

Preparación y caracterización de una película de quitosano plastificado: un biomaterial de gran potencial en el campo de la medicina

Preparation and characterization of a plasticized chitosan film: a potential biomaterial in medical field

Lorena Andrea Pava Sánchez¹

Artículo aceptado: 23-09-2019

¹ Ingeniera Biomédica. Grupo de Investigación en Ingeniería Biomédica, Vicerrectoría de Investigaciones, Universidad Manuela Beltrán. Ingeniera Biomédica área de Dirección técnica y calidad. lorena.pavasanchez@gmail.com

Andrés Bernal Ballén²

² Docente Investigador. Grupo de Investigación en Ingeniería Biomédica, Vicerrectoría de Investigaciones, Universidad Manuela Beltrán. andres.bernal@docentes.umb.edu.co

Leydi Carolina Sinisterra Marchand³

³ Ingeniera Biomédica. Grupo de Investigación en Ingeniería Biomédica, Vicerrectoría de Investigaciones, Universidad Manuela Beltrán. Ingeniera biomédica en Inspección, Vigilancia y Control de la Secretaría de Salud Departamental del Amazonas. carosyma1992@hotmail.com

Resumen

A pesar del progreso que la ciencia de los polímeros ha alcanzado, incluyendo el uso de estos en el campo médico, todavía existen problemas relacionados con esta área que permanecen sin resolver. Uno de esos problemas son las pobres propiedades mecánicas que exhiben los polímeros naturales. Para solucionar dicho inconveniente, el uso de plastificantes parece ser una técnica adecuada. Así, en la presente investigación se prepararon películas de quitosano que fueron plastificadas usando glicerol y ácido láctico (al 0,02% y 0,05% relacionadas con el peso del polímero) por medio de la técnica de solvent casting. Las propiedades mecánicas, grado de hinchamiento, grado de solubilidad, espectroscopía de infrarroja (FTIR) y microscopía de fuerza atómica (AFM) fueron usadas como técnicas de caracterización. El glicerol aumenta el grado de hinchamiento en un 18% mientras que el ácido láctico lo hace un 25%. Esto se debe al aumento del volumen libre del polímero. El ácido láctico disminuye la disponibilidad de

grupos hidroxilo del quitosano, reduciendo los puentes de hidrógeno que forma con agua, y afectando su solubilidad. De otro lado, FTIR indica que las interacciones entre polímero-plastificante ocurren mediante puentes de hidrógeno. El glicerol disminuye ligeramente el módulo de Young mientras que el ácido láctico lo aumenta en un 15%. Además, es el ácido láctico el que produce la muestra con mayor esfuerzo a la ruptura. La evaporación del solvente genera una interfase solvente-aire, causando rugosidad en la superficie, lo que puede permitir interacciones con microorganismos o células, favoreciendo procesos de adhesión celular. Por tanto, la información recolectada permite suponer que el material preparado podría tener potencial uso en el campo médico en aplicaciones tales como matrices para el crecimiento celular (propiedad intrínseca del quitosano como polímero natural), así como estructuras que permitan la liberación controlada de fármacos (potenciar la actividad antibacterial del polímero natural), y la degradación del material mientras se comporta mecánicamente de manera adecuada en medio

acuoso (propiedad derivada del plastificante).

Palabras Clave

Biomateriales, Quitosano, Propiedades mecánicas, Plastificante.

Abstract

Besides the progress that polymer science has reached, including polymers in medical field, there are still significant unsolved problems related to this topic. One of those problems are the poor mechanical properties that natural polymers exhibit. In order to overcome the mentioned drawbacks, plasticizers agents seem to be an appropriate technique. In this matter, the current research deals with the preparation of chitosan films which were plasticized using glycerol and lactic acid (at 0.02% and 0.05% related to the total amount of the polymer respectively) by solvent casting technique. Mechanical properties, swelling and solubility degree, infrared spectroscopy and atomic force microscopy were used as characterization techniques. Glycerol rises swelling degree up to 18% whereas lactic acid reaches 25%. This is caused by the increment of the free volume of polymer chains. Furthermore, lactic acid diminishes the availability of chitosan hydroxyl groups, reducing hydrogen bonding which are formed with water, affecting this the solubility. FTIR shows that polymer-plasticizer interactions occur by hydrogen bonding. Glycerol reduces slightly Young's modulus whereas lactic acid rises it in 15%. Moreover, lactic acid produces the sample with the highest stress at break. Solvent evaporation is responsible for creating a solvent-air interface which generates a rough surface which might affect cell or microorganism interactions with the material. Therefore, the collected information might indicate that the material has potential uses in medical field i.e. cell growth matrices (intrinsic property for chitosan as a natural polymer), as well as drug release (increasing the antibacterial property for chitosan), and material degradation while it behaves appropriate mechanically in water media (property depending on the plasticizer)

Keywords

Biomaterials, chitosan, mechanical properties, plasticizer.

Introducción

En las últimas décadas, la ciencia de los biomateriales ha experimentado un desarrollo extraordinario, y una de las razones es porque está asociada a otras disciplinas como la biología, la química, la ingeniería y la medicina (Bernal-Ballen, Lopez-Garcia, Merchan-Merchan, & Lehocsky, 2018; Bernal, Balkova, Kuritka, & Saha, 2013). De hecho, esta ciencia ha producido materiales para ser usados durante tratamientos médicos y restauración de órganos o tejidos (Saini, Singh, Arora, Arora, & Jain, 2015), lo que ha significado un gran avance tanto en el campo de la salud como de la ingeniería.

Diversas definiciones de biomateriales son usadas por científicos alrededor del mundo. Sin embargo, el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos los ha definido como una sustancia o combinación de sustancias, aparte de los medicamentos, de origen sintético o natural, la cual puede ser usada por un periodo de tiempo, con el fin de reemplazar parcial o totalmente algún tejido, órgano o función del cuerpo, para mantener o mejorar la calidad de vida del individuo (Bhat & Kumar, 2013; Khan & Tanaka, 2018; Osorio-Delgado et al., 2017; Sheikh et al., 2017; Srinivasa, Ramesh, Kumar, & Tharanathan, 2003). En la actualidad, el uso de biomateriales con fines regenerativos está ampliamente extendido en el campo de la biomedicina y la clasificación más general de los biomateriales incluye metales, cerámicas, composites y polímeros. No obstante, estos últimos merecen una atención especial como consecuencia de sus propiedades mecánicas, y porque es posible prepararlos con propiedades biodegradables o bio-absorbibles (Barbucci, 2002).

Hoy en día es común la aplicación de polímeros sintéticos y naturales en el tratamiento de heridas, sistemas de liberación de fármacos, injertos vasculares o la reconstrucción de tejidos. Del mismo modo, el empleo de biomateriales

en el ámbito quirúrgico es múltiple y variado. Así, existen implantes permanentes del sistema esquelético muscular, como las uniones en las extremidades superiores e inferiores o como miembros artificiales permanentes; en el sistema cardiovascular, en las válvulas, pared, marcapasos, corazón entero, arterias y venas; en el sistema respiratorio para la laringe, tráquea y bronquios, diafragma, pulmones y caja torácica; en el aparato digestivo, esófago, conductos biliares e hígado; en el sistema genitourinario; en sistema nervioso y de los sentidos, con las lentes y prótesis de córneas, oídos y marcapasos, e incluso para implantes cosméticos maxilofaciales (Boateng, Matthews, Stevens, & Eccleston, 2008; Gourlay, 2001; Joshi & Patel, 2012; Saini et al., 2015; Sembatya, Liu, Mikrani, & Zhou, 2019). Como se puede observar, el alcance del uso de biomateriales es tan amplio y diverso, que la investigación actualmente sigue desarrollando estos materiales y se estima que millones de personas se benefician de las extraordinarias propiedades de esta clase de sustancias.

Dentro de los polímeros naturales, el quitosano merece especial atención ya que es el segundo polisacárido más abundante encontrado en la naturaleza, es biodegradable y es posible procesarlo para obtener membranas, esponjas, geles, fibras, andamios, macropartículas y nanopartículas y por tanto es posible que tenga una gran variedad de aplicaciones biomédicas (Anitha et al., 2014; Brun et al., 2014; Di Martino, Sittinger, & Risbud, 2005; Sionkowska, 2011). Este polímero natural tiene muchas posibilidades estructurales para modificaciones químicas y mecánicas para generar nuevas propiedades y funciones especialmente en el área biomédica (Pillai, Paul, & Sharma, 2009). De otro lado, el quitosano exhibe propiedades antibacteriales, baja toxicidad hacia células de mamíferos, y controla el crecimiento bacteriano e inhibe la multiplicación viral (Leceta, Guerrero, & la Caba, 2013; Shi, Neoh, Kang, & Wang, 2006). No obstante, las propiedades mecánicas del quitosano no son buenas (Bernal-Ballen et al., 2018) por lo que su aplicación puede verse limitada. En este contexto, el uso de aditivos (plastificantes y entrecruzantes) así como la mezcla

con otros polímeros mejoran estas propiedades sin que afecten negativamente las características biológicas de los mismos. Generalmente, los plastificantes se adicionan a polímeros tanto naturales como sintéticos con el fin de disminuir las fuerzas intermoleculares en las cadenas poliméricas, impartir flexibilidad y deducir la temperatura de transición vítrea (Sabbah et al., 2019). Las películas de quitosano son rígidas y necesitan plastificarse para reducir las fuerzas de fricción entre las cadenas poliméricas, tales como los puentes de hidrógeno. La incorporación de polioles en la preparación de dichas películas puede ayudar a superar estas debilidades y hace que la película sea estable durante un tiempo prolongado. Mediante el uso de aditivos, se pueden modificar las características del quitosano para obtener un biomaterial que tenga posibles aplicaciones en el campo de la medicina. Los plastificantes han sido ampliamente usados como aditivos de los polímeros debido a que pueden modificar la flexibilidad, las propiedades mecánicas y la permeabilidad del material; el ácido láctico produce una unión parcial con los grupos hidroxilo del quitosano, lo que causa el efecto plastificante (Figura 1a), mientras que el glicerol mejora las propiedades mecánicas de las películas de quitosano (S. Wang & Jing, 2017). Además, la investigación ha demostrado que la presencia del glicerol disminuye la resistencia a la tensión, y esta característica se produce por las interacciones del polímero y el plastificante (Figura 1b). En este sentido, el glicerol es un fuerte donador y aceptor de puentes de hidrógeno, lo que lo hace un excelente candidato para plastificar el quitosano. Así, las moléculas de glicerol son incorporadas a la región cristalina del quitosano, y por tanto destruye la estructura tridimensional de sus moléculas. Al romper los puentes de hidrógeno, incrementa la movilidad molecular, y como resultado las películas son más flexibles (M. Chen et al., 2018).

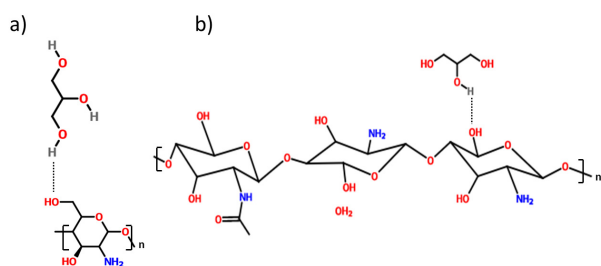


Figura 1. Representación esquemática de las interacciones entre el quitosano y los plastificantes usados. a). Quitosano-ácido láctico (Pineda-Castillo et al., 2018); b). Quitosano-glicerol (Sumarni, Prasetya, & Rahayu, 2017)

Por lo anteriormente mencionado, en esta investigación se prepararon soluciones ácidas de quitosano y a estas soluciones se les agregó glicerol y ácido láctico (al 0,02% y 0,05% respectivamente). A partir de las soluciones fueron obtenidas películas por el método de solvent casting. Posteriormente se analizaron sus propiedades mecánicas, grado de hinchamiento, grado de solubilidad, se tomaron espectros de infrarrojo mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y se obtuvieron imágenes a partir de la técnica de microscopía de fuerza atómica (AFM). La información recolectada permite concluir que el al adicionar glicerol y ácido láctico a las películas de quitosano, estas mejoran sus propiedades mecánicas aumentando la elasticidad y su capacidad de hinchamiento, y lo más importante, disminuyendo su solubilidad, lo que podría significar que el material es adecuado para servir como matriz para usos en el campo médico.

Marco conceptual

Aunque ha habido muchos intentos de definir un biomaterial, solo hasta 1987 se logró un consenso durante la conferencia de la sociedad europea de biomateriales (Williams, 2009). Sin embargo, para este trabajo se ha tomado en cuenta la definición dada por el Instituto Nacional de Salud (NIH por sus siglas en inglés, National Institute of Health) en la que se afirma que un biomaterial es alguna sustancia o combinación de sustancias, aparte de los medicamentos, de origen sintético o natural, los cuales pueden ser usados por un periodo de tiempo, con el fin de reemplazar parcial o totalmente algún tejido, órgano

o función del cuerpo, para mantener o mejorar la calidad de vida del individuo (Bhat & Kumar, 2013; Khan & Tanaka, 2018; Osorio-Delgado et al., 2017; Sheikh et al., 2017; Srinivasa et al., 2003).

El uso de este tipo de materiales ha crecido muy rápido en las últimas décadas como consecuencia de la concurrencia de varias disciplinas como la química, la ingeniería química, la ciencia de materiales, la mecánica, la ciencia de las superficies, la bioingeniería, la biología y la medicina, con un considerable aporte de especialistas en ética, organizaciones de estandarización reguladas por el gobierno y los empresarios (Ratner, Hoffman, Schoen, & Lemons, 2006). Además, los biomateriales abarcan muchos campos de la medicina y su repercusión en la calidad de vida humana no se puede reducir únicamente a un número de pacientes con una mejor calidad de vida. El efecto de los biomateriales es enorme y, específicamente, los polímeros son utilizados por decenas de millones de personas y cientos de miles de vidas son salvadas cada año (Langer & Tirrell, 2004). Ciertamente, su alcance es incalculable. Suturas, tornillos o incluso trasplantes de órganos completos, son una demostración de su magnitud. No es de extrañar que hoy en día el campo de los biomateriales haya impregnado profundamente la industria médica y se estima que al año 2000, su costo sólo en Estados Unidos fue de 9 mil millones de dólares, que es un indicativo de su trascendencia en el campo de la economía.

Dentro de los biomateriales más empleados están los polímeros naturales debido a la versatilidad de sus propiedades; el quitosano es uno de ellos y es ampliamente usado en el campo biomédico. El quitosano presenta grandes ventajas para su uso como biomaterial debido a su facilidad para realizar diferentes formas como membranas, esponjas, geles, fibras, andamios, macropartículas y nanopartículas para una variedad de aplicaciones biomédicas (Anitha et al., 2014). Este polímero natural tiene muchas posibilidades estructurales para modificaciones químicas y mecánicas para generar nuevas propiedades y funciones especialmente en el área

biomédica (Pillai *et al.*, 2009). Las principales propiedades del quitosano incluyen su alta biocompatibilidad, la capacidad antibacteriana, antifúngica, la habilidad para formar películas, su actividad hemostática, antioxidante, sus propiedades de mucoadhesión y su biodegradabilidad.

En los últimos años se han realizado diversas investigaciones con el fin de observar y analizar el comportamiento de diversas mezclas que contienen como componente principal el quitosano (Boles *et al.*, 2019; Marsano, Vicini, Skopińska, Wisniewski, & Sionkowska, 2004; Srinivasa *et al.*, 2003; Suyatma, Copinet, Tighzert, & Coma, 2004; Yang, Su, Leu, & Yang, 2004). De hecho, se ha establecido que la mezcla de polímeros es una estrategia valiosa para la modificación de las propiedades de un material, y por tanto, para dirigir sus posibles usos. Así, además de otros polímeros, diferentes aditivos también permiten la modificación de las propiedades del biomaterial. De hecho, es posible el ajuste de las propiedades tanto mecánicas como de permeabilidad al agua, sin pérdida de actividad antibacterial (H. Chen *et al.*, 2016). También se han elaborado membranas compuestas de quitosano, para evaluar la respuesta celular *in vitro*, encontrándose que el entrecruzamiento del quitosano mejora la estabilidad de las membranas, y que el uso de sustancias de origen natural (como el aloe vera) hace que el material tenga potencial para el desarrollo de apósitos activos para heridas (Silva, Caridade, Mano, & Reis, 2013). Recientemente se publicaron los resultados de una investigación en la que se mezcló quitosano con glicerol y cloruro de sodio. Aunque hubo afectación de la cristalinidad del polímero, y se redujo la resistencia a la tracción, el aumento de la estabilidad fue significativo, debido principalmente a la presencia del glicerol (Prateepchanachai, Thakhiew, Devahastin, & Soponronnarit, 2017).

De otro lado, se ha reportado la modificación de quitosano con diisocianato y su potencial uso en el campo de biosensores y biomédica (Kumar, Deepak, Kumari, & Dutta, 2016). Asimismo, la versatilidad del quitosano incluye aplicaciones en la regeneración dérmica y la aceleración

de la cicatrización de heridas (Singh, Shitiz, & Singh, 2017; Zargar, Asghari, & Dashti, 2015). También se ha reportado la modificación del quitosano con glicerina, y a mayor concentración del plastificante, existe una mayor deformación y una menor resistencia a la tensión debido al efecto plastificante y a la formación de enlaces de hidrógeno con los grupos amino del quitosano (Tulande, Penaranda, & Mina, 2014). En la literatura incluso se encuentra la mezcla de quitosano con espermidina y glicerol, resaltando que no hay pérdida de propiedades antimicrobianas, y con una mejoría importante en las propiedades mecánicas (Sabbah *et al.*, 2019). Adicionalmente, la mezcla del quitosano con glicerol permite mejorar las propiedades de hinchamiento sin detrimento de la intrínseca actividad antibacterial del polímero natural (Y. Ma *et al.*, 2017). También se ha evaluado la acción del glicerol en el quitosano, causando un aumento en la elasticidad y la permeabilidad al vapor de agua (Rivero, Damonte, Garcia, & Pinotti, 2016).

Como puede observarse, el potencial del quitosano es enorme, y los avances en la investigación de este material se muestran en la abundante literatura científica publicada. No obstante, todavía hay trabajo por hacer, y esta investigación compara el efecto plastificante del glicerol y del ácido láctico en una película del polímero natural. De este modo, propiedades mecánicas, FTIR, ATM, hinchamiento y grado solubilidad fueron usados como técnicas de caracterización.

Materiales y métodos

Procedimiento experimental

Materiales

Quitosano de mediano peso molecular fue proporcionado por Sigma–Aldrich, Colombia y el ácido acético glacial (Scharlau-Colombia) y el ácido láctico 85 % por Fermont, Colombia. Los reactivos fueron usados tal como fueron recibidos y no se utilizó ningún tipo de purificación adicional.

Preparación de muestras

Se preparó una solución de quitosano al 2 % (p/v) disuelta en ácido acético al 0,5 M a una temperatura de 90 °C y 800 rpm durante 4 horas usando una plancha de calentamiento con agitación magnética (Thermo Scientific Modelo SP131325Q, China). Una vez obtenida la solución, a una alícuota de 1000 mL se le agregaron 0,2 mL de glicerol y se agitó por 1 hora a 800 rpm hasta completar la homogenización. A una segunda alícuota de 1000 mL se le agregaron 0,5 mL de ácido láctico y también se agitó por 1 hora a 800 rpm. Después de preparadas las soluciones, éstas fueron vertidas en moldes rectangulares de 21,5 cm x 29 cm x 5 cm y el solvente fue evaporado a una temperatura promedio de 24 °C y una humedad relativa promedio de 39% durante 72 horas en un horno de secado (modelo ED-53, Binder GmbH, Alemania). La tabla 1 muestra la descripción de las muestras preparadas.

No	Nombre	Descripción
1	Muestra 1	Quitosano (Control)
2	Muestra 2	Quitosano y glicerol al 0,02%
3	Muestra 3	Quitosano y ácido láctico al 0,05%

Tabla 1. Descripción de muestras preparadas

Caracterización del material

Espesor de la película: el espesor fue medido en mm con un micrómetro digital (BullDog). Se realizaron 5 mediciones en diferentes partes de cada muestra y se reporta el promedio y la desviación estándar de las mediciones realizadas.

Grado de hinchamiento y solubilidad: el método gravimétrico fue usado para calcular el grado de hinchamiento y la solubilidad de las películas preparadas. Cuadrados de 1 cm² fueron cortados y secados en un desecador con gel sílice hasta obtener un peso constante (Balanza analítica, Nimbus, modelo NBL-214i, Estados Unidos) (W1). Después, las muestras fueron sumergidas en 5 mL de agua destilada a temperatura ambiente a diferentes intervalos de tiempo

(desde 1 min hasta 75 min). Como paso siguiente, las muestras fueron sacadas del líquido y la humedad de la superficie fue cuidadosamente removida con ayuda de un papel de filtro y fueron pesadas de nuevo (w2). Finalmente, las muestras fueron sometidas a secado nuevamente a temperatura ambiente hasta que su peso fue constante (w3). El grado de hinchamiento (GH) y el grado de solubilidad (GS) fue calculado de acuerdo con las ecuaciones 1 y 2 respectivamente. Cinco pruebas fueron realizadas a cada muestra y se presentan los promedios y las desviaciones estándar del proceso.

$$GH = \frac{w2-w1}{w2} \times 100 \quad (1)$$

$$GS = \frac{w1-w3}{w3} \times 100 \quad (2)$$

Propiedades mecánicas: dentro de la gran variedad de pruebas mecánicas usadas para caracterizar biomateriales, el Módulo de Young, el esfuerzo de ruptura y la elongación fueron determinadas para cada una de las muestras preparadas. Para llevar a cabo esta prueba se utilizó la máquina Universal INSTRON y se realizaron especímenes rectangulares de 150 mm por 12 mm. Para la realización de esta prueba se toma como base la norma ASTM D882-12. Las pruebas se realizaron a una temperatura ambiente de 22,4 °C y una humedad relativa de 53,2 %.

Espectroscopía infrarroja: se utilizó un espectrofotómetro infrarrojo con transformada de Fourier (Thermo Scientific, modelo Nicolet 380, Estados Unidos) para realizar la lectura de una muestra de cada biomaterial las cuales se leyeron directamente con el accesorio ATR de cristal de germanio en un rango de 4000 cm⁻¹ a 600 cm⁻¹. Todos los espectros fueron tomados en modo de transmisión a una resolución de 2 cm⁻¹ y graficados en la escala de absorbancia. Se utilizó como referencia la norma técnica ASTM E1252-98

Microscopia de fuerza atómica: por medio de esta prueba se realiza un análisis de la rugosidad

del material y la homogeneidad del mismo. Para realizar la prueba se utilizó el microscopio de fuerza atómica NanoSurf EasyScan 2 en modo contacto (XYCONTR) con una punta cuya constante de resorte es de 0,2 N/m y un área de barrido de 10 μm^2 . Se tomó un espécimen de cada muestra para realizar obtener imágenes de las interfaces molde-material y material-ambiente. El análisis de la prueba de AFM utilizó el Software wSXM el cual permite obtener información cuantitativa acerca de la rugosidad de cada muestra.

Para las pruebas de hinchamiento y solubilidad, la prueba de tensión y espectroscopia infrarroja se utilizó el software Origin2016 graphic and analysis en el cual se realizan gráficas de comparación de los datos obtenidos entre las muestras obtenidas.

Resultados y discusión

Espesor

En la tabla 2 aparecen los resultados obtenidos de las mediciones de espesor de cada una de las muestras.

No	Grosor (mm)					
	1	2	3	4	5	Promedio y desviación estándar
1	0,11	0,09	0,09	0,10	0,09	0,09 $\pm$ 0,08
2	0,12	0,15	0,12	0,14	0,13	0,13 $\pm$ 0,01
3	0,11	0,13	0,12	0,11	0,13	0,09 $\pm$ 0,08

Tabla 2. Datos de los espesores de cada muestra preparada.

Tal como se observa en la tabla, el grosor de las muestras varía en función del aditivo utilizado. De hecho, es posible afirmar que la adición de un plastificante de bajo peso molecular disminuye las fuerzas intermoleculares de los polímeros. Esto hace que haya un incremento del volumen libre y de la movilidad de la cadena. Por lo tanto, es de esperarse que muestras que tengan plastificantes, sean considerablemente más gruesas que sus contrapartes (Bernal-Ballén, Kuritka, & Saha, 2016; Sedlařík, Saha, Kuřitka, & Saha, 2006). Sin embargo, no se

observaron diferencias apreciables entre los dos plastificantes usados, debido probablemente a los tamaños moleculares similares.

Prueba de hinchamiento

Los materiales en contacto con organismos vivos deben tener la posibilidad de conducir y almacenar agua como parte de un proceso esencial en la nutrición celular. Por esta razón, es crucial determinar la solubilidad y el grado de hinchamiento de un material. Para la realización de la prueba, se garantizó que las películas de quitosano estuvieran con la mínima humedad, mediante un método de secado con gel de sílice. Para hallar los porcentajes de hinchamiento se utilizó la ecuación 1. Como se puede observar en la figura 2, hay una rápida absorción de agua de las tres muestras, aunque las que están plastificadas presentan un mayor porcentaje de absorción (Tabla 3). Esto se debe principalmente al aumento de los espacios intermoleculares que causa el plastificante en la red polimérica. La diferencia entre el glicerol y el ácido láctico puede deberse a que el primero tiene más puntos en donde establecer puentes de hidrógeno con la cadena de quitosano.

La interacción del quitosano con los plastificantes disminuye el número de grupos hidroxilo disponibles (Figura 1), disminuyendo así las interacciones de estos con agua, y reduciéndose así la hidrofiliidad del sistema (Berger, Reist, Mayer, Felt, & Gurny, 2004; Kim, Kim, Lee, & Kim, 1992). Además, el glicerol presenta una alta capacidad de enlace de hidrógenos que conducen a una buena interacción con las macromoléculas de quitosano asegurando su retención en la matriz del polímero (Debandi, Bernal, & Francois, 2016).

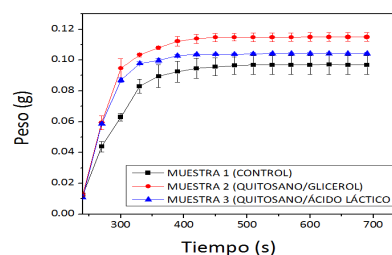


Figura 2. Prueba de hinchamiento para las muestras preparadas.

Muestra	Grado de hinchamiento (%)
1 (Control)	684,36 ± 37,83
2 (Quitosano/glicerol)	806,88 ± 74,41
3 (Quitosano/ácido láctico)	869,36 ± 85,53

Tabla 3. Grado de hinchamiento de las muestras preparadas.

Prueba de solubilidad

La figura 3 y la tabla 4 muestran los resultados obtenidos, evidenciándose que la película más soluble es la de quitosano con ácido láctico. Tal como se ha indicado anteriormente, la presencia del plastificante genera interacciones entre las cadenas moleculares, lo que ocasiona que los grupos hidroxilo del polímero se vean afectados. Este proceso ocurre por la protonación de la función $-NH_2$ de la posición C-2 de las unidades repetidas de D-glucosamina. Cuando el pH es bajo, los grupos amino del quitosano se protonan haciéndolo un polielectrolito catiónico soluble en agua. No obstante, cuando el pH se incrementa por encima de 6, los grupos amino se desprotonan y el polímero pierde su carga, haciéndolo insoluble. Las soluciones de ácido acético de concentraciones elevadas, y altas temperaturas pueden depolimerizar el quitosano, y es claro que la solubilidad del quitosano depende de su grado de desacetilación, de la distribución de grupos acetilo y del peso molecular (Zargar *et al.*, 2015). Por esta razón, es entendible que la muestra de quitosano/ácido láctico presente la mayor solubilidad. De otro lado, el glicerol disminuye el pH de la solución, causando un decrecimiento en la solubilidad del polímero.

Muestra	Grado de solubilidad (%)
1 (Control)	4,29 ± 3,47
2 (Quitosano/glicerol)	2,21 ± 1,29
3 (Quitosano/ácido láctico)	5,83 ± 1,95

Tabla 4. Porcentaje de solubilidad de las muestras preparadas.

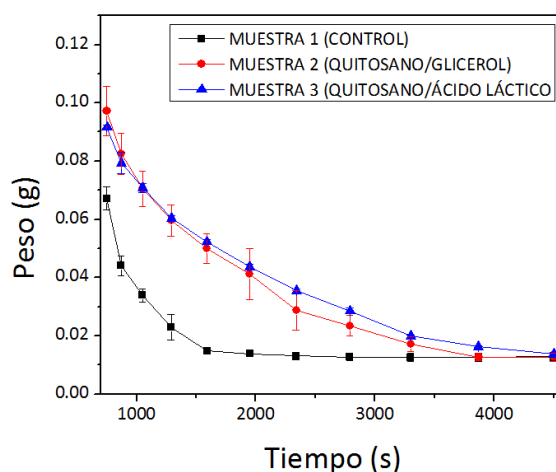


Figura 3. Prueba de solubilidad para las muestras obtenidas.

Prueba de tensión

El módulo de Young, el esfuerzo a la ruptura y la elongación a la ruptura fueron las variables que se utilizaron para evaluar las propiedades mecánicas de las películas obtenidas. Debido a que el agua actúa como plastificante, es necesario que las muestras estén secas para determinar sus propiedades mecánicas (Epure, Griffon, Pollet, & Avérous, 2011). Los valores obtenidos se muestran en la tabla 5, y la figura 3 exhibe las curvas obtenidas de las muestras preparadas. Las películas de quitosano generalmente son frágiles, por lo que la adición de plastificante es necesaria para mejorar sus propiedades mecánicas (Muxika, Etxabide, Uranga, Guerrero, & De La Caba, 2017). La presencia de plastificante mejora la flexibilidad debido a que esta interfiere en las interacciones entre cadenas favoreciendo su movilidad permitiendo aumentar la elongación de las películas, mejorando así su flexibilidad (Tulande *et al.*, 2014). El plastificante reduce las fuerzas intermoleculares y aumenta la movilidad de las cadenas del polímero aumentando la flexibilidad y extensibilidad de la película. El glicerol es miscible con el quitosano lo que permitiría la formación de enlaces de hidrogeno entre NH_3^+ del quitosano y el OH del glicerol (Y. Ma *et al.*, 2017). La presencia de ácido láctico ocasiona un aumento en el módulo de Young debido a la presencia de grupos hidroxilo, y de grupos colgantes. Mientras que el primero permite la formación de fuerzas intermoleculares, los segundos impiden el movimiento molecular.

La adición de glicerol disminuye la resistencia a la tracción debido a que reduce las fuerzas intermoleculares por el establecimiento de los enlaces de hidrógeno con las cadenas poliméricas (Mathew, Brahmakumar, & Abraham, 2006).

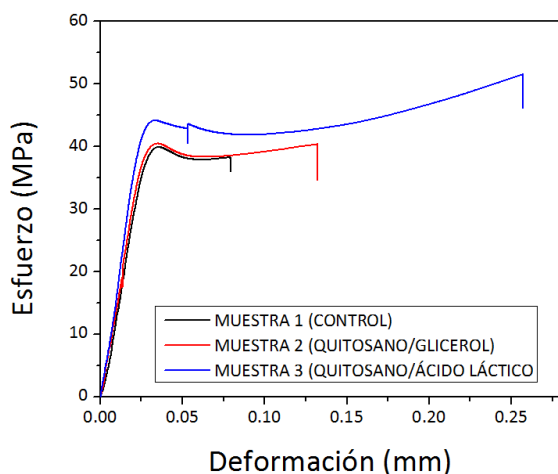


Figura 4. Curvas de esfuerzo deformación de las muestras preparadas.

Aunque algunos reportes indican que el quitosano exhibe módulos de Young menores, estas variaciones dependen tanto del peso molecular como de la forma de preparación (Q. Ma et al., 2016). Por lo tanto, no es sorprendente el hallazgo de un elevado módulo y una muy baja elongación en las muestras preparadas.

	Módulo de Young [MPa]	Elongación a la ruptura [%]	Esfuerzo a la ruptura [MPa]
1	1640,671 ± 304,344	3,971 ± 0,887	38,446 ± 2,622
2	1640,671 ± 304,344	1,691 ± 0,258	17,145 ± 1.992
3	1640,671 ± 304,344	3,187 ± 0,341	41,014 ± 3,229

Tabla 5. Valores obtenidos de la prueba de tensión para cada muestra.

Espectroscopia infrarroja

La figura 4 muestra los espectros obtenidos. Estos fueron graficados en absorbancia y movidos verticalmente para una mayor claridad. En los espectros se observa una banda ancha que oscila entre 3500 cm⁻¹ y 3000 cm⁻¹ que se atribuye a la vibración del estiramiento de NH y de los grupos hidroxilo unidos al hidrógeno (Ren, Yan, Zhou, Tong, & Su, 2017). Esta banda se utiliza como referencia para analizar la

quitina y el quitosano (Brugnerotto et al., 2001). Los picos en 1100 cm⁻¹ se atribuyeron a la vibración de estiramiento de CO en los grupos de COH (Ren et al., 2017). Las bandas localizadas entre 1408 y 1153 cm⁻¹ son atribuidas a la flexión de estiramiento asimétrica del grupo CH₂ y 1073 cm⁻¹ se debe a la vibración esquelética que implica el puente CO del estiramiento del residuo de glucosamina (Kumar et al., 2016). Los picos aproximadamente en 2921 cm⁻¹ y 2875 cm⁻¹ son típicas vibraciones de estiramiento de CH (Y. Ma et al., 2017). La señal que aparece en 1553 cm⁻¹ se atribuye a la vibración de flexión N-H de la amina primaria (Zheng et al., 2009). Se aprecia una banda del grupo C-H a 2900 cm⁻¹. En las tres muestras se puede apreciar la presencia de una banda entre 1180 cm⁻¹ y 953 cm⁻¹ característica de los sacáridos (Liu, Adhikari, Guo, & Adhikari, 2013). Las muestras que contienen los aditivos son bastantes similares a la muestras pura, esto es consecuencia de la pequeña cantidad de componentes (Cardenas & Miranda, 2004).

El espectro de la muestra 3 presenta un pico en aproximadamente en 1700 cm⁻¹ correspondiente a la vibración del carbonilo del ácido carboxílico del ácido láctico (Bourbon et al., 2011) mientras que la pequeña banda en 652 cm⁻¹ corresponde al modo de vibración del OCO (δ) del ácido acético (Mauricio-Sanchez, Salazar, Luna-Barcenas, & Mendoza-Galvan, 2018).

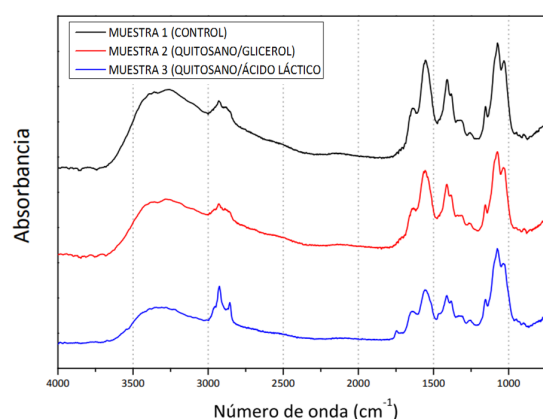


Figura 5. Espectros de las tres muestras preparadas.

Los picos de absorción en 1045 cm⁻¹ y 1117 cm⁻¹ asociada al estiramiento C-O se convierten

en una sola señal por la presencia del glicerol, lo que sugiere las interacciones entre los grupos hidroxilo del quitosano y los puentes de hidrógeno del glicerol (Leceta *et al.*, 2013).

En los espectros FTIR, el método más directo para distinguir la interacción molecular es monitorear los cambios de banda de ciertos grupos de funciones. La presencia del gliderol se evidencia en un desplazamiento de los picos localizados alrededor de 3345 cm^{-1} y 2887 cm^{-1} hacia números de onda inferiores. Esto indica que un debilitamiento de los enlaces de hidrógeno asociados al glicerol. Tal resultado se explica por la naturaleza hidrófila tanto del glicerol, y del quitosano. También se pueden explicar los desplazamientos debido a la baja cantidad de plastificante, ya que éste debilita la resistencia de las interacciones macromoleculares. Además, la desaparición de la banda de absorción de amida -NH_2 en la película que contienen glicerol sugiere que se producen fuertes interacciones entre el glicerol y el quitosano incluso a una baja concentración de plastificante (Kammoun, Haddar, Kallel, Dammak, & Sayari, 2013).

Microscopia de fuerza atómica

El AFM es una herramienta útil para obtener información de las características de la superficie de las muestras preparadas. Para mejorar la calidad de las imágenes se les aplica un filtro (flatten filter) y se realiza una ecualización. Las imágenes de AFM son mostradas en las figuras 6 y 7.

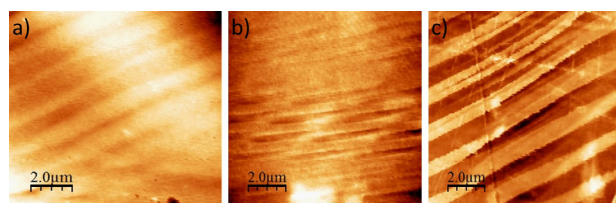


Figura 6. Interfase material-ambiente. a) Muestra 1 (control); b) Muestra 2 (Quitosano/Glicerol); c) Muestra 3 (Quitosano/ácido láctico)

Tal como se puede observar, las muestras preparadas tienen una estructura plana, homogénea, con ligera rugosidad. Este fenómeno es causado por la evaporación del solvente. Diferencias

notables se perciben entre las figuras 5 y 6. Las líneas que aparecen en la interfase molde-material, son producidas al momento de retirar los especímenes del sustrato.

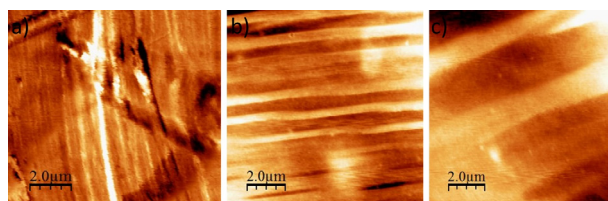


Figura 7. Interfase molde-material. a) Muestra 1 (control); b) Muestra 2 (Quitosano/Glicerol); c) Muestra 3 (Quitosano/ácido láctico).

El quitosano es un polímero polar hidrofílico, con fuerte tendencia a establecer puentes de hidrógeno inter e intramoleculares (L. Wang, Wu, Guo, Gong, & Song, 2015). El ácido acético (usado como solvente) permite una adecuada dispersión, que no es afectada por la presencia de los plastificantes. Por lo tanto, las imágenes no muestran partículas sin disolver, agregados, o coágulos no disueltos. Debido a la buena dispersión, el proceso de evaporación permite la formación de superficies con baja rugosidad. Sin embargo, esta rugosidad permite la interacción del material con microorganismos.

Conclusiones

Se obtuvieron 3 diferentes películas por medio de solvent casting que contienen la misma concentración de quitosano mezclado con glicerol y ácido láctico (la 0,02% y 0,05% respectivamente) las cuales fueron caracterizadas por medio de pruebas de hinchamiento, solubilidad, espectroscopia IR, propiedades mecánicas y AFM.

Las propiedades de las películas cambian ligeramente dependiendo del aditivo que se use. En el caso del ácido láctico, se observó un porcentaje mayor de absorción de agua, mejor elasticidad, de módulo de Young y de resistencia a la tracción respecto a la muestra control por lo que puede considerarse como un plastificante más adecuado para el quitosano, circunstancia causada por la presencia del grupo carboxilo del ácido.

De otro lado, el glicerol permite una mejor interacción entre las cadenas de quitosano debido a la presencia de grupos hidroxilo. El FTIR evidenció en las interacciones entre el polímero y los plastificantes. Dichas interacciones se deben principalmente a la generación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo y los grupos amino.

Dadas las características intrínsecas del quitosano como su alta biodegradabilidad y sus propiedades antimicrobiales, las películas preparadas podrían ser usadas como matrices para cultivos celulares. Al modificar sus propiedades mecánicas, es de esperar que su comportamiento en medio acuoso permita tanto la adhesión celular, como un proceso de degradación lento, lo que podría favorecer su uso como implantes en el campo médico. Esta investigación de hecho abre un abanico de posibilidades en las que se podría estudiar diferentes plastificantes, variando sus concentraciones y así obtener una película con propiedades específicas dependiendo de su uso final.

Referencias

- Anitha, A., Sowmya, S., Kumar, P., Deepthi, S., Chennazhi, K., Ehrlich, H., Tsurkan, H., Jayakumar, R. (2014). Chitin and chitosan in selected biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 39(9), 1644–1667.
- Barbucci, R. (2002). *Integrated biomaterials science*. Springer Science & Business Media.
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., & Gurny, R. (2004). Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(1), 35–52.
- Bernal-Ballén, A., Kuritka, I., & Saha, P. (2016). Preparation and characterization of a bioartificial polymeric material: bilayer of cellulose acetate-PVA. *International Journal of Polymer Science*, 2016.
- Bernal-Ballen, A., Lopez-Garcia, J., Merchan-Merchan, M.-A., & Lehoczy, M. (2018). Synthesis and Characterization of a Bioartificial Polymeric System with Potential Antibacterial Activity: Chitosan-Polyvinyl Alcohol-Ampicillin. *Molecules*, 23(12), 3109.
- Bernal, A., Balkova, R., Kuritka, I., & Saha, P. (2013). Preparation and characterisation of a new double-sided bio-artificial material prepared by casting of poly(vinyl alcohol) on collagen. *Polymer Bulletin*, 70(2), 431–453.
- Bhat, S., & Kumar, A. (2013). Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare. *Biomatter*, 3(3), e24717.
- Boateng, J. S., Matthews, K. H., Stevens, H. N. E., & Eccleston, G. M. (2008). Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(8), 2892–2923.
- Boles, L. R., Bumgardner, J. D., Fujiwara, T., Haggard, W. O., Guerra, F. D., & Jennings, J. A. (2019). Characterization of trimethyl chitosan/polyethylene glycol derivatized chitosan blend as an injectable and degradable antimicrobial delivery system. *International Journal of Biological Macromolecules*, 133, 372–381.
- Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C., Cerqueira, M. A., Rocha, C. M. R., Avides, M. C., Quintas, M. A. C., & Vicente, A. A. (2011). Physicochemical characterization of chitosan-based edible films incorporating bioactive compounds of different molecular weight. *Journal of Food Engineering*, 106(2), 111–118.
- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Argüelles-Monal, W., Desbrieres, J., & Rinaudo, M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42(8), 3569–3580.
- Brun, V., Guillaume, C., Mechiche Alami, S., Josse, J., Jing, J., Draux, F., ... others. (2014). Chitosan/hydroxyapatite hybrid scaffold for bone tissue engineering. *Bio-Medical Materials*

and Engineering, 24(s1), 63–73.

Cardenas, G., & Miranda, S. P. (2004). FTIR and TGA studies of chitosan composite films. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 49(4), 291–295.

Chen, H., Hu, X., Chen, E., Wu, S., McClements, D. J., Liu, S., ... Li, Y. (2016). Preparation, characterization, and properties of chitosan films with cinnamaldehyde nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*, 61, 662–671.

Chen, M., Runge, T., Wang, L., Li, R., Feng, J., Shu, X.-L., & Shi, Q.-S. (2018). Hydrogen bonding impact on chitosan plasticization. *Carbohydrate Polymers*, 200, 115–121.

Debandi, M. V, Bernal, C., & Francois, N. J. (2016). Development of biodegradable films based on chitosan/glycerol blends suitable for biomedical applications. *J. Tissue Sci. Eng*, 3.

Di Martino, A., Sittinger, M., & Risbud, M. V. (2005). Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*, 26(30), 5983–5990.

Epure, V., Griffon, M., Pollet, E., & Avérous, L. (2011). Structure and properties of glycerol-plasticized chitosan obtained by mechanical kneading. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 947–952.

Gourlay, T. (2001). Biomaterial development for cardiopulmonary bypass. *Perfusion*, 16(5), 381–390.

Joshi, J. R., & Patel, R. P. (2012). Role of biodegradable polymers in drug delivery. *Int J Curr Pharm Res*, 4(4), 74–81.

Kammoun, M., Haddar, M., Kallel, T. K., Dammak, M., & Sayari, A. (2013). Biological properties and biodegradation studies of chitosan biofilms plasticized with PEG and glycerol. *International Journal of Biological Macromolecules*, 62, 433–438.

Khan, F., & Tanaka, M. (2018). Designing

smart biomaterials for tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 17.

Kim, J. H., Kim, J. Y., Lee, Y. M., & Kim, K. Y. (1992). Properties and swelling characteristics of cross-linked poly (vinyl alcohol)/chitosan blend membrane. *Journal of Applied Polymer Science*, 45(10), 1711–1717.

Kumar, S., Deepak, V., Kumari, M., & Dutta, P. K. (2016). Antibacterial activity of diisocyanate-modified chitosan for biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 84, 349–353.

Langer, R., & Tirrell, D. A. (2004). Designing materials for biology and medicine. *Nature*, 428(6982), 487–492.

Leceta, I., Guerrero, P., & la Caba, K. (2013). Functional properties of chitosan-based films. *Carbohydrate Polymers*, 93(1), 339–346.

Liu, H., Adhikari, R., Guo, Q., & Adhikari, B. (2013). Preparation and characterization of glycerol plasticized (high-amylose) starch--chitosan films. *Journal of Food Engineering*, 116(2), 588–597.

Ma, Q., Zhang, Y., Critzer, F., Davidson, P. M., Zivanovic, S., & Zhong, Q. (2016). Physical, mechanical, and antimicrobial properties of chitosan films with microemulsions of cinnamon bark oil and soybean oil. *Food Hydrocolloids*, 52, 533–542.

Ma, Y., Xin, L., Tan, H., Fan, M., Li, J., Jia, Y., ... Hu, X. (2017). Chitosan membrane dressings toughened by glycerol to load antibacterial drugs for wound healing. *Materials Science and Engineering: C*, 81, 522–531.

Marsano, E., Vicini, S., Skopińska, J., Wisniewski, M., & Sionkowska, A. (2004). Chitosan and poly(vinyl pyrrolidone): Compatibility and miscibility of blends. *Macromolecular Symposia*, 218, 251–260.

- Mathew, S., Brahmakumar, M., & Abraham, T. E. (2006). Microstructural imaging and characterization of the mechanical, chemical, thermal, and swelling properties of starch--chitosan blend films. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 82(2), 176–187.
- Mauricio-Sanchez, R. A., Salazar, R., Luna-Barcenas, J. G., & Mendoza-Galvan, A. (2018). FTIR spectroscopy studies on the spontaneous neutralization of chitosan acetate films by moisture conditioning. *Vibrational Spectroscopy*, 94, 1–6.
- Muxika, A., Etxabide, A., Uranga, J., Guerrero, P., & De La Caba, K. (2017). Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 1358–1368.
- Osorio-Delgado, M. A., Henao-Tamayo, L. J., Velasquez-Cock, J. A., Canas-Gutierrez, A. I., Restrepo-Munera, L. M., Ganan-Rojo, P. F., ... Castro-Herazo, C. I. (2017). Biomedical applications of polymeric biomaterials. *Dyna*, 84(201), 241–252.
- Pillai, C. K. S., Paul, W., & Sharma, C. P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34(7), 641–678.
- Pineda-Castillo, S., Bernal-Ballén, A., Bernal-López, C., Segura-Puello, H., Nieto-Mosquera, D., Villamil-Ballesteros, A., ... Munster, L. (2018). Synthesis and Characterization of Poly (Vinyl Alcohol)-Chitosan-Hydroxyapatite Scaffolds: A Promising Alternative for Bone Tissue Regeneration. *Molecules*, 23(10), 2414.
- Prateepchanachai, S., Thakhiew, W., Devahastin, S., & Soponronnarit, S. (2017). Mechanical properties improvement of chitosan films via the use of plasticizer, charge modifying agent and film solution homogenization. *Carbohydrate Polymers*, 174, 253–261.
- Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., & Lemons, J. E. (2006). *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. MRS Bull, 31, 59.
- Ren, L., Yan, X., Zhou, J., Tong, J., & Su, X. (2017). Influence of chitosan concentration on mechanical and barrier properties of corn starch/chitosan films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 1636–1643.
- Rivero, S., Damonte, L., Garcia, M. A., & Pinotti, A. (2016). An insight into the role of glycerol in chitosan films. *Food Biophysics*, 11(2), 117–127.
- Sabbah, M., Di Pierro, P., Cammarota, M., Dell'Olmo, E., Arciello, A., & Porta, R. (2019). Development and properties of new chitosan-based films plasticized with spermidine and/or glycerol. *Food Hydrocolloids*, 87, 245–252.
- Saini, M., Singh, Y., Arora, P., Arora, V., & Jain, K. (2015). Implant biomaterials: A comprehensive review. *World Journal of Clinical Cases: WJCC*, 3(1), 52.
- Sedlařík, V., Saha, N., Kuřitka, I., & Sába, P. (2006). Preparation and Characterization of Poly (vinyl alcohol)/Lactic Acid Compounded Polymeric Films. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 11(4), 253–270.
- Sembatya, K. R., Liu, Z., Mikrani, R., & Zhou, X. (2019). An overview of polymer biomedical materials used in cardiology.
- Sheikh, Z., Hamdan, N., Ikeda, Y., Grynpas, M., Ganss, B., & Glogauer, M. (2017). Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review. *Biomaterials Research*, 21(1), 9.
- Shi, Z., Neoh, K. G., Kang, E. T., & Wang, W. (2006). Antibacterial and mechanical properties of bone cement impregnated with chitosan nanoparticles. *Biomaterials*, 27(11), 2440–2449.
- Silva, S. S., Caridade, S. G., Mano, J. F., & Reis,

- R. L. (2013). *Effect of crosslinking in chitosan/ aloe vera-based membranes for biomedical applications*. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 581–588.
- Singh, R., Shitiz, K., & Singh, A. (2017). *Chitin and chitosan: Biopolymers for wound management*. *International Wound Journal*, 14(6), 1276–1289.
- Sionkowska, A. (2011). *Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review*. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 36(9), 1254–1276.
- Srinivasa, P. C., Ramesh, M. N., Kumar, K. R., & Tharanathan, R. N. (2003). *Properties and sorption studies of chitosan--polyvinyl alcohol blend films*. *Carbohydrate Polymers*, 53(4), 431–438.
- Sumarni, W., Prasetya, A. T., & Rahayu, E. F. (2017). *Effect of Glycerol on Physical Properties of Biofilms Gembili Starch (Dioscorea Esculenta)-Chitosan*. *Proceeding of Chemistry Conference*, 2, 56–65.
- Suyatma, N. E., Copinet, A., Tighzert, L., & Coma, V. (2004). *Mechanical and barrier properties of biodegradable films made from chitosan and poly (lactic acid) blends*. *Journal of Polymers and the Environment*, 12(1), 1–6.
- Tulande, J., Penaranda, J., & Mina, J. (2014). *Desarrollo de apositos de quitosano para su posible aplicacion en la regeneracion de tejido epitelial. Primera parte: Caracterizacion mecanica*. *Revista Colombiana de Materiales*, (5), 56–63.
- Wang, L., Wu, J., Guo, Y., Gong, C., & Song, Y. (2015). *Topographic characterization of the self-assembled nanostructures of chitosan on mica surface by atomic force microscopy*. *Applied Surface Science*, 353, 757–763.
- Wang, S., & Jing, Y. (2017). *Study on the barrier properties of glycerol to chitosan coating layer*. *Materials Letters*, 209, 345–348.
- Williams, D. F. (2009). *On the nature of biomaterials*. *Biomaterials*, 30(30), 5897–5909.
- Yang, J. M., Su, W. Y., Leu, T. L., & Yang, M. C. (2004). *Evaluation of chitosan/PVA blended hydrogel membranes*. *Journal of Membrane Science*, 236(1–2), 39–51.
- Zargar, V., Asghari, M., & Dashti, A. (2015). *A review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications*. *ChemBioEng Reviews*, 2(3), 204–226.
- Zheng, Z., Zhang, L., Kong, L., Wang, A., Gong, Y., & Zhang, X. (2009). *The behavior of MC3T3-E1 cells on chitosan/poly-L-lysine composite films: Effect of nanotopography, surface chemistry, and wettability*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 89(2), 453–465.

