dialdehídos permiten que la reacción se produzca directamente en un medio acuoso sin necesidad de moléculas auxiliares (reductores) que puedan disminuir su

biocompatibilidad (Figura 4); sin embargo, una desventaja de la utilización de estos compuestos es su toxicidad.

Además de los entrecruzantes dialdehídos se han utilizado compuestos como ácido oxálico y genipita, los cuales exhiben mecanismos de entrecruzamiento directos. Por otra parte, se utilizan polímeros biocompatibles solubles en agua, que permitan el enlace covalente, tales como polietilenglicol (PEG), diacrilato y dialdehídos derivados de PEG.

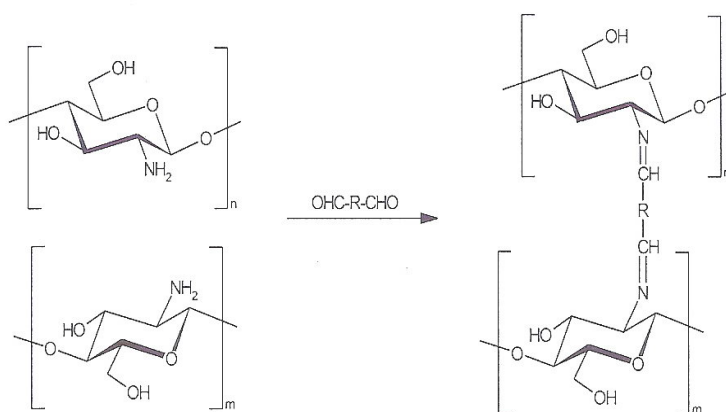


Figura 4. Entrecruzamiento de las cadenas de quitosano con un agente químico (dialdehído).

Según *Gonçalves et al.* (2005) el grado de entrecruzamiento es el principal parámetro que influencia en las propiedades de resistencia mecánica, hinchamiento y difusión, además de brindar una estructura porosa. Esta se encuentra influenciada por ciertos parámetros como la concentración del agente entrecruzante, peso molecular y grado de desacetilación del quitosano y temperatura.

El entrecruzamiento covalente permite obtener una red permanente que facilita la difusión de agua y mejora las propiedades mecánicas. Debido a esto se han utilizado en dos grandes campos, para liberación de drogas y como soporte para crecimiento de células.

El objetivo general de este trabajo es caracterizar física y químicamente tanto el quitosano del camarón langostino *Pleuroncodes planipes* de grado técnico y como el purificado. Posteriormente, obtener hidrogeles de quitosano entrecruzados con agentes químicos (glutaraldehído y glioxal), y caracterizarlos física y químicamente. La importancia de esta investigación radica en el hecho de que permite proporcionar información en cuanto a la potencial utilización como soportes de quitosano para lograr una mayor eficiencia en la producción de células epidérmicas en futuras aplicaciones biomédicas.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Materias primas. La quitina técnica se obtuvo según la metodología descrita por *Madrigal* (2003). Se llevó a cabo un proceso de descarnado mecánico del camarón langostino, seguido por una desmineralización con HCl 10% m/v por una hora, a temperatura ambiente, el producto se lavó con agua hasta neutralidad y se secó en una estufa con circulación de aire a 60-70°C durante 24 horas.

El quitosano, obtenido a partir del camarón langostino *Pleuroncodes planipes*, fue proporcionado por el Laboratorio de Polímeros de la Universidad Nacional (POLIUNA) de Costa Rica. En un reactor se colocó una relación 1:10 de quitina técnica e hidróxido de sodio 50% m/v. Se calentó a 120°C por una hora, con agitación constante (*Blair et al.*, 1987). Posteriormente el producto se lavó con agua hasta pH neutro y se secó en una estufa con circulación de VWR 1300 FD a 75°C durante 24 horas. Finalmente, se disminuyó el tamaño de partículas del quitosano obtenido en un molino *Hammer Mill* con una rejilla de 1 mm de diámetro. Para purificar el quitosano, se siguió la metodología propuesta por *Esquivel* (2005), para lo cual se colocó en un reactor de vidrio una relación 1:20 de quitosano grado técnico y ácido acético al 2% v/v. La solución se agitó mecánicamente a velocidad constante de 25 rpm. Posteriormente se filtró al vacío con una bomba KNF Laboport. La solución filtrada se colocó en un erlenmeyer y se agregaron 300 mL de hidróxido de sodio al 25% m/m; se agitó mecánicamente por una hora con agitación constante. Se filtró y se le hicieron lavados con agua hasta pH neutro. Al sólido se le agregaron 250 mL de etanol al 95% y se dejó en reposo por tres horas. Finalmente, se filtró y se secó a temperatura ambiente por 24 horas.

2.2. Caracterización del quitosano.

2.2.1. Determinación del porcentaje de material soluble en ácido acético. Se siguió el método descrito en la norma ASTM D1110-56.

2.2.2. Determinación del grado de acetilación mediante análisis termogravimétrico (TGA). Se siguió el método propuesto por *García et al.* (1983); el cual permite comparar la pérdida de masa porcentual de la muestra, calculada a partir de la curva de la primera derivada de una curva termogravimétrica (DTGA). Se siguió la metodología según el ASTM E 1131-03, se utilizó un equipo *Perkin Elmer* modelo Pyres TGA-6. El análisis se llevó a cabo en atmósfera de aire, a una velocidad de calentamiento de 20 grados/min, en el intervalo de temperatura comprendido entre 50 y 600°C.

2.2.3. Determinación del peso molecular promedio viscoso (M_v). Se empleó la metodología descrita en la norma ASTM D 2857, bajo las condiciones propuestas por *Esquivel* (2005). Se utilizó un viscosímetro *Cannon Fenske* modelo Routine No.150. Se utilizó la ecuación de *Mark-Houwink-Sakurada* ($[\eta] = KM_v^\alpha$) para calcular el peso molecular promedio viscoso del quitosano, donde $[\eta]$ es la viscosidad intrínseca y M_v es el peso molecular promedio viscoso (*Katime*, 1994). El valor de la constante K es $13,8 \cdot 10^{-5}$ dL/g y el del exponente α corresponde a 0,85.

2.3. Obtención de los hidrogeles de quitosano. Los hidrogeles estudiados corresponden a concentraciones de quitosano grado técnico al 1 y 3% m/v (*Silva et al.*, 2004), en ácido acético al 2% v/v. Se agitó constantemente por una hora. Se dejó en reposo por 24 horas. Finalmente se vertió 100 mL de la solución en un molde de teflón y se evaporó el disolvente a 65°C en estufa de aire circulante (VWR 1300 FD) por 90 minutos para obtener la película de quitosano.

El procedimiento de entrecruzamiento de hidrogeles de quitosano se realizó por inmersión de la película en soluciones comerciales de agentes entrecruzantes según lo propuesto por *Chen et al.* (2005). Se utilizó glutaraldehído al 50% ($\text{CHO}-(\text{CH}_2)_3\text{-CHO}$) y glioxal al 40% (CHO-CHO), así como diferentes concentraciones de glioxal al 30, 20, 10 y 5%. Se dejó reaccionar por 24 horas en un sistema de vidrios prensados que contenían la solución respectiva.

Después de 24 horas de entrecruzamiento, se eliminó por vaciado el agente entrecruzante del sistema y se agregó etanol por 10 minutos para eliminar el exceso del reactivo del hidrogel, luego se eliminó el etanol y se sustituyó por glicina 0,1 mol/L por 5 minutos para neutralizar los grupos aldehídos que no reaccionaron y por último se hicieron tres lavados con agua destilada. Posteriormente se procedió a secar los hidrogeles en una estufa de aire circulante a 55°C por 24 horas, hasta peso constante.

2.4. Caracterización de hidrogeles de quitosano. Se realizaron pruebas de absorción de agua, la determinación de material soluble, microscopia electrónica de barrido (SEM) y análisis termogravimétricos (TGA). Se analizaron hidrogeles de quitosano a concentraciones del 1 y 3%, entrecruzados con glutaraldehído al 50% y glioxal en sus diferentes concentraciones. Se prepararon hidrogeles sin entrecruzar para tener parámetros de comparación.

2.4.1. Prueba de absorción de agua: Mediante esta prueba se determinó el comportamiento de los hidrogeles en presencia de atmósferas con humedades relativas controladas. Se utilizaron soluciones de glicerina que proporcionaron las distintas humedades

relativas, las cuales se obtienen por la dilución de la glicerina al 70% v/v en agua destilada, las concentraciones se expresan como porcentajes peso/peso y cada una de ellas proporciona atmósferas diferentes (DIN 50008).

2.4.2. Determinación del porcentaje de material soluble en ácido acético: Para determinar el grado de entrecruzamiento de los hidrogeles de quitosano, se colocaron en un sistema de extracción *Soxhlet*, empleando ácido acético al 2% v/v, a 70°C durante seis horas.

2.4.3. Análisis termogravimétrico (TGA): Se analizaron las muestras bajo atmósfera de gas nitrógeno con un flujo de 20 mL/min, con una velocidad de calentamiento de 20 grados/min, en el intervalo de temperatura 70-600°C. Se evaluó la temperatura inicial de descomposición, la temperatura de máxima velocidad de descomposición y el porcentaje de masa residual a 550°C; con el fin de determinar el efecto del agente entrecruzante en la estabilidad térmica del quitosano y de brindar información acerca del grado de entrecruzamiento.

2.4.4. Microscopia electrónica de barrido (SEM): Esta técnica se utilizó con el fin de observar la porosidad y características superficiales de los hidrogeles entrecruzados. Las muestras se recubrieron con oro para conferirles propiedades conductivas y fueron observadas en un microscopio electrónico de barrido marca *Jeol JSM 6400F*.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización de quitosano. Debido a que el quitosano presenta propiedades sumamente importantes para la adherencia y proliferación celular se llevó a cabo una caracterización del quitosano utilizado como materia prima. Mediante las pruebas de solubilidad, grado de acetilación y masa molecular viscosimétrica, llevadas a cabo para el quitosano de langostino grado técnico y purificado, se puede observar que la diferencia entre los resultados obtenidos para cada una de estas pruebas depende del grado de purificación de ambos materiales.

3.1.1. Solubilidad del quitosano: En el caso de la prueba de solubilidad en ácido acético, el quitosano grado técnico presentó un menor porcentaje de solubilidad que el quitosano de langostino purificado (Tabla 1).

Según *Singh* y *Ray* (2000), la solubilidad del quitosano se encuentra relacionada a la cantidad de grupos amino protonados de la cadena polimérica; en cuanto mayor sea la cantidad de estos grupos mayor la solubilidad del polímero, aspecto que se encuentra relacionado al grado

de desacetilación del quitosano, que es mayor para el quitosano purificado, lo que evidencia el aumento en la solubilidad.

Tabla 1. Resultados de la prueba de solubilidad en ácido acético del quitosano grado técnico y el quitosano de langostino purificado.

Quitosano	Porcentaje de solubilidad
Grado técnico	98,506 ± 0,001
Purificado	99,046 ± 0,001

A pesar de que el quitosano es un polisacárido de cadena lineal, presenta variabilidad en el tamaño de las cadenas como en el grado de acetilación de cada una (Gerasimenko et al., 2004), aspecto que influencia la solubilidad en medio ácido. Si se da el efecto de enredo de cadenas de quitosano, la protonación de los grupos aminos no se da por completo debido a la poca interacción que pueden presentar los grupos amino interiores con el ácido presente en el medio.

3.1.2. Grado de acetilación: La termodegradación del quitosano mediante TGA (Figura 5) permite determinar su grado de acetilación. Para ambos quitosanos se observa una pérdida de humedad cerca de los 80°C, para luego experimentar una pérdida de masa, la cual corresponde a procesos de depolimerización y descomposición de los diferentes grupos acetilo y amino del quitosano; esto concuerda con lo publicado por Peniche et al. (1993).

Con base en el área de la derivada (DTGA) de la curva de pérdida de masa de cada quitosano se observó una leve disminución del grado de acetilación del quitosano purificado (Tabla 2), como respuesta al procesamiento llevado a cabo para eliminar las impurezas del quitosano de langostino grado técnico, las cuales a su vez tienden a retrasar el proceso de descomposición térmica del quitosano.

Tabla 2. Temperatura de máxima velocidad de descomposición, masa residual a 550°C, área bajo la curva y grado de acetilación en muestras de quitosano de langostino.

Parámetro	Quitosano	
	Grado técnico	Purificado
Temperatura de máxima velocidad de descomposición (°C)	313,6	309,9
Porcentaje masa residual a 550°C (%)	30,6	29,7
Grado acetilación (%)	54,8	50,8

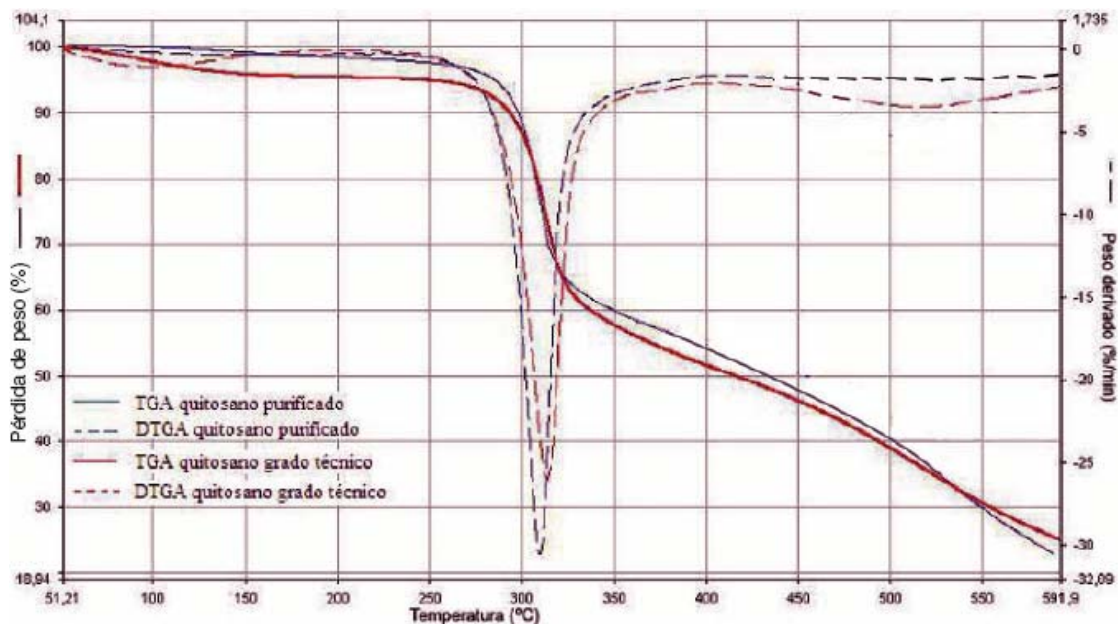


Figura 5. Curva calorimétrica (TGA) y su derivada (DTGA) de muestras de quitosano de langostino grado técnico y purificado.

Según Santos et al. (1983), el grado de acetilación del quitosano afecta su estabilidad térmica. Lo anterior se observó en los termogramas analizados, pues para el quitosano purificado disminuyó la temperatura de máxima velocidad de descomposición. Así, a pesar de que la diferencia entre ambas temperaturas de descomposición no es significativa, se evidencia que existe relación entre el grado de acetilación y la estabilidad térmica. Lo anterior concuerda con lo propuesto por García et al. (1983), el cual observó que el quitosano se vuelve menos estable térmicamente conforme aumenta el grado de desacetilación, debido a que existe mayor presencia de grupos amino, lo que indica que la descomposición es más rápida para los grupos amino que para los grupos acetilo.

En términos generales, el análisis de los termogramas permite determinar que existe muy poca diferencia entre los distintos parámetros analizados para cada uno de los quitosanos, sobretodo en el porcentaje de masa residual a 550°C.

3.1.3. Peso molecular promedio viscoso.: Los resultados obtenidos en la determinación del peso molecular promedio viscoso de ambos quitosanos de langostino pueden verse en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados obtenidos en la determinación de la masa molecular del quitosano de langostino del quitosano grado técnico y el quitosano de langostino purificado.

Quitosano	Peso molecular promedio viscoso, M_v
Grado técnico	164.616 g/mol
Purificado	138.146 g/mol

Los valores se obtuvieron representando la viscosidad reducida y la viscosidad inherente, a partir del tiempo de flujo de las soluciones de quitosano de diferente concentración en un tubo capilar. La viscosidad intrínseca se relaciona con la masa molecular mediante la ecuación de *Mark-Houwink-Sakurada* (Muzzarelli y Peter, 1997), donde se obtuvo un mayor valor de masa molecular para el quitosano grado técnico. Esta disminución en el peso molecular para el quitosano purificado es debida a que la presencia de impurezas presentes en el quitosano grado técnico afectan la velocidad de caída de la solución a través del capilar, aumentando el tiempo y, por tanto, de la viscosidad intrínseca de la solución, además de que el procesamiento al que se somete el quitosano para purificarlo degrada las cadenas poliméricas del quitosano disminuyendo su viscosidad y, por tanto, su peso molecular.

3.2. Caracterización de los hidrogeles de quitosano. Los resultados obtenidos de la caracterización que se llevó a cabo en los hidrogeles de quitosano, muestran el cambio físico y químico que sufre el quitosano al encontrarse entrecruzado con agentes químicos.

3.2.1. Características físicas de los hidrogeles. Cuando se llevó a cabo el entrecruzamiento de los hidrogeles de quitosano, se observó un cambio en las características físicas a nivel de superficie, color y comportamiento en presencia de agua; cada una de estas características varía conforme el grado de entrecruzamiento (Tabla 4).

3.2.2. Prueba de absorción de agua: Los hidrogeles son estructuras tridimensionales que tienden hincharse en presencia de agua o fluidos biológicos, por lo que se llevó a cabo un entrecruzamiento de las cadenas poliméricas del quitosano con dos agentes químicos difuncionales, el glutaraldehído y el glioxal. Así, al colocar los hidrogeles en frascos con humedades relativas controladas, se espera que absorban determinada cantidad de agua dependiendo de su estructura tridimensional y del grado de entrecruzamiento. En la Figura 6 se

observan los resultados para las curvas de absorción de agua de hidrogeles de quitosano al 1% sin entrecruzar y entrecruzados con glutaraldehido 50% y glioxal 40% en atmósferas con humedad relativa controlada de 40, 55, 70, 90 y 100% de humedad. Los hidrogeles de quitosano al 1% con agente entrecruzante y sin agente, en diferentes humedades relativas, presentan un porcentaje de agua absorbida relativamente bajo en las humedades del 40, 55, 70 y 90%; mientras que en la humedad del 100% los valores llegan a su máximo. En los hidrogeles de quitosano al 3%, el contenido de agua absorbida es mayor en comparación con los hidrogeles de quitosano al 1%; no obstante la tendencia observada en las curvas es semejante a la anterior.

Tabla 4. Características físicas de los hidrogeles de quitosano de langostino con concentraciones al 1 y 3%.

Entrecruzante	Color	Características superficiales	Comportamiento en humedades relativas
Sin entrecruzante		Presenta cierta elasticidad y una superficie lisa y regular	Absorbe mucha agua con lo que se vuelve irregular
Glutaraldehido 50 %	Marrón	Muy rígido y con una superficie irregular y rugosa cuando se encuentra seco, en algunos casos se enrolló sobre si mismo	Mantiene su superficie lisa y su forma en contacto con el agua, poca o nula presencia de agua en el hidrogel
Glioxal 40, 30, 20, 10 y 5%	Marrón claro y a medida que el entrecruzante disminuye se aclara el color del hidrogel	Conforme disminuye la concentración de entrecruzante aumenta la rigidez y la rugosidad del hidrogel cuando se encuentra seco	Se observaron gotas de agua sobre el hidrogel. Este efecto disminuyó conforme lo hace la concentración del entrecruzante.

En cuanto a los hidrogeles sin entrecruzar, mostrados en la Figura 7, se observa que en ambas concentraciones de quitosano, en la humedad relativa del 90%, existe diferencia significativa entre los porcentajes de absorción de agua ($t_c 2,37$ para una $P < 0,05$ con 4 grados de libertad), no así para la absorción de agua en la humedad del 100%. Sin embargo, el hidrogel

de quitosano al 1% tiende a absorber más agua que el de 3%, a pesar de que ambos aumentan su masa en casi un 200% en la humedad relativa más alta.

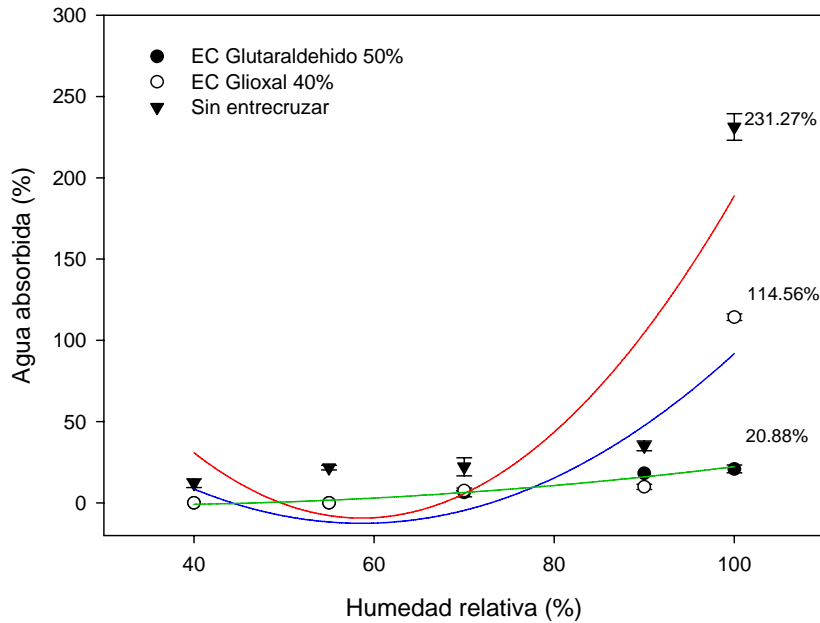


Figura 6. Absorción de agua de hidrogeles de quitosano al 1% sin entrecruzar y entrecruzados con glutaraldehído 50% y glioxal 40% en atmósferas con humedad relativa controlada.

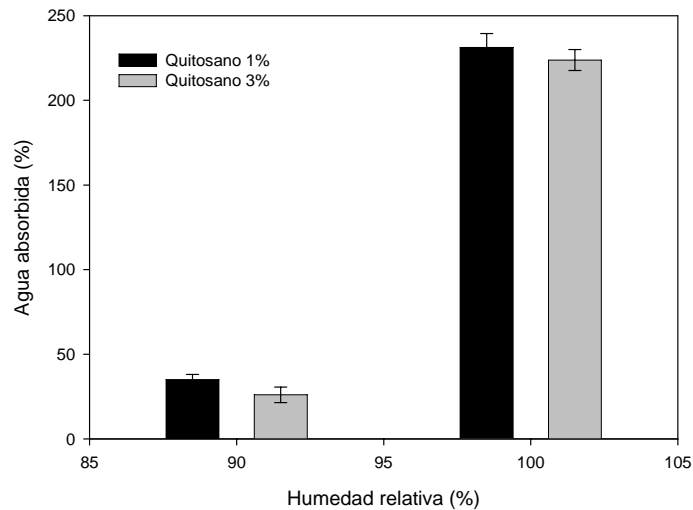


Figura 7. Absorción de agua de hidrogeles de quitosano sin entrecruzar en humedades relativas al 90 y 100%.

Con respecto de los hidrogeles entrecruzados con glutaraldehído al 50%, entre ambas concentraciones de quitosano, hay diferencia significativa para las dos humedades relativas analizadas ($P < 0,05$ con 4 grados de libertad). Se observa una mayor capacidad de absorber en la muestra de quitosano al 3% y presenta el mayor cambio de absorción entre las dos humedades relativas analizadas (Figura 8).

Por otra parte, los resultados demuestran que los hidrogeles entrecruzados con glioxal no evidencian diferencia alguna entre las concentraciones de quitosano analizadas para ambas humedades; sin embargo, se observa un aumento en la masa de cerca del 110% para la humedad más alta (Figura 9).

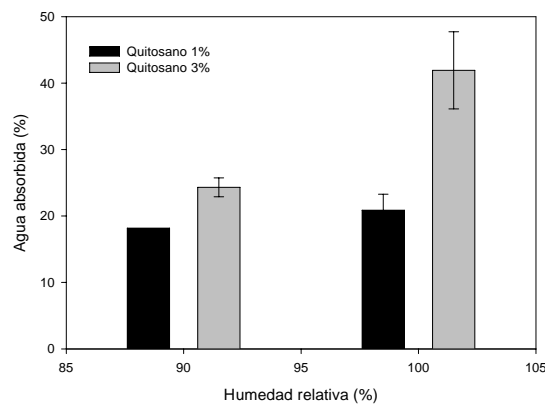


Figura 8. Absorción de agua de hidrogeles de quitosano entrecruzados con glutaraldehído 50% en humedades relativas al 90 y 100%.

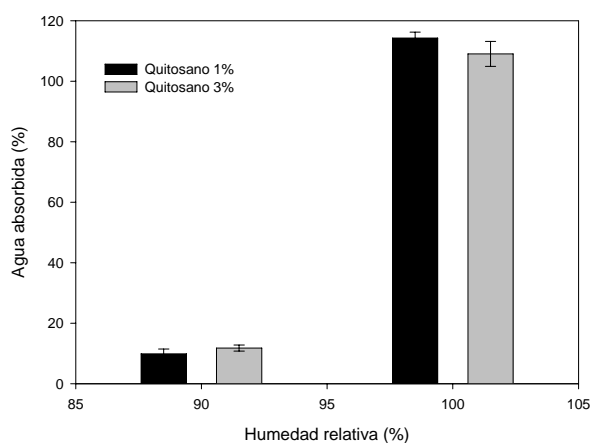


Figura 9. Absorción de agua de hidrogeles de quitosano entrecruzados con glioxal 40% en humedades relativas al 90 y 100%.

Asimismo, se estudió el efecto del cambio de la concentración del agente entrecruzante empleado en las diferentes propiedades de los hidrogeles en estudio (Figura 10). Se observó que conforme disminuye la concentración de glioxal disminuye la capacidad de los hidrogeles de absorber agua; sin embargo, en los hidrogeles entrecruzados con glioxal al 5 y 10% no existe diferencia significativa entre los porcentajes de absorción de agua para ambas concentraciones de quitosano, contrario a lo que ocurre con las concentraciones al 20 y 30% de glioxal (tc de 4,45 y 2,24, respectivamente, con un valor de $P < 0,05$ con 4 grados de libertad).

Finalmente, se observó que los porcentajes de absorción de agua de los hidrogeles sin entrecruzar, en diferentes humedades relativas, resultaron ser mayores que en los hidrogeles entrecruzados con ambos agentes. Lo anterior se debe a que un hidrogel sin entrecruzar presenta la capacidad de formar enlaces con el agua mediante los grupos hidrófilos, para posteriormente exponer los grupos hidrófobos; brindándole la capacidad de interaccionar debido a una fuerza osmótica producida por las cadenas de quitosano que conforman la red tridimensional, lo cual concuerda con lo expuesto por *Kashyap et al. (2005)* y *Berger et al. (2004)*; sin embargo cuando los hidrogeles se entrecruzan, se impide la absorción de agua, debido a la presencia de una fuerza elástica de retracción de las cadenas poliméricas, lo que evidencia la disminución en la capacidad de absorción de agua.

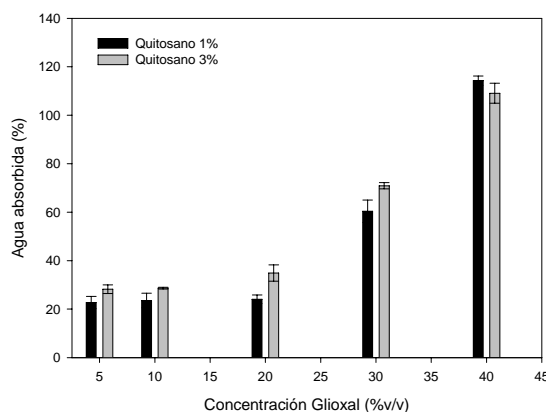


Figura 10. Absorción de agua de hidrogeles de quitosano entrecruzados con diferentes concentraciones de glioxal en una humedad relativa al 100%.

3.2.3. Porcentaje de material soluble: Debido a las diferencias mostradas en los porcentajes de absorción de agua (sección 3.2.2), se puede comprobar que los agentes entrecruzantes afectan las propiedades físicas y químicas de los hidrogeles, las cuales

dependerán del grado de entrecruzamiento de la matriz polimérica. Una forma de evaluar el grado de entrecruzamiento del polímero, es determinar el porcentaje de material soluble; en este caso indica cuanta cantidad del hidrogel no se encuentra entrecruzado, o no logró formar enlaces covalentes (enlace imina) con las cadenas de quitosano.

En la Tabla 5 se observan los resultados obtenidos en la evaluación del porcentaje de material soluble. Se observaron variaciones en el porcentaje de material soluble respecto a la concentración del agente entrecruzante, así como de la concentración de quitosano. Se observa que al disminuir la concentración de glioxal, disminuye el porcentaje de material soluble de los hidrogeles entrecruzados, obteniéndose los valores más bajos con glioxal al 5 y 10% con un 3% de quitosano. Los hidrogeles de quitosano al 1 y 3% entrecruzados presentan un porcentaje de material soluble similar (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación del porcentaje de material soluble de los hidrogeles entrecruzados con glutaraldehído y glioxal.

Concentración de Quitosano	Agente entrecruzante	Porcentaje material soluble (% ± ES)
1%	Glutaraldehído 50%	7,9 ± 0,5
	Glioxal 40%	32,7 ± 0,4
	Glioxal 30%	28,6 ± 0,5
	Glioxal 20%	28,0 ± 0,5
	Glioxal 10%	2,9 ± 0,8
	Glioxal 5%	1,1 ± 0,5
3%	Glutaraldehído 50%	4,3 ± 0,3
	Glioxal 40%	34,7 ± 0,2
	Glioxal 30%	27,7 ± 0,2
	Glioxal 20%	26,9 ± 0,2
	Glioxal 10%	0,0 ± 0,0
	Glioxal 5%	0,0 ± 0,0

3.2.4. Análisis termogravimétrico (TGA): Todos los termogramas de los materiales entrecruzados y sin entrecruzar presentaron un único proceso de degradación térmica y una disminución en la temperatura de máxima velocidad de descomposición. En el caso de los hidrogeles sin entrecruzar, la disminución en la temperatura de descomposición indica que la protonación de los grupos amino para disolver el quitosano y su posterior secado, afecta la estabilidad térmica del polisacárido. En los hidrogeles de quitosano al 1 y 3% sin entrecruzar, las curvas de pérdida de masa son similares. Se observan variaciones ligeras en la temperatura

inicial y de máxima velocidad de descomposición (Figura 11, Tabla 6). Si se comparan estos resultados con los obtenidos para los materiales entrecruzados (Figuras 12 y 13, Tablas 7 y 8), se observa que la introducción de un agente entrecruzante de peso molecular pequeño afecta la estabilidad térmica del hidrogel, debido que los valores de temperatura de máxima velocidad de descomposición disminuyeron más con respecto de los hidrogeles sin entrecruzar.

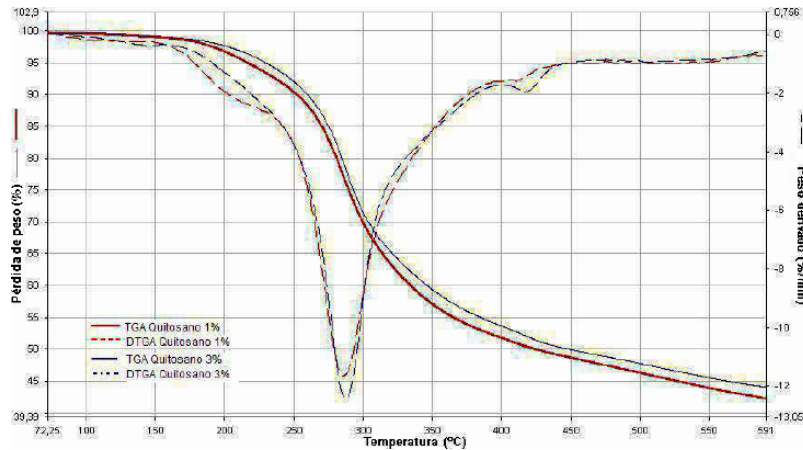


Figura 11. Curva calorimétrica (TGA) y su derivada (DTGA) de muestras de hidrogeles de quitosano de langostino grado técnico sin entrecruzar en atmósfera de nitrógeno.

Tabla 6. Comparación de la temperatura inicial y de máxima velocidad de descomposición y masa residual a 550°C de hidrogeles de quitosano sin entrecruzar.

Parámetro	Muestra Quitosano	
	1%	3%
Temperatura inicial de descomposición (°C)	236,6	241,8
Temperatura de máxima velocidad de descomposición (°C)	285,7	287,5
Porcentaje masa residual a 550 °C (%)	56,1	54,4

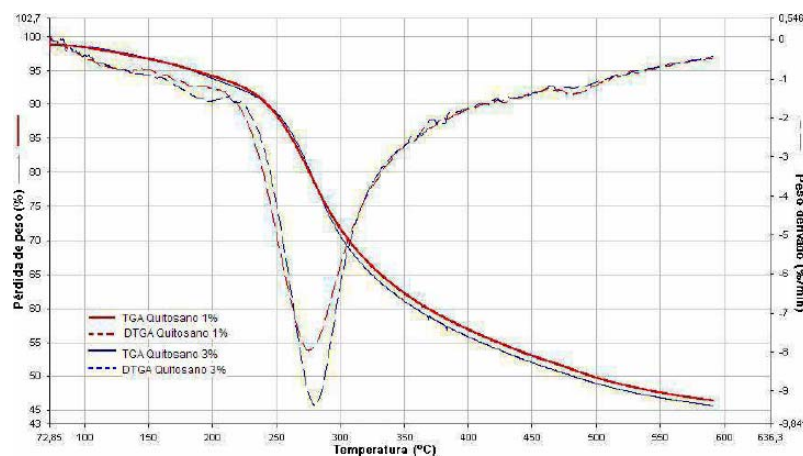


Figura 12. Termograma (TGA) y derivatograma (DTGA) de muestras de hidrogeles de quitosano de langostino grado técnico entrecruzado con glutaraldehído al 50% en atmósfera de nitrógeno

Las pruebas de caracterización de los hidrogeles de quitosano obtenidos por entrecruzamiento con glutaraldehído presentan un sólo proceso de descomposición (Figura 12). La disminución en la temperatura de máxima velocidad de descomposición (Tabla 7); indica que la molécula de glutaraldehído afecta la estabilidad térmica del quitosano.

Tabla 7. Temperatura inicial de descomposición y de máxima velocidad de descomposición y masa residual a 550°C de hidrogeles de quitosano entrecruzados con glutaraldehído al 50%.

Parámetro	Quitosano 1%	Quitosano 3%
	Glutaraldehído 50 %	
Temperatura inicial de descomposición (°C)	244,2	245,8
Temperatura de máxima velocidad de descomposición (°C)	274,9	280,3
Porcentaje masa residual a 550°C (%)	52,3	53,0

Con respecto de los termogramas de los hidrogeles de quitosano entrecruzados con glioxal al 40%, en las concentraciones de quitosano al 1 y 3%; ambas presentan un sólo proceso de descomposición y la forma de la curva muestra una tendencia de pérdida de masa similar a los casos anteriores (Figura 13). En el análisis de los termogramas se observa una disminución de la temperatura de máxima velocidad de descomposición en ambos hidrogeles, al compararlos con los que no entrecruzados, como ocurre con los hidrogeles entrecruzados con glutaraldehído (Tablas 7 y 8).

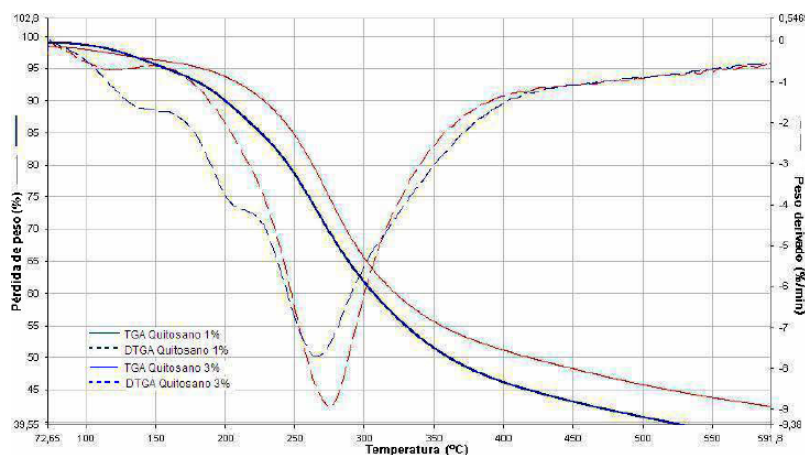


Figura 13. Curva calorimétrica (TGA) y su derivada (DTGA) de muestras de hidrogeles de quitosano de langostino grado técnico entrecruzado con glicoxal al 40% en atmósfera de nitrógeno.

Tabla 8. Temperatura inicial de descomposición y de máxima velocidad de descomposición y masa residual a 550°C de hidrogeles de quitosano entrecruzados con glicoxal al 40%.

Parámetro	Quitosano 1%	Quitosano 3%
	Glicoxal 40%	
Temperatura inicial de descomposición (°C)	217,2	190,0
Temperatura de máxima velocidad de descomposición (°C)	274,5	265,8
Porcentaje masa residual a 550°C (%)	56,1	60,7

En la Figura 14, se muestran los termogramas de los hidrogeles de quitosano al 1% entrecruzados con diferentes concentraciones de glicoxal. Sólo se observa un proceso de descomposición.

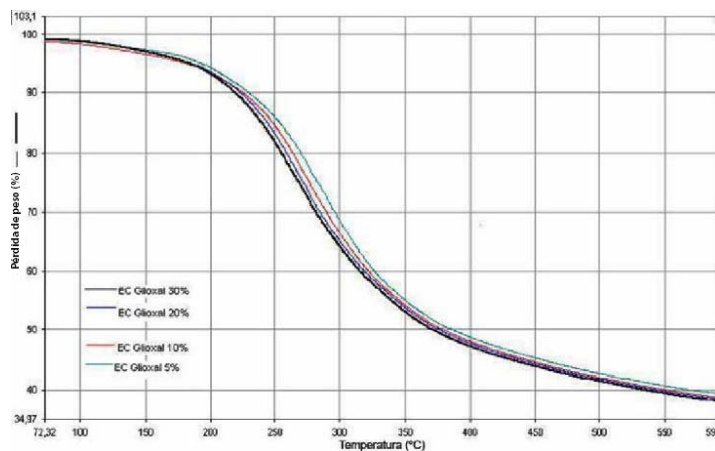


Figura 14. Termograma (TGA) de muestras de hidrogeles de quitosano de langostino grado técnico al 1% entrecruzado con diferentes concentraciones de glicoxal.

A partir del análisis de los termogramas se observa que conforme aumenta la concentración del glicoxal disminuye la temperatura de máxima velocidad de descomposición y aumenta el porcentaje de masa remanente a 550°C (Tabla 9).

Como en el caso anterior, para los hidrogeles de quitosano al 3% entrecruzado con diferentes concentraciones de glicoxal se observa un sólo proceso de descomposición (Figura 15, Tabla 10).

Tabla 9. Comparación de la temperatura inicial de descomposición, temperatura de máxima velocidad de descomposición y masa residual a 550°C de hidrogeles de quitosano al 1% entrecruzados con diferentes concentraciones de glicoxal.

Parámetro	Concentración Glicoxal (%v/v)				
	0 %	5 %	10 %	20 %	30 %
T _o (°C)	236,6	207,2	213,5	214,9	211,0
T _{md} (°C)	285,7	284,8	272,9	268,4	264,9
M (%)	56,1	59,3	59,9	60,2	60,4

T_o: temperatura inicial de descomposición; T_{md}: temperatura de máxima velocidad de descomposición; M: porcentaje de masa residual

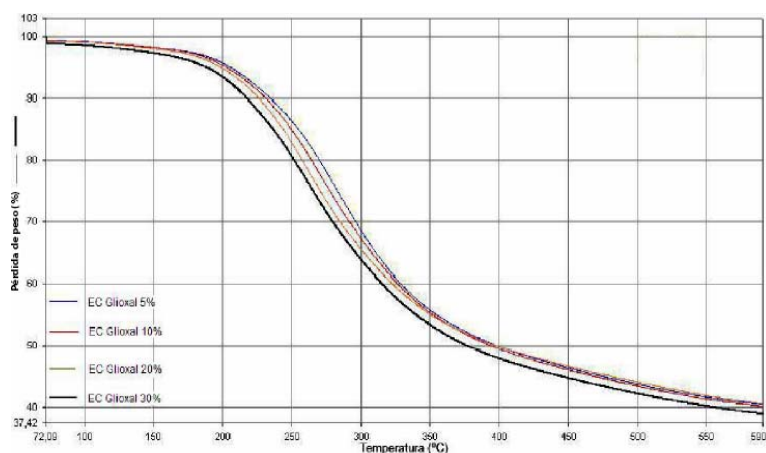


Figura 15. Termograma (TGA) de muestras de hidrogeles de quitosano de langostino grado técnico al 3% entrecruzado con diferentes concentraciones de glicoxal.

Tabla 10. Comparación de la temperatura inicial de descomposición, temperatura de máxima velocidad de descomposición y masa residual a 550°C de hidrogeles de quitosano al 3% entrecruzado con diferentes concentraciones de glicoxal.

Parámetro	Concentración Glicoxal (%v/v)				
	0%	5%	10%	20%	30%

T_o (°C)	241,8	203,7	208,5	208,4	209,8
T_{md} (°C)	287,5	280,6	268,1	261,2	262,0
M (%)	54,4	58,3	58,6	58,0	59,8

T_o : temperatura inicial de descomposición; T_{md} : temperatura de máxima velocidad de descomposición; M: porcentaje de masa residual

Los termogramas mostrados muestran la disminución de la temperatura de máxima velocidad conforme aumenta la concentración de agente entrecruzante, además se observa una caída en la temperatura inicial de descomposición con respecto del hidrogel de quitosano sin entrecruzar (Tabla 10).

El efecto de la variación de la concentración de glicoxal en la obtención de los hidrogeles, se determina mediante el comportamiento de la temperatura de máxima velocidad de descomposición para cada uno de los hidrogeles analizados.

Se puede observar que conforme aumenta la concentración del agente entrecruzante disminuye la temperatura de máxima velocidad de descomposición en los hidrogeles de quitosano al 1 y 3%; sin embargo, el efecto es mayor en este último (Figura 16).

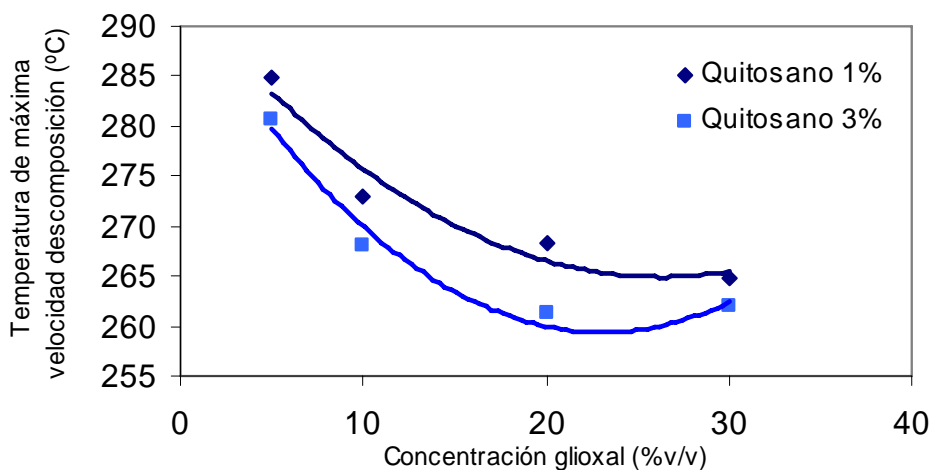


Figura 16. Temperatura de máxima velocidad de descomposición de hidrogeles de quitosano entrecruzados con diferentes concentraciones de glicoxal

3.2.5 Microscopia electrónica de barrido (SEM). En este análisis se observó la porosidad y características microscópicas superficiales. En los hidrogeles de quitosano sin entrecruzar se observan capas superpuestas de quitosano en los bordes (Figura 17a), y la superficie no presenta una porosidad definida y es irregular (Figura 17b).

Sin embargo, en los hidrogeles de quitosano entrecruzados, se observa que las características superficiales cambian cuando se entrecruzan con agentes químicos. Se observan bordes lisos y regulares, producto del entrecruzamiento de las cadenas de quitosano (Figura 18a y 18c); además se define una porosidad irregular que se encuentra en un ámbito de 1 a 10 μm y una superficie más ordenada y lisa, con respecto de los hidrogeles de quitosano sin entrecruzar (Figura 18).

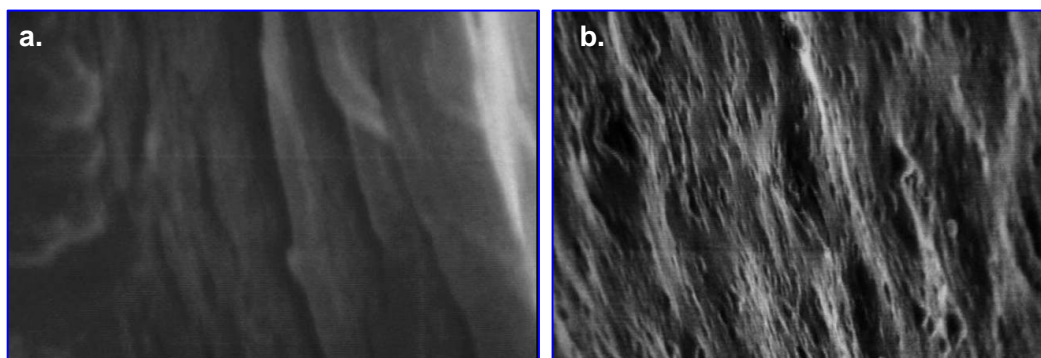


Figura 17. Micrografías SEM de hidrogeles de quitosano al 1% sin entrecruzar tomadas a 2500X: a) vista lateral, b) vista superficial.

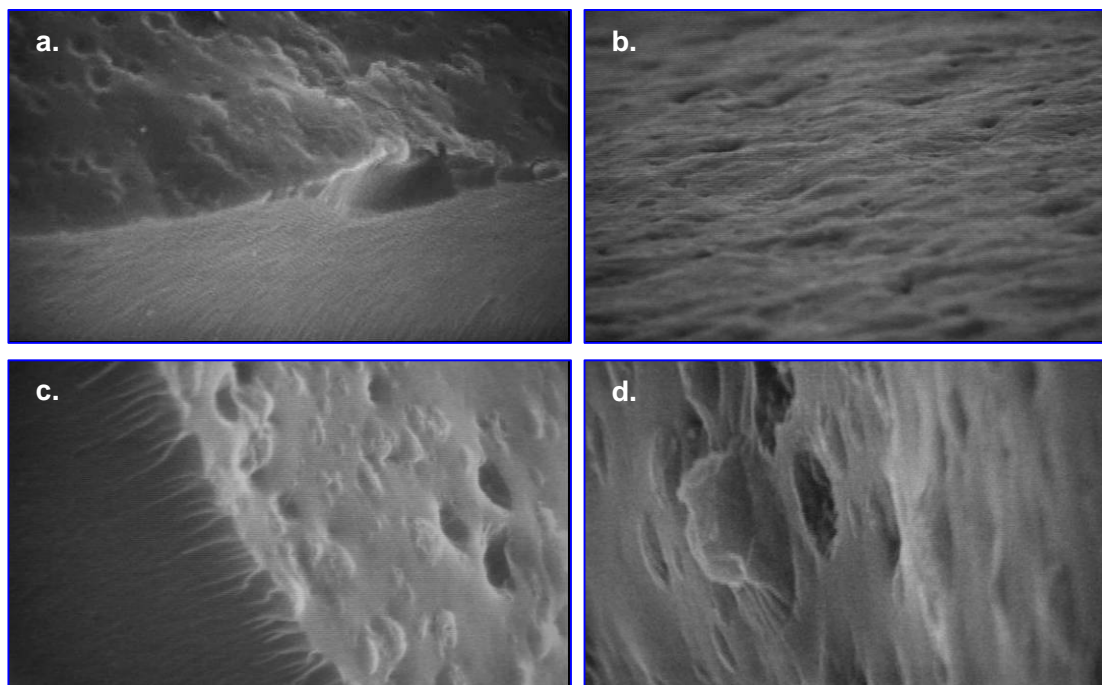


Figura 18. Fotos al microscopio electrónico de hidrogeles de quitosano al 1% entrecruzados tomadas a 2500X: a) glutaraldehído 50%, b) glioxal 40%, c) glioxal 30% y d) glioxal 10%.

Los hidrogeles usados en ingeniería de tejidos presentan poros, y como se mencionó, estos poros permiten que las células vivas se acomoden adecuadamente o se diseñan para que se disuelvan o degraden, liberando factores de crecimiento y por ende creando poros en los cuales las células puedan penetrar y proliferar.

3.3. Utilización del hidrogel para el crecimiento de fibroblastos humanos. Con base en los resultados obtenidos y analizados, el hidrogel que se podría emplear para llevar a cabo el crecimiento de fibroblastos humanos corresponde al hidrogel de quitosano de langostino purificado al 3% entrecruzado con glioxal al 20%.

El primer parámetro evaluado fue el color del hidrogel. Lo ideal es que el soporte permita determinar la confluencia celular, para tal efecto este debería ser transparente, ya que es posible observar el comportamiento de las células sobre el mismo. En el caso del glutaraldehído, este presentó un color marrón oscuro que impide el paso de la luz para observar las células al microscopio invertido.

Con respecto al grado de entrecruzamiento y su posible influencia en el comportamiento del hidrogel en presencia de medio de cultivo, se observó que el hidrogel de quitosano entrecruzado con glioxal al 20% presentó un porcentaje de material soluble alto en comparación con el hidrogel entrecruzado con glutaraldehído. En este último, la pérdida de masa es muy baja, es decir, posee una matriz polimérica muy entrecruzada, por lo que sus características se alteraran menos en presencia de un medio de cultivo debido a que se favorece la estabilidad de la red tridimensional (Swami, 2004). Así, a pesar de que la capacidad de hinchamiento y de formar una red tridimensional más amplia en presencia de medios líquidos será mayor para los hidrogeles entrecruzados con glioxal, esto permite una mayor interacción del hidrogel con los fibroblastos, a pesar de que no se cuenta con la cantidad y la interconectividad que presentan los poros en el interior del hidrogel.

Con respecto de los hidrogeles obtenidos con concentraciones de glioxal del 5 y 10%, se observó que cuando ocurre el entrecruzamiento, al haber mayor cantidad de agua en la solución, el hidrogel se hidrata primero y luego entrecruza, con lo que se obtiene hidrogeles con superficies muy irregulares, contrario a lo que ocurre con los hidrogeles obtenidos con concentraciones de glioxal superiores. Asimismo, en ambas muestras se observaron menores porcentajes de pérdida de masa, lo que indica un mayor entrecruzamiento. Lo anterior se debe a que el glioxal puede penetrar más fácilmente en la red tridimensional hidratada de quitosano y

por ende entrecruzar fácilmente las cadenas del polímero. Sin embargo, debido al grado de entrecruzamiento de los hidrogeles obtenidos con concentraciones de glioxal del 20% v/v de glioxal, estos presentan mayor capacidad de interactuar con el medio de cultivo y de variar sus características hasta el punto que la red tridimensional lo permita (*Berger et al.* 2004).

4. CONCLUSIONES

El objetivo de esta investigación fue caracterizar física y químicamente el quitosano del camarón langostino *Pleuroncodes planipes* de grado técnico y purificado. Se concluyó que las características físicas y químicas del quitosano de langostino dependerán del proceso de purificación al cual sea sometido.

Posteriormente se obtuvieron hidrogeles de quitosano entrecruzados con agentes químicos (glutaraldehído y glioxal) y se caracterizaron física y químicamente. Se concluyó que los hidrogeles de quitosano entrecruzados absorben menos agua que los hidrogeles sin entrecruzar, evidenciando así cambios en la funcionalidad de la molécula de quitosano. Asimismo, se concluyó que los resultados observados en los análisis de absorción de agua, en la termogravimetría y la microscopía electrónica de barrido (SEM) dependen en gran medida del grado de entrecruzamiento de los hidrogeles de quitosano.

La importancia de esta investigación radica en el hecho de que permite proporcionar información en cuanto a la potencial utilización de estos soportes de quitosano para lograr una mayor eficiencia en la producción de células epidérmicas en futuras aplicaciones biomédicas. En este caso, analizando las propiedades físicas y químicas de los materiales obtenidos se determinó que el hidrogel de quitosano entrecruzado con glioxal al 20%, posee las mejores condiciones para ser empleado como soporte para el crecimiento de fibroblastos humanos.

Se recomienda ampliar la investigación con agentes entrecruzantes no tóxicos o aplicar otra técnica convencional en la obtención de soportes para ingeniería de tejidos.

5. BIBLIOGRAFÍA

Abram, AP “*Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones*”, Pontificia Universidad Católica del Perú, Fondo Editorial, 2004

- Andradel, VS, Barros, B, Fukushima, KY, Takaki, GM, Rev. Iberoam. Micol., **20**, 149 (2003)
- ASTM. D 2857. Viscosidad de disoluciones diluidas de polímeros.
- ASTM. E 1131-03. Standard Test Method for Compositional Analysis by Thermogravimetry.
- ASTM. D 1110-56. *Standard Methods of Test for Water Solubility of Wood.*
- Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Peppas NA, Gurny R, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, **57**, 29 (2004)
- Blair H, Guthrie J, Law TK, Turkington P, *J. Appl. Polym. Sci.*, **33**, 641 (1987)
- Brine CJ, Austin PR, *Comp. Biochem. Physiol.* **69**, 283 (1981)
- Chen K, Ku Y, Lee CL, Lin HR, Lin FH, Chen TM, *Materials Science and Engineering*, **25(4)**, 472 (2005)
- Chuang W, Young TH, Yao CH, Chiu WY, *Biomaterials*, **20**, 1479 (1999)
- Chung TW, Lu YF, Wang HY, Chen WP, Wang SS, Lin YS, Chu SH, *Artificial Organs*, **27(2)**, 155 (2003)
- Damour O, Gueugniaud PY, Berthin-Maghit P, Rouselle P, Berthod F, Sahuc F, Collumbel C, *Clinical Materials*, **15**, 273 (1994)
- DIN 50008. Konstantklimat über waasserigen Loseungen. Deutsches Institut für Normung
- Dhanikula AB, Panchagnula R, *The AAPS Journal*, **6 (3)**, artículo 27 (2004)
- Esquivel M, “*Obtención de hidrogeles de quitosano a partir del camarón Pleuroncodes planipes*”. Tesis Licenciatura de Química Industrial. Universidad Nacional, Costa Rica (2005)
- Gagne N, Simpson BK, *Food Biotechnol.*, **7**, 253 (1993)
- Gerasimenko DV, Avdienko ID, Bannikova GE, Yu Zueva O, Varlamov VP, *Applied Biochemistry and Microbiology*, **40(3)**, 253 (2004)
- Gonçalves VL, Laranjiera MC, Fávere VT, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, **15(1)**, 6 (2005)
- Kashyap A, Kumavy N, Ravi Kumar MNK, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, **22(2)**, 107 (2005)
- Katime I “*Química Física Macromolecular*”. Volumen I. Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco, Bilbao 1994
- Kato Y, Onishi H, Machida Y, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **4**, 303 (2003)
- Liu H, Mao J, Yao K, Yang G, Cui L, Cao YJ, *Biomater. Sci. Polymer*, **15(1)**, 25 (2004)

- Madrigal S “*Obtención de quitosano a partir del camarón langostino Pleuroncodes planipes y valoración de sus propiedades farmacéuticas*”. Tesis Licenciatura en Química Industrial. Universidad Nacional, Costa Rica, (2004)
- Muschler GF, Nakamoto C, Griffith L, *The journal of bone and joint surgery, Incorporated*, **86-A(7)**,1541 (2004)
- Muzzarelli RA, Peter MG “*Chitin Handbook. European Chitin Society*”. Atec Edizioni, Via San Martino, (1997)
- Peniche C, Arguelles W, *Polymer degradations and Stability*, **39**, 21 (1993)
- Rohindra D, Nand AV, Khurma JR, “*Swelling properties of chitosan hydrogels*”, (2005)
- Rojas O, Moya M, Sibaja M, Ruepert C, Vega-Baudrit JR, *Rev. Iberoamer. Polím.*, **5(3)**, 133 (2004)
- Sachlos E, Czernuszka JT, *European Cells and Materials*, **5**, 29 (2003).
- Saintigny G, Bomard M, Darnour O, Collombell C, *Acta Derm. Venereol.*, **73**, 175 (1993)
- Sakkinen M “*Biopharmaceutical Evaluation of Microcrystalline Chitosan as Release-Rate-controlling Hydrophilic Polymer in Granules for Gastro-Retentive Drug Delivery*”, Academic Dissertation, Facultad de Ciencias de la Universidad de Helsinki, 2003
- Santos J, Soares J, Dockal E, Campana S, Cavalheiro E, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, **13(4)**, 242 (2003)
- Sastre, R., De Aza, S., “*Biomateriales*”, Faenza, Italia, Litográfica Faenza (2004)
- Silva RM, Silva GA, Coutinho OP, Mano JF, Reis RL, *J. Materials Sci.: Materials in Medicine*, **15**, 1105 (2004)
- Singh DK, Ray AR, *Rev. Macromol. Chem. Phys.*, **40(1)**, 69 (2004)
- Swami SN “*Radiation Synthesis of polymeric hydrogels for swelling controlled drug release studies*”, Tesis Doctoral, University of Western Sydney (2004)