



Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

Síntesis y caracterización fisicoquímica de un andamio celular a base de quitosano biológico-químico y colágena tipo I.

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Q.A. Itzel Jimena Corona Suárez

Directora de tesis:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

Septiembre 2013

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNCP) del CONACYT, con la referencia 001465”.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto. El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamiento de la Secretaría de Ciencia, Innovación y Tecnología del Distrito Federal (PICSO12-152).

La evaluación de la viabilidad de los fibroblastos se realizó en el laboratorio de Biotecnología del Instituto Nacional de Rehabilitación, bajo la asesoría de la Dra. María Cristina Velasquillo Martínez.

México D.F. a 5 de septiembre de 2013

El H. Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

Síntesis y caracterización fisicoquímica de un andamio celular a base de quitosano biológico-químico y colágena tipo I.

Que presentó:

Q.A. Itzel Jimena Corona Suárez

Comité tutorial:

Directora de tesis:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología.
Laboratorio de Biopolímeros.

Asesores:

Dr. Miquel Gimeno Seco.

Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Dr. Alberto López Luna

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología.
Laboratorio de Biopolímeros.

H. Jurado:

Presidente:

Dr. Miquel Gimeno Seco.

Secretario:

Dr. Humberto González Márquez.

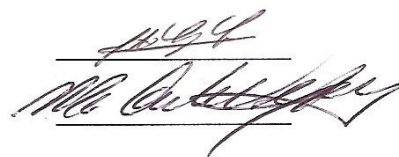

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa,
Departamento de Ciencias de la Salud

Vocales:

Dr. Alberto López Luna.

Dra. María Cristina Velasquillo Martínez.

Biotecnología. Instituto Nacional de Rehabilitación.



*“No pessimist ever discovered the secret of the stars or sailed an uncharted land,
or opened a new doorway for the human spirit”.*

-Helen Keller.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma Metropolitana y a CONACYT por el financiamiento otorgado para la realización del presente trabajo.

A la Dra. Keiko Shirai por aceptarme como su alumna desde la licenciatura y apoyarme con sus conocimientos y tiempo, así como con sus consejos y accesibilidad dentro y fuera del laboratorio.

Al Dr. Miquel Gimeno por creer en el proyecto, por sus observaciones, accesibilidad y consejos durante el desarrollo del mismo.

Al Dr. Alberto López por su amistad, asesoramiento y comentarios que mejoraron este trabajo.

Al Dr. Humberto González por su asesoramiento y observaciones que enriquecieron este escrito.

A la Dra. Cristina Velasquillo por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y sus comentarios que enriquecieron este trabajo.

Al M. en C. Lenin Tamay por todo el tiempo requerido para tomar las micrografías en el microscopio confocal y por las pláticas que hicieron más amena mi estancia en el instituto.

A la Biol. Nadia Vázquez por el apoyo en los cultivos celulares y por tomarse el tiempo en enseñarme las técnicas que me eran ajenas. De igual forma, agradezco las pláticas que tuvimos y por hacer mi estancia en el instituto más agradable.

A mis amigos del laboratorio y/o laboratorios contiguos: Monse, Lupita, Facundo, Rut, Polo, Alberto, Liz, Carmen Juárez, Zay, Andrés y Leonor, por apoyarme siempre dentro y fuera del laboratorio, por su tiempo, las pláticas que mantuvimos, risas, lágrimas y todas las vivencias que compartimos. Les agradezco, porque todos me enseñaron algo dentro y fuera del ámbito académico, créanme que me llevo lo mejor de cada uno. Gracias a ustedes, concluyo esta etapa de mi vida siendo un poco más sabia y mejor persona. ¡Los quiero!

Finalmente a todas las personas que conocí y contribuyeron de alguna forma en mi desarrollo durante mi estancia en la UAM-I, a mis maestros, compañeros y amigas de la maestría.

¡A todos gracias!

Dedicatorias

A Dios por llenarme de bendiciones, darme la oportunidad de conocer a tanta gente y permitirme crecer en lo académico y en lo personal día con día.

A mi mamá porque gracias a su apoyo, confianza y amor he realizado uno más de mis sueños. Agradezco todos tus sacrificios, esfuerzo, comprensión, consejos, tiempo y amor incondicional que siempre me has dado. ¡Eres la mejor!

A mi padre, porque has estado presente de una u otra forma en todas las etapas de mi vida. Gracias por tu cariño.

A mi hermana por estar conmigo, por tu cariño, apoyo, protección y por siempre creer y tener fe en mí y en mis locos sueños.

A mi tío, que aunque estés lejos siempre has estado presente. Gracias por tu cariño y apoyo.

A mis tíos, Alfredo y Froy por su apoyo, por compartir sus vivencias y punto de vista.

A Francisco, por apoyarme y darme ánimos cada vez que me frustré o decaía. Por compartir este tiempo conmigo, tu cariño, buen humor y amistad.

“The best and most beautiful things in the world

Cannot be seen or even touched.

They must be felt within the heart”.

-Helen Keller.

Contenido

CONTENIDO	VI
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
1 INTRODUCCIÓN	1
2 MARCO TEÓRICO	2
2.1 INGENIERÍA DE TEJIDOS.....	2
2.1.1 <i>Andamio</i>	2
2.2 QUITINA.....	3
2.2.1 <i>Definición y estructura química</i>	3
2.2.2 <i>Métodos de obtención de la quitina y quitosano</i>	4
2.3 QUITOSANO.....	5
2.3.1 <i>Definición y estructura química</i>	5
2.3.2 <i>Propiedades fisicoquímicas</i>	5
2.3.3 <i>Propiedades antimicrobianas</i>	6
2.4 COLÁGENA.	6
2.4.1 <i>Definición</i>	6
2.4.2 <i>Colágena utilizada en ingeniería de tejidos</i>	7
2.5 PIEL.....	9
2.6 ANDAMIOS PARA CRECIMIENTO CELULAR EN INGENIERÍA DE TEJIDOS.....	10
3 ANTECEDENTES	11
3.1 QUITOSANO UTILIZADO EN LA INGENIERÍA DE TEJIDOS.....	11
3.2 QUITOSANO MODIFICADO CON COLÁGENA Y SU USO EN BIOMEDICINA.	12
4 JUSTIFICACIÓN	14
5 HIPÓTESIS	15
6 OBJETIVO GENERAL	16
7 OBJETIVOS PARTICULARES	16
8 METODOLOGÍA	17
8.1 EXTRACCIÓN DE QUITINA.	17

8.1.1	<i>Desmineralización química de quitina</i>	18
8.1.2	<i>Desproteínización química de quitina</i>	18
8.2	CARACTERIZACIÓN DE QUITINA.	18
8.2.1	<i>Cenizas</i>	18
8.2.2	<i>Nitrógeno total</i>	18
8.2.3	<i>Nitrógeno proteico</i>	18
8.3	OBTENCIÓN DE QUITOSANO (DESACETILACIÓN DE QUITINA).	19
8.4	CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANO.	19
8.4.1	<i>Determinación de solubles</i>	19
8.4.2	<i>Determinación del peso molecular mediante viscosidad intrínseca</i>	19
8.4.3	<i>Grado de acetilación por ¹HRMN</i>	19
8.4.4	<i>Difracción de rayos X</i>	20
8.5	OBTENCIÓN DE LA COLÁGENA PORCINA TIPO I.	20
8.6	CARACTERIZACIÓN DE LA COLÁGENA PORCINA TIPO I.	20
8.7	SÍNTESIS DEL ANDAMIO DE QUITOSANO Y COLÁGENA PORCINA TIPO I.....	20
8.7.1	<i>Andamio poroso - Método 1. Iniciación térmica</i>	20
8.7.2	<i>Andamio poroso – Método 2. Entrecruzamiento con glutaraldehído</i>	21
8.7.3	<i>Andamio película– Método 1. Película de quitosano</i>	21
8.7.4	<i>Andamio película – Método 2. Película de quitosano-co-cítrico</i>	21
8.7.5	<i>Andamio película – Método 3. Película de quitosano-co-cítrico recubierta de colágena porcina tipo I</i>	22
8.8	CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS POROSOS.	22
8.8.1	<i>Espesor</i>	22
8.8.2	<i>Microscopía de fluorescencia</i>	22
8.8.3	<i>Microscopía electrónica de barrido (SEM)</i>	23
8.8.4	<i>Tamaño de poro</i>	23
8.8.5	<i>Espectrometría de infrarrojo (ATR-FTIR)</i>	23
8.8.6	<i>Prueba de hinchamiento</i>	23
8.8.7	<i>Prueba de erosión</i>	24
8.9	CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS EN FORMA DE PELÍCULA.	24
8.9.1	<i>Espesor</i>	24
8.9.2	<i>Espectrometría de infrarrojo (ATR-FTIR)</i>	24
8.9.3	<i>Prueba de hinchamiento</i>	24
8.9.4	<i>Prueba de erosión</i>	24

8.9.5	<i>Prueba antimicrobiana con Pseudomonas aeruginosa.</i>	25
8.10	EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DEL ANDAMIO CON FIBROBLASTOS MEDIANTE EL MÉTODO DE CALCEÍNA AM (ADHESIÓN Y VIABILIDAD).	25
8.10.1	<i>Preparación de los polímeros.</i>	25
8.10.2	<i>Sembrado de los polímeros.</i>	25
8.10.3	<i>Prueba con calceína (adhesión y viabilidad).</i>	26
9	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
9.1	EXTRACCIÓN DE QUITINA POR MÉTODO BIOLÓGICO-QUÍMICO.	27
9.2	OBTENCIÓN DE QUITOSANO.	28
9.3	OBTENCIÓN DE COLÁGENA PORCINA TIPO I.	31
9.4	CARACTERIZACIÓN DE COLÁGENA PORCINA TIPO I.	31
9.5	CARACTERIZACIÓN DE COLÁGENA COMERCIAL EXTRAÍDA DE PIEL DE TERNERA.	32
9.6	SÍNTESIS DE ANDAMIOS POROSOS BASADOS EN QUITOSANO Y COLÁGENA PORCINA TIPO I.	34
9.6.1	<i>Método de mezcla e iniciación térmica de formación de cadenas de colágena.</i>	34
9.6.2	<i>Método de entrecruzamiento de quitosano y colágena con glutaraldehído.</i>	39
9.6.3	<i>Rendimiento.</i>	44
9.6.4	<i>Espesor.</i>	44
9.6.5	<i>Prueba de hinchamiento.</i>	44
9.6.6	<i>Prueba de erosión.</i>	47
9.6.7	<i>Viabilidad celular mediante el método de calceína AM.</i>	49
9.7	SÍNTESIS DE PELÍCULAS CON BASE EN QUITOSANO Y COLÁGENA PORCINA TIPO I.	53
9.7.1	<i>Películas de quitosano-co-cítrico.</i>	53
Fracción molar		54
Purificación de las películas de quitosano-co-cítrico.		55
Espesor de las películas purificadas.		56
Espectrofotometría de infrarrojo (ATR-FTIR).		57
9.7.2	<i>Películas de quitosano-co-cítrico recubiertas con colágena porcina tipo I.</i>	62
9.7.3	<i>Prueba de hinchamiento de las películas de quitosano-co-cítrico y quitosano-co-cítrico cubiertas con colágena porcina tipo I.</i>	63
9.7.4	<i>Prueba de erosión de las películas de quitosano-co-cítrico y quitosano-co-cítrico cubiertas con colágena porcina tipo I.</i>	65
9.7.5	<i>Prueba antimicrobiana de las películas de quitosano, quitosano-co-cítrico y quitosano-co-cítrico cubiertas de colágena porcina tipo I.</i>	67

9.7.6	<i>Viabilidad celular con método de calceína AM de las películas de quitosano, quitosano-co-cítrico y quitosano-co-cítrico cubiertas de colágena porcina tipo I.</i>	69
10	CONCLUSIONES	75
11	BIBLIOGRAFÍA	77
12	ANEXOS	85
12.1	ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) Y COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE MEDIAS TUKEY DEL HINCHAMIENTO DE LOS MATERIALES POROSOS.	85
12.2	ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) Y COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE MEDIAS TUKEY DE LA EROSIÓN DE LOS MATERIALES POROSOS.	86
12.3	ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) Y COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE MEDIAS TUKEY DEL HINCHAMIENTO DE LOS MATERIALES EN FORMA DE PELÍCULA.	87
12.4	ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) Y COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE MEDIAS TUKEY DE LA EROSIÓN DE LOS MATERIALES EN FORMA DE PELÍCULA.	87
12.5	ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) Y COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE MEDIAS TUKEY DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS MATERIALES EN FORMA DE PELÍCULA.	88

Resumen

La ingeniería de tejidos combina las técnicas del cultivo celular, la ingeniería de materiales y la bioquímica para reparar o reemplazar parcial o totalmente un tejido. En el caso de la aplicación a piel, se busca producir una estructura de piel funcional con propiedades de barrera, protección contra irradiación UV, termorregulación, mecánicas y estéticas.

Se sintetizaron dos tipos de andamios con diferente morfología, a partir de quitosano extraído de desechos de camarón y colágena porcina tipo I. Los andamios con estructura porosa se obtuvieron a partir de dos metodologías: iniciación térmica de las cadenas de colágena y por entrecruzamiento químico con glutaraldehído. Se midieron como variables respuesta el porcentaje de hinchamiento, erosión y la viabilidad celular con fibroblastos, el material sintetizado mediante iniciación térmica con quitosano comercial permitió la elongación de los fibroblastos.

Por otro lado, se realizaron materiales en forma de película mediante la síntesis de quitosano-co-cítrico y posteriormente se recubrieron con colágena porcina tipo I. Las variables respuesta fueron el porcentaje de hinchamiento, erosión, actividad antimicrobiana y la viabilidad celular. Las películas de quitosano-co-cítrico con quitosano comercial y quitosano-co-cítrico cubierto con colágena realizado con quitosano biológico-químico y comercial presentaron mayor hinchamiento y con erosiones similares, además de presentar actividad antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa*. A pesar de que estos materiales presentaron proliferación de fibroblastos solo las películas de quitosano-co-cítrico con y sin colágena hechas a partir de quitosano comercial permitieron la diferenciación de los fibroblastos a su forma alargada.

Se requiere un estudio más profundo sobre las diferencias estructurales de los Q biológico-químico y comercial para comprender el comportamiento de los fibroblastos humanos en estos materiales. En virtud de que los Q presentaron diferencias significativas en la cristalinidad y grado de acetilación, ya que el polímero obtenido parcialmente por biotecnología conservó una alta cristalinidad y bajo grado de acetilación mientras que el comercial es amorfo y con mayor cantidad de grupos acetilo.

Abstract

Tissue engineering is a multidisciplinary science, combines cell techniques, material engineer and biochemistry to repair or create partial or complete tissue. In tissue engineering for skin, the goal is yield functional skin that provides protection against UV irradiation, thermoregulation, mechanical, esthetic and wall properties.

Two types of scaffolds morphology were synthesized with chitosan and porcine collagen type I. Chitosans employed were commercial and other prepared from biologically extracted chitin. The scaffolds with porous structure were obtained by two methodologies: thermal triggering and chemical crosslinking with glutaraldehyde. Response variables were the percentage of swelling, erosion and fibroblasts viability. The material synthesized from thermal triggering with commercial chitosan allowed fibroblasts elongation.

Furthermore, materials were made as films using synthesized chitosan-co-citric and subsequently coated with collagen type I. Response variables were the percentage of swelling, erosion, antimicrobial activity and fibroblast viability. The films of chitosan-co-citric with commercial chitosan and chitosan-co-citric covered with collagen and biological-chemical chitosan and commercial showed higher swelling than other materials but similar erosions. In addition the antimicrobial activities against *Pseudomonas aeruginosa* were determined. In despite of all the materials allowed fibroblast viability only elongation was observed with commercial chitosan co-citric films with and without.

Further work on structural differences of biological-chemical chitosan and commercial is undergoing, in order to understand the behavior of human fibroblasts in these materials. Considering that chitosans display significant differences on crystallinity and acetylation degree(DA), since the polymer obtained by biological-chemical methodology retained high crystallinity and low DA while the commercial is an amorphous molecule and with more acetylated groups.

1 INTRODUCCIÓN

La ingeniería de tejidos es una ciencia multidisciplinaria que combina el cultivo celular, la ingeniería de materiales y la bioquímica para reparar o reemplazar parcial o totalmente tejidos. En el caso de la ingeniería de tejidos aplicada a piel, la meta es producir una estructura que ofrezca la rápida y completa regeneración de piel funcional, que le permita cumplir sus funciones como: formación de barrera, protección contra irradiación UV, termorregulación, mecánicas y estéticas (Ma *et al*, 2003); para ello es necesario contar con un material que sea biocompatible y que permita la adhesión y diferenciación de las células epiteliales (andamio).

Existen diferentes materiales (naturales y sintéticos) utilizados en la fabricación de andamios celulares, dentro de los naturales se encuentran el quitosano y la colágena. El quitosano tiene propiedades biofuncionales tales como, antimicrobiano, biodegradable y biocompatible. La colágena tipo I es el componente principal de la piel por lo que ofrece un ambiente adecuado para la inducción de la unión y diferenciación celular (Liu *et al* 2011).

La Secretaría de Salud, en México en 2011 reportó un promedio anual de 115 mil casos de accidentes por quemaduras y casi 13mil hospitalizaciones relacionadas con esta causa. Las quemaduras producen la desnaturalización de las proteínas, edema y pérdida de líquido intravascular debido a un aumento de la permeabilidad vascular (Secretaría de Salud, 2009). Los tratamientos de estas heridas son principalmente injertos de piel y cultivos celulares, siendo estos últimos una medida no disponible para la mayoría de la población, ya que su costo es alto y actualmente no se cuentan con materiales cuya tecnología haya sido desarrollada en nuestro país.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Ingeniería de tejidos.

La ingeniería de tejidos es una ciencia multidisciplinaria que combina el conocimiento y tecnología del cultivo celular, la ingeniería de materiales y factores bioquímicos para crear órganos y tejidos artificiales ó para regenerar tejidos dañados (Langer y Vacanti, 1993). Esto involucra el sembrar células en andamios para su crecimiento *in vitro* y finalmente puedan ser implantadas en el cuerpo del paciente como una prótesis (Rabkin y Schoen, 2002). El proceso general de la ingeniería de tejidos se muestra en el diagrama 1.

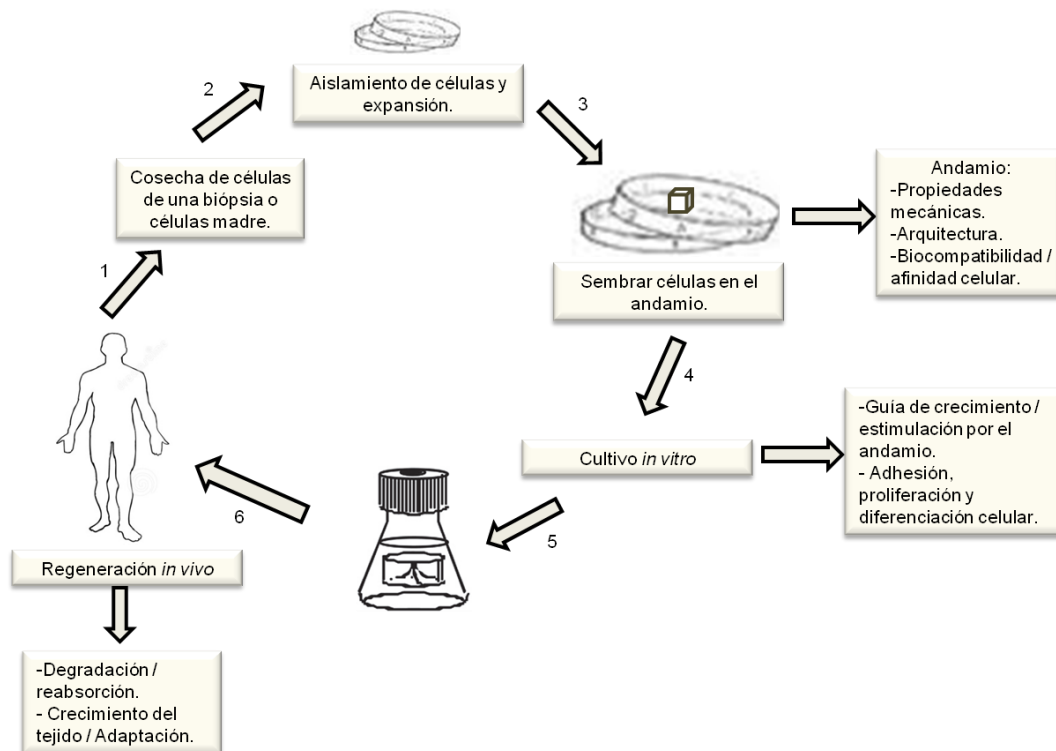


Diagrama 1. Proceso general de la ingeniería de tejidos.

2.1.1 Andamio.

Un andamio es una estructura o soporte inicial que permite la adhesión, proliferación y diferenciación celular, así como síntesis de matriz extracelular que provee de integridad estructural al tejido en formación (Agrawal y Ray, 2001; Sachols *et al*, 2003).

Acorde con Liu y Cao (2011), el andamio ideal tiene las siguientes características:

- a) Biocompatibilidad: los productos de degradación del material no deben de ser dañinos para las células en crecimiento. Debe permitir la adhesión, proliferación y diferenciación de las células.
- b) Biodegradabilidad: después de la formación del tejido, el andamio debe degradarse por completo.
- c) Estructura tridimensional y porosa: la porosidad debe cubrir el 90% del volumen o área. Se recomienda esta estructura para que las células puedan formar la matriz extracelular y los nutrientes y productos de desecho de las células puedan ser transportados.
- d) Plasticidad y buenas propiedades mecánicas: los andamios deben tener cierta plasticidad para poder formar un tejido funcional.
- e) Adecuada interacción entre la superficie del andamio y las células, ésta permite la expresión del fenotipo celular adecuado, así como la adhesión y la proliferación.
- f) Fabricación sencilla: para que el andamio sea de bajo costo y pueda ser aplicado ampliamente.
- g) Fácil de esterilizar.

Acorde al material utilizado en la síntesis, los andamios pueden ser:

- a) Naturales: son derivados de plantas y animales, están compuestos por proteínas o carbohidratos. Los más utilizados son: colágena, gelatina, glicosaminoglicanos, ácido hialurónico, fibrina y quitosano.
- b) Sintéticos: se producen a partir de polímeros sintéticos, se diseñan para tener ciertas características de degradación, tamaño de poro, porosidad y otras propiedades fisicoquímicas. La ventaja de utilizar un material sintético es que existe menor riesgo de provocar alguna respuesta inmune y de transferir patógenos al hospedero (Liu y Cao, 2011).

2.2 Quitina.

2.2.1 Definición y estructura química.

La quitina es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza, después de la celulosa. Se encuentra en el exoesqueleto de insectos, crustáceos, artrópodos, anélidos,

moluscos, celenterados, componentes de la pared celular de algunos hongos así como de las algas (Shahidi *et al*, 1999). Su fuente principal a nivel comercial es el exoesqueleto de camarón y cangrejo (Percot *et al*, 2003).

La quitina es un polisacárido que está constituido por residuos de *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) ó 2-acetamido-2desoxi-beta-D-glucosa (Shahidi *et al*, 1999) enlazadas por unión beta 1-4 (Figura 1). La quitina presenta tres formas polimórficas: alfa, beta y gama, que difieren en el arreglo de las cadenas moleculares. La alfa quitina es la más abundante, presenta cadenas no paralelas y es la más compacta y cristalina. La forma beta está conformada por cadenas paralelas; mientras que en la gama quitina se extienden dos cadenas hacia arriba por cada cadena que se encuentra hacia abajo. Se cree que dicho polimorfismo se debe a la función que desempeña el polímero en el ser vivo y no al grupo biológico al que pertenece el animal. La forma alfa es la más estable y está asociada con depósitos minerales, la beta y la gama están ligadas a proteínas del tipo colágeno y proporcionan tenacidad, flexibilidad y movilidad (Muzzarelli, 1978).

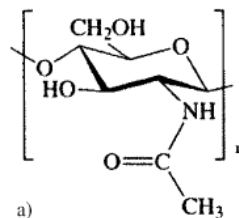


Figura 1. Estructura química de la quitina, monómero de 2-acetamido-2desoxi-beta-D-glucosa (N-acetil-D-glucosamina)

2.2.2 Métodos de obtención de la quitina y quitosano.

La composición química de la quitina es variable en longitud, porcentaje de grupos acetamida y la posición de estos últimos a lo largo de la cadena (Pastor, 2004). El proceso químico para la obtención de quitina, a partir de los desechos de crustáceos, consiste de dos pasos: desproteización en medio alcalino (NaOH) y desmineralización en medio ácido (HCl), con un lavado que neutralice el pH (Johnson y Peniston, 1982). Debido a que este proceso no es ecológicamente viable, se han desarrollado otras técnicas de purificación como son: métodos enzimáticos de des-proteinización (Synowiecki *et al*, 2003; Mayren, 2013), así como la fermentación láctica de desechos de camarón (Cira *et al*, 2002).

El quitosano es un subproducto de la quitina que se obtiene mediante desacetilación; la cual se lleva a cabo en medio alcalino (KOH, NaOH) a concentraciones elevadas de 40-60% y a diferentes temperaturas (Lamarque *et al*, 2005). Se pueden realizar dos tipos de desacetilación: homogénea y heterogénea. La primera es a temperatura ambiente durante periodos largos pero se obtienen valores de desacetilación bajos. En la segunda, se utilizan temperaturas altas (100-140°C) y la desacetilación sucede en las regiones amorfas del biopolímero obteniéndose valores de desacetilación mayores (Nemtsev *et al*, 2002).

2.3 Quitosano.

2.3.1 Definición y estructura química.

El quitosano es el derivado *N*-desacetilado de la quitina (Figura 2), cuyas unidades de glucosamina se encuentran unidas mediante enlaces glucosídicos α 1-4 (Shahidi *et al*, 1999).

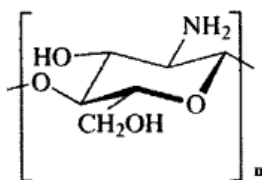


Figura 2. Estructura química del quitosano.

2.3.2 Propiedades fisicoquímicas.

El quitosano es soluble en soluciones acuosas o alcohólicas de ácidos orgánicos e inorgánicos $\text{pH} < 6$. Es muy estable y poco sensible a la humedad, se descompone a temperaturas mayores de 185°C (Rabea *et al*, 2003). Tiene tres grupos funcionales reactivos, amino y los hidroxilos del C-3 y C-6; la modificación química o enzimática de éstos así como la regeneración de la reacción, incrementa la biofuncionalidad de los productos de la molécula (Hirano, 1999; Torres *et al.*, 2012).

Es una sustancia biodegradable, citocompatible, presenta actividad antimicrobiana (Rabea *et al*, 2003). Su pureza, grado de desacetilación, peso molecular, viscosidad y estructura polimórfica varían de acuerdo con su proceso de producción (Goosen, 1997).

2.3.3 Propiedades antimicrobianas.

El quitosano se ha utilizado como agente antimicrobiano de manera satisfactoria sobre: *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Drechtera sorokiana*, *Micronectriella nivallis*, *Piricularia orizae*, *Rhizoctonia solanii*, *Trichophyton equinum*, algas y algunas bacterias Gram positivas y negativas como: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus*. (Rabea *et al*, 2003; Andres *et al*, 2010). La acción antimicrobiana está influenciada por factores intrínsecos como: tipo de quitosano, peso molecular, pH del medio de cultivo, condiciones ambientales, el hospedero, la composición química y nutritiva del sustrato, grado de despolimerización y la presencia o ausencia de sustancias que interfieran como lípidos y proteínas. Se ha demostrado que la actividad inhibitoria del quitosano contra hongos fitopatógenos es más efectiva a pH de 6 o menor que a pH de 7.5, esto es debido porque a pH más ácidos los grupos aminos se encuentran protonados y por lo tanto con carga positiva (Rabea *et al*, 2003; Plascencia *et al.*, 2003; Pacheco *et al.*, 2008).

Se ha observado que el peso molecular del quitosano, tiene un efecto en la actividad antimicrobiana que presenta contra bacterias. Presentando efecto bacteriostático cuando el peso molecular es bajo y efecto bactericida a mayor peso molecular (Eaton *et al*, 2008). De acuerdo con Andres (2010) se ha observado que existe una relación entre la capacidad antimicrobiana del quitosano y el grado de desacetilación que presenta, siendo a mayor grado, mayor actividad antibacteriana, tanto contra Gram positivas como negativas.

Por otro lado, Andrés (2010) estudió el mecanismo de acción de la actividad antibacteriana del quitosano contra Gram negativas, observó un incremento del ión potasio liberado al medio y una disminución de la cuenta bacteriana en presencia de quitosano. Propuso que el mecanismo antimicrobiano es la interacción de los grupo amino libre protonados con la pared celular, lo que interfiere con las propiedades de barrera de la pared celular, provocando pérdida de constituyentes intracelulares y la muerte de la bacteria.

2.4 Colágena.

2.4.1 Definición.

La colágena es una proteína fibrosa con estructura tridimensional alargada, rica en glicina y prolina, cuyo peso molecular es de 300kDa. Consta de tres cadenas polipeptídicas largas,

llamadas cadena alfa, cada una contiene el aminoácido glicina cada tres posiciones, esto permite que las cadenas se enrollen unas en torno a las otras, generando una hélice regular triple, la glicina por su tamaño pequeño es el único aminoácido que se puede colocar en el centro de la hélice. La prolina por su estructura anular que estabiliza la conformación helicoidal en cada una de las cadenas (Alberts, 2004).

Muchas moléculas de colágena se unen unas con otras, lado a lado por sus extremos, dando lugar a sistemas solapados largos (fibrillas resistentes) que mantienen unidos a los tejidos. Es el componente mayoritario de la matriz extracelular y del tejido conjuntivo y constituye el 25% de la masa total de proteínas de los mamíferos (Gelse, 2003).

Se han identificado 25 cadenas alfa diferentes, cada una codificada por un gen distinto, de las cuales solo 20 se han caracterizado. En el tejido conjuntivo se encuentran los tipos: I, II, III, V y XI, siendo el tipo I el componente principal de la piel y huesos. Éstos son formadores de fibrillas. Una vez secretados al espacio extracelular, se organizan en polímeros ordenados llamados fibrillas de colágena, semejantes a una cuerda. Son estructuras delgadas (10.30 nm de diámetro) que por lo general se agregan formando haces y se observan como fibras (Gelse, 2003).

La colágena tipo I de mamíferos, presenta diferencias con respecto a las otras colágenas, como: el tiempo para solubilizarse en medios ácidos, textura, tamaño de poro y elongación de éste (Parenteau-Bareil, 2011), así como diferencias en las bandas producidas en el espectro de infrarrojo (ATR-FTIR) correspondientes a la amida I (Campos, 2011).

2.4.2 Colágena utilizada en ingeniería de tejidos.

La colágena se ha utilizado en la medicina para la liberación de fármacos y como andamio celular, ya sea solo o ligado con alguna otra molécula que mejore sus propiedades mecánicas y/o biológicas, los estudios relevantes para este trabajo se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Materiales utilizados en ingeniería de tejidos basados en colágena.

Referencia	Material utilizado.	Entrecruzamiento o modificación del material.	Resultado.
Eun <i>et al</i> , (2006)	Colágena extraído de medusa.	Entrecruzado con hidrocioruro/N-hidroxisuccinamida 1-etil-(3-3-dimetilaminopropil) carbodiamida, mediante liofilización.	Mayor viabilidad celular que colágena bovino, gelatina, ácido hialurónico y glucano. Mayor porosidad y estructura más interconectada, por lo que pudo tener mayor densidad celular. No indujo ninguna respuesta inmune.
Lyons <i>et al</i> , (2010)	Colágena bovina	Dos formulaciones: 1.glicosaminoglucano 2. fosfato de calcio.	Para heridas de hueso. Ambas formulaciones presentaron excelente poder de cicatrización de hueso, comparados con heridas sin tratamiento.
He <i>et al</i> , (2010)	Colágena bovina	Grupos sulfihidrilos que unieron el andamio y el factor de crecimiento vascular endotelial.	El entrecruzamiento disminuyó la degradación del andamio de colágena y se mejoró el crecimiento de las células.

2.5 Piel.

La piel es un órgano pluriestratificado, compuesto por tres capas:

- a. Epidermis, es el epitelio que se extiende por la parte más externa, presenta un grosor variable con un valor medio de 0.1mm, pudiendo alcanzar en zonas como las palmas de las manos y las plantas de los pies de 1.0 a 2.0mm.
- b. Dermis, es el tejido conjuntivo rico en colágena. Es atravesada por vasos y nervios, es el responsable de la mayoría de las funciones de sostén. Es el tejido especializado característico de la piel y presenta un grosor de 5mm como máximo.
- c. Hipodermis, es la capa subcutánea subyacente de grasa y su grosor depende de varios factores como peso de la persona, edad, alimentación, etcétera.

Para que la piel sea funcional, debe tener ciertos requerimientos básicos: resistencia mecánica, proporcionada por un entramado de apoyo de matriz extracelular, segregada por los fibroblastos; irrigación sanguínea (transporte de nutrientes y oxígeno y eliminar los productos de desecho y el dióxido de carbono, proporciona acceso a las células del sistema inmunitario); fibras nerviosas para transmitir información sensorial, la secreción de las glándulas y la contracción del músculo liso (Alberts, 2004).

La función principal de los fibroblastos es sintetizar y mantener la matriz extracelular del tejido, mediante la formación de fibras del tejido conectivo denominadas colágeno y elastina. Es la célula más abundante y no especializada del tejido conjuntivo fibroso, su morfología es alargada, fusiforme, núcleo elíptico y con abundante retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi desarrollado. (Alberts, 2004).

Las células del tejido conjuntivo están relacionadas entre sí y son indiferenciadas, es decir pueden cambiar a osteoblasto (formadora de hueso), fibroblasto (segrega colágena tipo I o III, son las células menos especializadas y de más fácil cultivo), condrocito (célula cartilaginosa), célula adiposa o a célula muscular lisa. En conjunto son las responsables del sostén arquitectónico del cuerpo.

2.6 Andamios para crecimiento celular en ingeniería de tejidos.

Las células sintetizan matrices de tejido nuevo sobre los andamios, restaurando la función de los tejidos u órganos dañados. Los andamios proveen de un ambiente adecuado para que las células se adhieran, proliferen y se diferencien; también sirven para rellenar los espacios entre las células y liberar de forma controlada factores de crecimiento y moléculas señal. La función de las moléculas señal es facilitar y promover la regeneración de nuevo tejido a partir de las células utilizadas (Kim *et al*, 2007).

Los materiales que se han estudiado como andamios celulares para diferentes tejidos son: policaprolactona (Sarasam y Madihally, 2005; Williams *et al*, 2005), ácido poli(láctico-co-glicólico) (Wu *et al*, 2006), polietilenglicol (Wozney y Seeherman, 2004; Leach y Schmidt, 2005), alcohol polivinílico (Schmedlen *et al*, 2002; Oh *et al*, 2003), poliuretano (Santerre *et al*, 2005), polímeros naturales como alginatos (Li *et al*, 2005), gelatinas (Li *et al*, 2006), colágena (Ignatius *et al*, 2005), almidón (Gomes *et al*, 2002) y quitosano (Seo *et al*, 2006; Adekogbe y Ghanem 2005; Yan *et al* 2005).

La meta de la ingeniería de tejidos en piel es producir una estructura que ofrezca la rápida y completa regeneración de piel funcional, que le permita cumplir sus funciones como: formación de barrera, protección contra la irradiación UV, termorregulación, mecánicas y estéticas (Ma *et al*, 2003). Sin embargo hasta el momento no se ha logrado, por lo que se sigue trabajando en el diseño de nuevos materiales que permitan la restauración de piel funcional.

3 ANTECEDENTES

3.1 Quitosano utilizado en la ingeniería de tejidos.

El quitosano es un material prometedor en biomedicina, debido a su habilidad para producir estructuras porosas, éstas pueden ser utilizadas en el diseño de andamios que coadyuven en el trasplante de células y en la regeneración de tejidos. Dichas estructuras porosas pueden ser formadas por congelación seguida de liofilización de soluciones de sales de quitosano en moldes adecuados. Durante la congelación los cristales de hielo forman un núcleo y crecen a lo largo de gradientes de concentración. La orientación del poro se puede dirigir mediante la regulación de los gradientes de temperatura durante la congelación (Kumar *et al*, 2004).

En 1999, Madihally y Matthew estudiaron los andamios basados en quitosano y realizaron estudios que demuestran los efectos de la temperatura de congelación y la concentración de quitosano sobre el diámetro medio del poro en andamios con forma cilíndrica. También, prepararon andamios con geometría plana mediante la congelación de soluciones de quitosano en recipientes poco profundos, obteniéndose andamios planos con un ancho de 5mm y con poros perpendicularmente orientados. El congelamiento se realizó con nitrógeno líquido en el caso de los andamios cilíndricos, mientras que se utilizó hielo seco para los planos. El diámetro medio de los poros fue de 40-250 μ m variando la temperatura de congelación y por lo tanto el tamaño de los cristales de hielo. Se observó que se forman poros más pequeños a concentraciones mayores de quitosano y que el diámetro del poro está en función del gradiente de temperatura y, por lo tanto, del tamaño de los cristales, por lo que es muy importante la geometría que se busca del andamio y por lo tanto el gradiente de temperatura.

Estudios en los que se mezcla o entrecruza el quitosano con otro compuesto natural o sintético para mejorar sus propiedades mecánicas o biológicas, como el de Yan *et al* (2005), quienes produjeron un andamio basado en quitosano y gelatina. Esta última la utilizaron debido a que es rica en arginina, glicina y asparagina, lo cual tiene como resultado la promoción de la adhesión y migración de las células así como la formación de complejos polielectrólitos. Además se observó que la gelatina mejora la actividad biológica y afecta la rigidez de los andamios, haciéndolos más flexibles, aumenta el grado de degradación y mantiene la dimensión o estructura en presencia de la lisozima.

Finalmente, Cardea *et al* (2010), propusieron una nueva metodología para la obtención de andamios celulares con base en quitosano mediante el uso de CO₂ supercrítico. Esto, mediante la formación de un hidrogel en el cual se indujo térmicamente la fase de separación, posteriormente se sustituyó el agua con un disolvente y finalmente se secó la estructura con CO₂ supercrítico. Mediante este procedimiento se obtuvieron nanoestructuras filamentosas de quitosano con de diámetro de 50nm, sin colapso de la estructura del gel, con una porosidad mayor al 91% y un módulo de compresión de 150kPa.

3.2 Quitosano modificado con colágena y su uso en biomedicina.

Se encuentran algunos estudios respecto a los andamios a base de quitosano y colágena, ya sea en forma de mezcla o entrecruzado mediante otro compuesto, los estudios relevantes para este trabajo se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Estudios reportados de andamios celulares a base de quitosano y colágena.

Referencia	Material utilizado.	Entrecruzamiento o modificación del material.	Resultado.
Arpornmaeklong <i>et al</i> , (2007)	Quitosano y colágena bovina.	Unión mediante liofilización con dos proporciones (1:1 y 1:2).	Tamaño de poro promedio de 80-100µm. El andamio de quitosano-colágena promovió el crecimiento y diferenciación de los ostoblastos en estado maduro.
Ding <i>et al</i> , (2007)	Quitosano y colágena bovina.	Entrecruzamiento de los materiales.	Tamaño de poro promedio de 255±56µm y una porosidad de 88.6±4.1%. Se utilizó un sistema de cultivo de células (fibroblastos dérmicos humanos) mediante perfusión, obteniéndose una mayor

			retención de células a un flujo de 0.125mL/min y 0.25mL/min, así como mayor uniformidad en la distribución de las células.
Xiaoliang <i>et al</i> , (2011)	Qitosano y colágena bovina.	Entrecruzamiento de los materiales mediante glutaraldehído y por activación térmica de la fibrogénesis.	Se obtuvo un tamaño de poro promedio de 100-250µm en la proporción 0.5 de qitosano-colágena, mientras que al utilizar glutaraldehído se obtuvo un poro de 80-150µm. . Con base en los resultados de fuerza de tensión se produjo una estructura tipo nanofibrilar, la cual influyó en el desempeño de los andamios porosos.

4 JUSTIFICACIÓN

La Secretaría de Salud de México en 2011 reportó un promedio anual de 115 mil casos de accidentes por quemaduras y casi 13mil hospitalizaciones relacionadas con esta causa. Actualmente las personas que sufren de alguna quemadura de 2^o y 3^{er} grado son tratadas mediante el uso de injertos o el implante de cultivos celulares; siendo el último uno de los procedimientos más caros que existen, pero que produce un buen resultado médico y estético pero que desafortunadamente no se encuentra dentro de las posibilidades económicas de todos los pacientes. En razón de lo anterior surge la necesidad de desarrollar una metodología sencilla para la producción de un andamio celular que posea las propiedades físicas y biológicas necesarias para poder ser utilizado en el cultivo de tejido epitelial.

Cabe mencionar que existen pocos reportes del uso de materiales con base en quitosano y colágena con fibroblastos epiteliales y no hay en la literatura científica que informen sobre estudios con quitosanos obtenidos por método biológico químico ni funcionalización con ácido cítrico. Se entiende por método biológico químico al proceso de obtención de quitina a partir de una fermentación ácido láctica de desechos de camarón con una posterior purificación y desacetilación mediante método químico heterogéneo. Por la especificidad de las enzimas involucradas en el proceso biológico, así como la producción *in situ* de ácidos orgánicos se obtuvieron quitinas a partir de las cuales se prepararon quitosanos. Éstos conservaron una cristalinidad significativamente más alta, dado que la desacetilación fue llevada a cabo en bloque (Pacheco et al., 2011).

Por otro lado, México es un país con una gran longitud costera y con amplia variedad de recursos marinos, es por ello que se produce una gran cantidad de productos pesqueros. Entre ellos se encuentra el camarón, con base en el Anuario Estadístico de Acuacultura y Pesca de la SAGARPA del 2009 se produjeron 180 953 ton de este crustáceo, de los cuales el 90 476 ton representan el peso del cefalotórax del animal, el cual de no ser aprovechados para la producción de otros bienes representan un potencial fuente de contaminación tanto en altamar como en tierra (Cira et al, 2002).

En virtud de lo anterior en el presente trabajo se propone la preparación y caracterización de un andamio basado en quitosano y colágena que sea antimicrobiano y que promueva la viabilidad celular de fibroblastos humanos.

5 HIPÓTESIS

Las características físico-químicas del quitosano y de la colágena tipo I permitirá sintetizar un andamio adecuado para la adhesión y crecimiento de los fibroblastos, así como la inhibición de bacterias patógenas responsables de infecciones nosocomiales

6 OBJETIVO GENERAL

Sintetizar y caracterizar las propiedades físicas, químicas y biológicas de un andamio celular producido a partir de quitosano y colágena tipo I para su aplicación en crecimiento de fibroblastos humanos.

7 OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener y caracterizar quitosano a partir de desechos de camarón, mediante un proceso biológico-químico.
- Obtener y caracterizar colágena porcina tipo I.
- Obtener un andamio poroso y en hidrogel (película) con base en colágena y quitosano en mezcla y con entrecruzamiento.
- Caracterizar propiedades físicas, químicas y biológicas (actividad antimicrobiana y viabilidad de fibroblastos) de los andamios obtenidos.

8 METODOLOGÍA

El procedimiento general para la síntesis de los andamios se muestra en el diagrama 2.

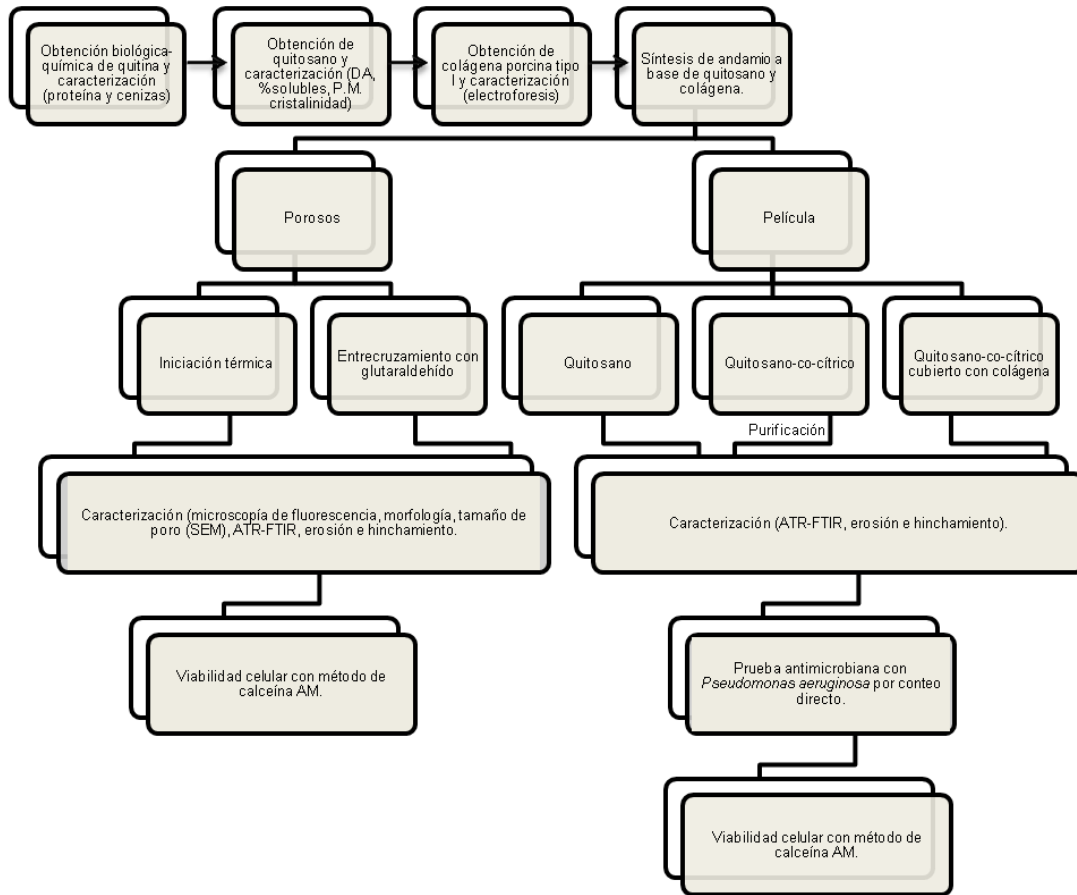


Diagrama 2. Metodología general realizada.

8.1 Extracción de quitina.

Los desperdicios de camarón (30 kg) se mezclaron con sacarosa (10% w/w) y el cultivo iniciador fue *Lactobacillus sp.* B2 (5% v/w). La mezcla se colocó en un reactor de columna de capacidad nominal de 60kg. Este reactor se incubó por 144h a 35°C. Se tomaron alícuotas de las fracciones líquidas y sólidas, cada 24h para determinación de pH y acidez total titulable (expresada como ácido láctico) (ATT) (Cira *et al*, 2002).

8.1.1 Desmineralización química de quitina.

El producto obtenido de la fermentación se trató con HCl (0.4M) en un reactor agitado por 1h a 25°C, relación (1:15) (p/v). El producto se lavó hasta neutralidad con agua corriente y se secó a 40°C durante 24h (Cira *et al*, 2002).

8.1.2 Desproteínización química de quitina.

En un reactor agitado de acero inoxidable se colocó el producto seco de la desmineralización con una solución acuosa de NaOH (0.4M), durante 1h a velocidad baja a temperatura de 25°C con una relación (1:15) (p/v). Se lavó con agua corriente hasta neutralidad, se secó a 40°C durante 24h (Cira *et al*, 2002).

8.2 Caracterización de quitina.

8.2.1 Cenizas.

Se pesaron 2g de muestra en crisoles a peso constante, posteriormente se llevaron a combustión en una mufla a 550°C, durante 4h o hasta llegar a peso constante. Mediante la ecuación (1) se determinó el porcentaje de cenizas (AOAC, 1990):

$$\%C = \left[\frac{(\text{peso de crisol con cenizas} - \text{peso crisol})}{\text{peso muestra}} \right] \times 100 \dots (1)$$

8.2.2 Nitrógeno total.

El nitrógeno total se determinó por el método de Kjeldahl, mediante la combustión en húmedo de la muestra por calentamiento con ácido sulfúrico concentrado en presencia de catalizadores, para la reducción del nitrógeno orgánico de la muestra hasta amoníaco. El sulfato de amonio producido se alcaliniza y se destila para desprender el amoníaco que es atrapado y titulado (Cira *et al*, 2002). Se calcula mediante la ecuación (2):

$$\text{Nitrógeno total} = \text{Nitrógeno no proteico} + \text{Nitrógeno proteico} \dots (2)$$

8.2.3 Nitrógeno proteico.

Se determinó por el método de Kjeldahl, restando el nitrógeno de quitina al nitrógeno total y multiplicado por 6.25 (Cira, 2002), mediante la ecuación (3):

$$\%Proteína\ residual = (\text{Nitrógeno total} - \text{Nitrógeno de quitina}) \times 6.25 \dots (3)$$

8.3 Obtención de quitosano (Desacetilación de quitina).

Se realizó por método heterogéneo en un reactor de columna, con una solución de NaOH al 50% a 110°C, durante 3.5h. Se lavó con agua corriente hasta neutralidad y se secó a 35°C por 24h (Juárez, 2011).

8.4 Caracterización de quitosano.

8.4.1 Determinación de solubles.

Se disolvió 0.1g de muestra en 25mL de una solución de ácido acético 0.1M durante 24h, con agitación constante a temperatura ambiente. Se determinó por gravimetría la cantidad de solubles en dicha solución (Shrinivas & Stevens, 2005).

8.4.2 Determinación del peso molecular mediante viscosidad intrínseca.

Se calculó la viscosidad intrínseca (M_v) del quitosano en una solución de ácido acético-acetato de sodio (0.33M y 0.2M) con un viscosímetro Ostwald. Los parámetros se determinaron mediante la ecuación (4), las constantes empleadas para a y k fueron las correspondientes al disolvente empleado (Shrinivas & Stevens, 2005; Mao *et al*, 2007).

$$[\eta] = kM^a \dots (4)$$

Donde: $k: 1.38 \times 10^{-5} \text{Lg}^{-1}$

$a: 0.85$

8.4.3 Grado de acetilación por $^1\text{HRMN}$.

Las muestras de quitosano se disolvieron en una solución de DCI/D₂O al 20% (p/p) mediante agitación magnética durante 12h, los espectros de RMN¹H se realizaron en un espectrómetro Bruker AC 200 a 200Mhz para ¹H a 24.85°C. El grado de acetilación se calculó de acuerdo con Hirai, *et al* (1991) y Pacheco *et al* (2007), por la desaparición de la señal del protón metil del residuo de (1-4)-2-acetoamido-2-desoxi-beta-D-glucano con la referencia de los protones H-2 al H6 de la estructura completa.

8.4.4 Difracción de rayos X.

Se realizó un estudio de difracción de rayos X para determinar la cristalinidad de la muestra. Para el análisis de Rayos X de polvos se pulverizó el polímero y se analizó en un equipo Siemens D-5000, $K\alpha$ radiación de Cu a $\lambda = 1.5406$ Amstrongs. Se utilizó en un grado de rotación de 3 a 80, durante un periodo de 30 min y un tamaño de paso de 0.02.

8.5 Obtención de la colágena porcina tipo I.

Se utilizaron manos de cerdo partidas a la mitad, frescas y sin pelo. Se removió la piel con ayuda de un escalpelo, posteriormente a ésta se le quitó la grasa y el tejido conjuntivo. La piel obtenida se lavó con agua corriente y se cortó en cuadros de 3mm de lado. Se agregó agua destilada en una proporción 1:8 (p/v), se dejó en agitación durante 1h a 40°C para desengrasar la piel. Se decantó y filtró el sobrenadante con papel filtro. Los sólidos se homogeneizaron durante 72h en ácido acético 0.5M a 40°C (L1) y 4°C (L2) con agitación constante. Se decantó y filtró con manta de cielo el sobrenadante, el cual se centrifugó a 9000rpm, 30min a 4°C. Finalmente se liofilizó el líquido obtenido. (Parenteau-Bareil, 2011).

8.6 Caracterización de la colágena porcina tipo I.

La colágena obtenida se caracterizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en presencia de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida, con base en el método de Laemmli (1970). Se utilizó un marcador de peso molecular amplio (Biorad USA). Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250 y se destiñeron en una solución de metanol:ácido acético 0.1M (50:50 v/v) (Torres Arreola, 2008).

8.7 Síntesis del andamio de quitosano y colágena porcina tipo I.

8.7.1 Andamio poroso - Método 1. Iniciación térmica.

Se mezcló la colágena (col) con el quitosano (quito) en solución en una proporción 2:1 y 1:1 (p/p). Se neutralizó la solución con NaOH (2M) a 4°C hasta pH=7.4, se transfirió la mezcla a un baño de agua a 37°C. El gel de col-quito se dejó en el baño con agua durante 20h, después se lavó con agua desionizada y se congeló a -60°C y se liofilizó. Los andamios producidos se mantuvieron en un desecador hasta su evaluación (Xiaoliang *et al*, 2011).

8.7.2 Andamio poroso – Método 2. Entrecruzamiento con glutaraldehído.

Se mezcló la colágena y el quitosano en solución en una proporción 2:1 y 1:1 (p/p). Se adicionó 0.25% de glutaraldehído a la solución a 4°C y se agitó durante 4h. Se congeló la mezcla a -60°C toda la noche y se liofilizó. Las muestras secas se enjuagaron con agua desionizada para quitar el exceso de GA que no reaccionó y se liofilizó. Los productos se mantuvieron en un desecador hasta su evaluación (Xiaoliang *et al*, 2011).

8.7.3 Andamio película– Método 1. Película de quitosano.

Se hizo una solución al 1.5% (p/v) de quitosano en ácido acético (2%). La cual se filtró por una malla no.140 y se vació en cajas Petri de plástico. Se secaron a 70°C durante 4h. Posteriormente se lavaron con agua destilada (6mL) y se neutralizaron con 1mL de NaOH 2M y se lavaron con agua destilada hasta pH neutro. Se dejaron secar 12h a temperatura ambiente. Se mantuvieron en un desecador hasta su evaluación.

8.7.4 Andamio película – Método 2. Película de quitosano-co-cítrico.

Se hizo una solución de quitosano al 1.15%(p/v) con agua destilada y ácido cítrico al 2.88%(p/v). Se dejó en agitación durante 4 días. Posteriormente se realizó la reacción de entrecruzamiento, mediante la elevación de la temperatura a 70°C y la adición de NaH_2PO_4 al 0.066, 2.3 y 5% (p/v). Se dejó en agitación a dicha temperatura durante 30 min. Se vació la solución en cajas Petri de plástico y se secaron a 70°C durante 5h.

8.7.4.1.1 Purificación del copolímero de quitosano-co-cítrico mediante el método de goteo en frío.

La solución de quitosano-co-cítrico se precipitó por goteo en acetona a 4°C, en una proporción 1:10. La acetona con el precipitado se centrifugó a 9000rpm, 30min a 4°C. Finalmente se filtró y se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente por 4h.

8.7.4.1.2 Fracción molar de los copolímeros de quitosano-co-cítrico.

Para determinar la cantidad de ácido cítrico incorporado al quitosano se realizó una resonancia magnética nuclear de protón de Hidrógeno (^1H RMN) de los materiales obtenidos con las diferentes proporciones de catalizador y purificados por el método de goteo en frío. El manejo de las muestras para el análisis de ^1H RMN se llevó a cabo como se describe en la sección 8.4.3.

La fracción molar incorporada de ácido cítrico al quitosano se calculó mediante la ecuación 5.

$$(\%)FM = \left[\frac{\frac{1}{4}\text{área integrada de los protones del OH del ácido cítrico}}{\frac{1}{6}\sum_2^6 \text{área integrada de los protones } H_i \text{ del quitosano} + \frac{1}{4}\text{área integrada del OH del ác.citríco}} \right] \times 100 \dots(5)$$

8.7.4.1.3 Solubilidad.

Se determinó el porcentaje de solubles de las películas de quitosano-co-cítrico en agua. Se pesó 0.1g de película y se colocó en 25mL del disolvente correspondiente durante 24h con agitación. Posteriormente se filtró y se pesó hasta peso constante (Suyatma *et al*, 2010).

8.7.4.1.4 Purificación de las películas de quitosano-co-cítrico.

Se realizó un lavado mediante el método de Soxhlet con acetona a 65°C durante 8, 18, 24 y 48h. Se analizó el pH y solubilidad de las películas para determinar el tiempo de purificación. Posteriormente se cambió el disolvente por etanol y se realizó el lavado durante 7h. Finalmente se lavaron con agua destilada hasta pH= 6 y se neutralizó con NaOH 2M y se lavó con agua destilada hasta pH neutro. Las películas se dejaron secar 12h a temperatura ambiente y se mantuvieron en un desecador hasta su evaluación.

8.7.5 Andamio película – Método 3. Película de quitosano-co-cítrico recubierta de colágena porcina tipo I.

Se obtuvieron las películas de quitosano-co-cítrico acorde a lo indicado en la sección 8.7.4. Se purificaron mediante el método de Soxhlet descrito en la sección 8.7.4.1. y se recubrieron con una solución de 7mg/mL de colágena porcina tipo I en ácido acético 0.5M. Se lavaron con agua destilada hasta pH neutro. Se dejaron secar 12h a temperatura ambiente y se mantuvieron en un desecador hasta su evaluación.

8.8 Caracterización de los andamios porosos.

8.8.1 Espesor.

Se midió el espesor en 9 puntos aleatorios de los andamios con un Vernier marca Petrul.

8.8.2 Microscopía de fluorescencia.

Se cortaron fragmentos de andamio de 0.1cm de largo. Se colocaron en un portaobjetos y se agregó una gota de blanco de calcofluor al 0.1%. Se dejó reaccionar por 5min y se lavó para

quitar el exceso de colorante. Se observó la fluorescencia en un microscopio Zeiss con un objetivo de 40x.

8.8.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM).

Se cortaron trozos de andamio de 0.5x0.5cm y se tiñeron con gas de tetraóxido de osmio. Finalmente se fijaron con carbón y fueron cubiertas con oro antes de su observación en el Microscopio Electrónico de Barrido (JEOL JSM-5900LV).

8.8.4 Tamaño de poro.

Mediante el programa AxioVision (Carl Zeiss) se midió el diámetro de los poros de los andamios obtenidos en las micrografías electrónicas de barrido (3 micrografías de diferentes campos por material).

8.8.5 Espectrometría de infrarrojo (ATR-FTIR).

Se utilizó un espectrómetro de infrarrojo (Perkin Elmer ATR-FTIR 100), en el cual se colocaron los andamios en el diamante y se realizaron los espectros correspondientes a un intervalo de longitudes de onda desde 650cm^{-1} hasta los 4000cm^{-1} .

8.8.6 Prueba de hinchamiento.

Se cortaron los andamios secos en trozos de 0.5x0.5cm y se registró el peso inicial (W_0). Se introdujo la muestra en un frasco y se añadieron 5mL de Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), la cual fue previamente acondicionada a 37°C y se tapó. Se colocaron los frascos en una estufa a 37°C y cada 24h se registró el peso de la muestra (W_h), quitando el exceso de agua con ayuda de una servitoalla. Esto se realizó por duplicado y se repitió el procedimiento hasta que la muestra alcanzó un peso constante (W_e), es decir hasta que no se observó cambios mayores al 2%.

El porcentaje de Hinchamiento a un tiempo t se calculó a partir de la ecuación 6.

$$\%H_t = \frac{W_h - W_0}{W_0} \times 100 \dots (6)$$

Donde $\%H_t$ fue el porcentaje de hinchamiento a un tiempo t , W_h fue el peso de la muestra húmeda a un tiempo t y W_0 fue el peso de la muestra seca.

El porcentaje de hinchamiento en el equilibrio se obtuvo a partir de la ecuación 7.

$$\%H_e = \frac{W_e - W_0}{W_0} \times 100 \dots (7)$$

Donde %H_e fue el porcentaje de hinchamiento en el equilibrio, W_e fue el peso de la muestra húmeda en el equilibrio y W₀ fue el peso de la muestra seca.

8.8.7 Prueba de erosión.

Se cortaron muestras de andamio de aproximadamente 0.5x0.5cm las cuales se pesaron (W₀). Se introdujo la muestra en un frasco y se añadieron 5mL de Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), la cual fue previamente acondicionada a 37°C y se tapó. Se colocaron los frascos en una estufa a 37°C. Cada 48h se sacó de la estufa el frasco con la muestra y cuidadosamente se retiró la muestra de la solución. Se lavó con agua destilada el andamio y se liofilizó. Posteriormente se registró el peso (W_f).

El porcentaje de pérdida de masa o erosión a un tiempo *t* se obtuvo a partir de la ecuación 8.

$$\%Erosión_t = \frac{W_f - W_0}{W_0} \times 100 \dots (8)$$

Donde %Erosión_t es el porcentaje de erosión a un tiempo *t*, W₀ es el peso inicial de la muestra seca y W_f es el peso final de la muestra liofilizada.

8.9 Caracterización de los andamios en forma de película.

8.9.1 Espesor.

Se midió el espesor de las películas de quitosano-co-cítrico en 6 puntos aleatorios del centro y 6 de la circunferencia mediante un Micrómetro Mitutoyo Absolute.

8.9.2 Espectrometría de infrarrojo (ATR-FTIR).

Se realizó lo indicado en el apartado 8.8.5.

8.9.3 Prueba de hinchamiento.

Se cortaron círculos de 1cm de diámetro y se realizó lo mencionado en el apartado 8.8.6.

8.9.4 Prueba de erosión.

Se cortaron círculos de 1cm de diámetro y se realizó lo mencionado en el apartado 8.8.7.

8.9.5 Prueba antimicrobiana con *Pseudomonas aeruginosa*.

Se empleó la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, la cual se inoculó en medio caldo soya tripticaseína a 37°C por 24h. La evaluación del crecimiento bacteriano se llevó a cabo mediante la cuenta directa de bacterias en la cámara de Neubauer. Para ello se inocularon 10µL de una suspensión de bacterias a una concentración de 1×10^7 bacterias/mL en un pozo con un círculo de polímero de 1cm de diámetro, al cual se le agregaron 990µL de caldo soya tripticaseína y se incubó a 37°C con agitación. Cada 6h se tomaron 100µL de la muestra y se agregaron 900µL de agua destilada y se realizó el conteo en el microscopio con la cámara de Neubauer, esto se realizó por duplicado y fueron contados 5 cuadros de la cámara de Neubauer por muestra.

8.10 Evaluación de la viabilidad del andamio con fibroblastos mediante el método de calceína AM (adhesión y viabilidad).

8.10.1 Preparación de los polímeros.

Las esponjas se cortaron en rectángulos de aproximadamente 5mm de lado, mientras que las películas se cortaron en círculos de 1cm de diámetro. Se esterilizaron por UV en el crosslinker BLX-254 (Vilber Lourmat), ambas caras de los materiales por 10min. Posteriormente se realizaron 5 lavados con buffer PBS (Phosphate buffered saline, pH=7.4). Finalmente se le dio un lavado con medio DMEM.

8.10.2 Sembrado de los polímeros.

Se trataron muestras de abdominoplastías (obtenidas bajo consentimiento informado) para la obtención de fibroblastos humanos, se cultivaron en medio DMEM suplementado con suero bovino fetal y antibiótico (Anti-Anti 100X de Gibco) por una semana (Llames *et al*, 2006). Posteriormente las células fueron recuperadas de las cajas y se sembraron 16µL de esta suspensión cuya concentración era de 5×10^4 células/mL en cajas de cultivo de 96 pozos con el polímero a estudiar. Se agregaron 30µL de medio DMEM y se dejaron incubar a 37°C, 80% de humedad relativa y 5% de CO₂.

8.10.3 Prueba con calceína (adhesión y viabilidad).

Después de 2, 7 y 10 días de incubación, los polímeros se sacaron de los pozos y se lavaron dos veces con PBS, se agregó medio Hanks/Fenol con calceína y homodímero de etidio y se incubaron a 37°C por 45min (Invitrogen, 2005). Posteriormente se retiró la solución y se lavó dos veces con PBS y se observó en un microscopio confocal LSM 780, Carl Zeiss.

9 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Extracción de quitina por método biológico-químico.

La extracción de quitina a partir de desechos de camarón se realizó mediante una fermentación ácido láctica con *Lactobacillus sp. B2*. Durante la fermentación se determinó el pH, acidez total titulable, contenido de cenizas y proteínas con estos dos últimos parámetros fueron determinados los porcentajes de desmineralización (DM) y desproteínización (DP) del desecho de camarón (Tabla 3).

Tabla 3. Cambio en el pH del sólido y del lixiviado durante la fermentación de desechos de camarón. Donde: ATT es acidez total titulable, DM es desmineralización y DP es desproteínización.

Tiempo (h)	pH	ATT (%)	Cenizas (%)	Proteínas (%)	DM (%)	DP (%)
0	6.13	-	20.02±1.95	16.09±1.69	-	-
120	4.60 (fracción sólida) 4.68 (fracción líquida)	0.257±0.012	13.62±3.79	8.56±0.52	66.83	69.53

En la tabla 3 se muestra el cambio de pH en función del tiempo de fermentación, se observa que disminuye en 1.53 unidades. Acorde con Cira (2002) esta disminución de pH se debe a la producción de ácido láctico de *Lactobacillus sp B2*, por la fermentación de glucosa, lo que inhibe el crecimiento de otra microbiota. El abatimiento del pH se realiza con la finalidad de desmineralizar el desecho de camarón y obtener la quitina pura, así como otros productos de valor agregado como son pigmentos y minerales (Shirai, 1999).

Se realizó la determinación de cenizas del camarón inicial y de la quitina cruda lavada para la obtención del porcentaje de demineralización (DM) y de desproteínización (DP). Se obtuvieron los siguientes valores: DM= 66.83% y DP= 69.53%. Dichos porcentajes se encuentran por debajo de lo reportado por Juárez (2011), quien utilizó las mismas condiciones de fermentación y obtuvo una DM del 75% y una DP del 78%. La causa de esta

diferencia puede ser la composición del desecho de camarón utilizado, mayor cantidad de minerales y proteínas iniciales, frescura, carga microbiana competitiva, así como la presencia de compuestos inhibitorios para el cultivo iniciador.

9.2 Obtención de quitosano.

Para la obtención del quitosano se realizó una desacetilación alcalina heterogénea (Juárez, 2011). Se obtuvo un rendimiento del 1.44% respecto al desecho de camarón utilizado, esto debido, posiblemente, a pérdidas de masa durante cada etapa de purificación del polisacárido. El quitosano obtenido tuvo un porcentaje de solubles en ácido acético 0.1M del $99.11 \pm 1.37\%$, lo que es muy similar a lo obtenido por Juárez (2011) quien obtuvo una solubilidad del 98 al 99% bajo las mismas condiciones. El peso molecular del quitosano obtenido fue de 280.17 kDa, correspondientes a un quitosano de bajo peso molecular y un porcentaje de desacetilación del 94.91 (DA=5.09%).

Por otro lado, se realizó el análisis químico proximal del quitosano obtenido, los resultados se muestran en la tabla 4. La cantidad de cenizas fue similar a lo reportado por Juárez (2011) al realizar lavados con agua destilada y utilizar reactivos de grado analítico.

Finalmente, el porcentaje de cristalinidad (CrI) del quitosano fue 82.5%, determinado por difracción de rayos X, lo que es mayor que lo reportado por Focher (1990), para quitosano obtenido a partir de desacetilación con NaOH, con una CrI del 50%.

Tabla 4. Análisis proximal del quitosano obtenido de la desacetilación alcalina con NaOH 50%, 110°C, 3.5h.

Característica	(%)
Humedad	4.998 ± 0.841
Cenizas	0.469 ± 0.067
Grasa	1.634 ± 0.366

En la figura 3 se muestra el espectro de infrarrojo del quitosano obtenido. Se observaron las bandas correspondientes a los grupos funcionales del quitosano, lo que se resume en la tabla 5. Cabe mencionar que se observa un incremento en la intensidad de la banda a 1619.98cm^{-1} respecto a la de 1655.59cm^{-1} , lo que es indicativo de la desacetilación de la quitina (Kumirska *et al*, 2010).

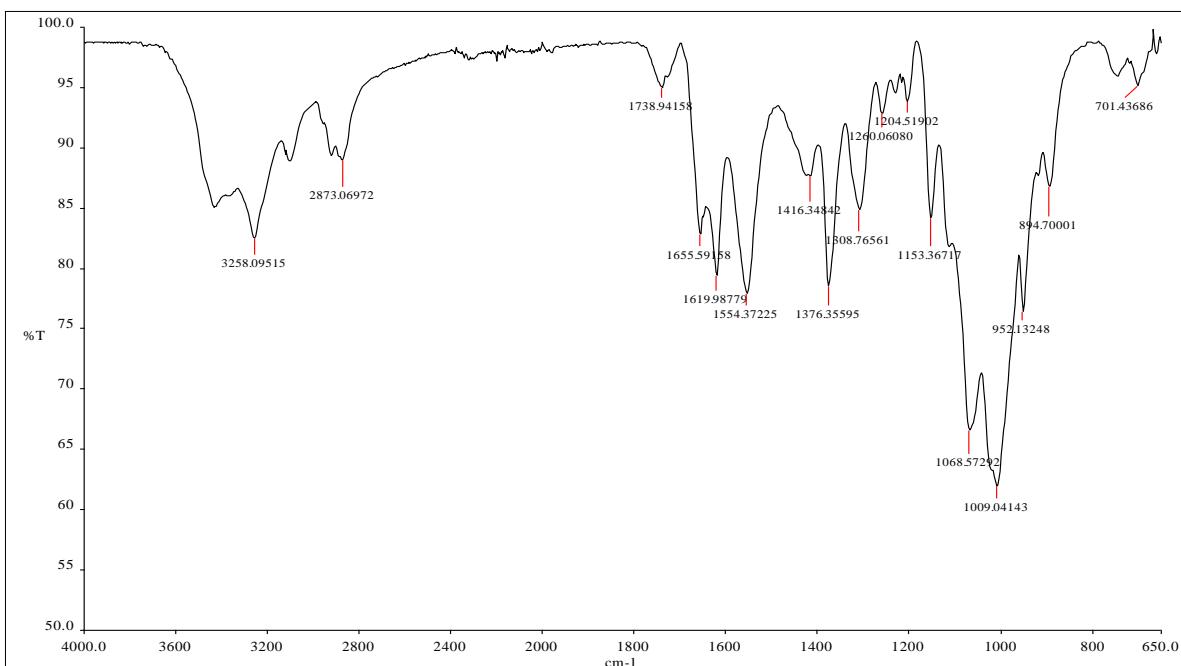


Figura 3. Espectro de infrarrojo obtenido con ATR-FTIR de una muestra de quitosano obtenido a partir de la desacetilación química de quitina biológica-química.

Tabla 5. Grupos funcionales del espectro del quitosano biológico-químico.

Longitud de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional
3258.10	Alcohol, amina primaria.
1655.59	Amina primaria.
1619.99	Confirmación de amina primaria.
1554.37	Torsión del alcohol.
1308.77	Torsión del alcohol.
1153.37	Éter cíclico
894.70	Torsión de amina primaria.

El quitosano químico (comercial) tuvo un porcentaje de solubles en ácido acético 0.1M del $99.95 \pm 0.37\%$, el peso molecular obtenido fue de 136.6 kDa, correspondientes a un quitosano de bajo peso molecular y un porcentaje de desacetilación del (DA=16.24%). El porcentaje de cristalinidad del quitosano fue 63%, determinado por difracción de rayos X. Finalmente, en la figura 4 se muestra el espectro de infrarrojo del quitosano químico obtenido. Se observaron las bandas correspondientes a los grupos funcionales del quitosano, lo que se resume en la tabla 6.

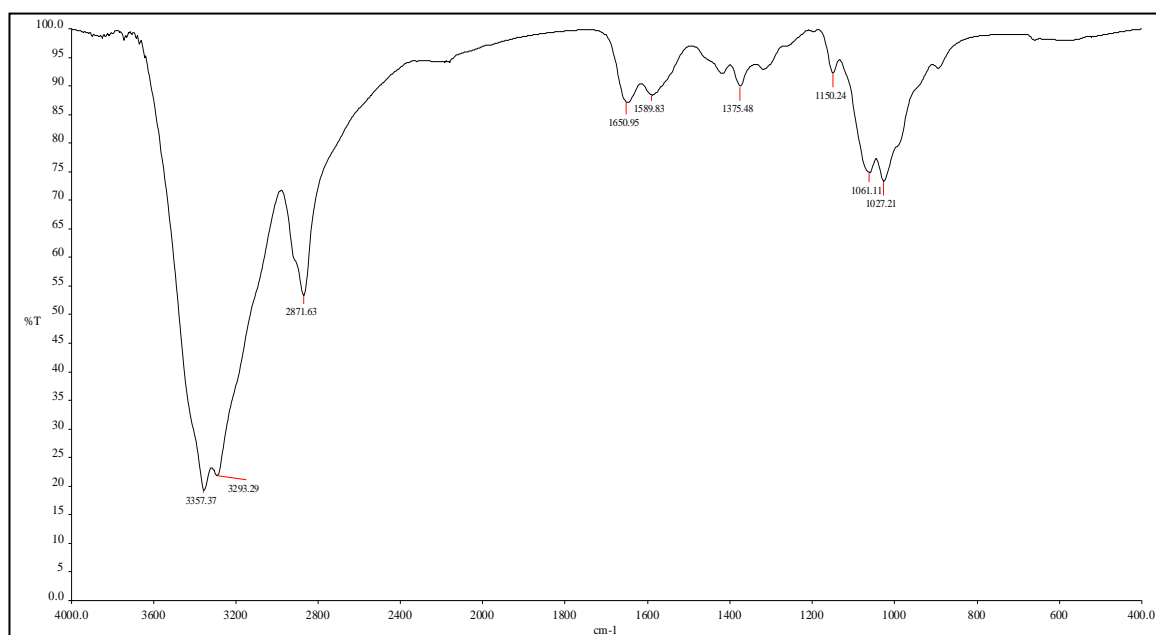


Figura 4. Espectro de infrarrojo obtenido con ATR-FTIR de un muestra de quitosano químico (comercial).

Tabla 6. Grupos funcionales del espectro del quitosano químico.

Longitud de onda (cm^{-1})	Grupo funcional
3357.37 y 3293.29	Alcohol, amina primaria.
1650.95	Amina primaria.
1589.83	Confirmación de amina primaria.
1375.48	Torsión del alcohol.

9.3 Obtención de colágena porcina tipo I.

Se extrajo la colágena de la piel de patas de cerdo bajo dos condiciones de temperatura, el primer lote (L1) se obtuvo a 40°C y el segundo (L2) a 4°C. El rendimiento en masa de L1 fue de 23.75% y de L2 de 0.95%. Se observó que la colágena obtenida de L1 presentaba textura esponjosa y color amarillento, mientras que la de L2 era más fibrosa y blanquecina.

9.4 Caracterización de colágena porcina tipo I.

Para caracterizar la pureza de la colágena tipo I se realizó una electroforesis en SDS-PAGE al 12%, con base en el método de Laemmli (1970).

La figura 5 muestra el electroforerograma obtenido, en el carril **a**, se encuentra los marcadores de masa molecular, en los carriles **b**, **c** y **d**, la colágena obtenida del lote 1 y en los carriles **e** y **f** la colágena del lote 2. En el L1 se observaron las bandas características de las cadenas β , α_1 y α_2 correspondientes a la colágena tipo I, así como dos bandas entre 37 y 25kDa que posiblemente correspondan a la gelatina. Ésta es un derivado de la colágena, obtenida a partir de su desnaturalización (Xiau *et al*, 2004).

Por otro lado en los carriles **e** y **f** correspondientes a la proteína extraída a 4°C, se muestran bandas definidas de la colágena con valores cercanos a 116kDa, correspondientes a la cadenas α_1 y 2, así como la banda relacionada con la cadena β cercana a los 250kDa. Acorde con Techatanawat (2011), la presencia de las dos cadenas α y la tercera cadena β está relacionada con el colágena tipo I por lo que se trabajó solo con la proteína de L2 para los siguientes experimentos.

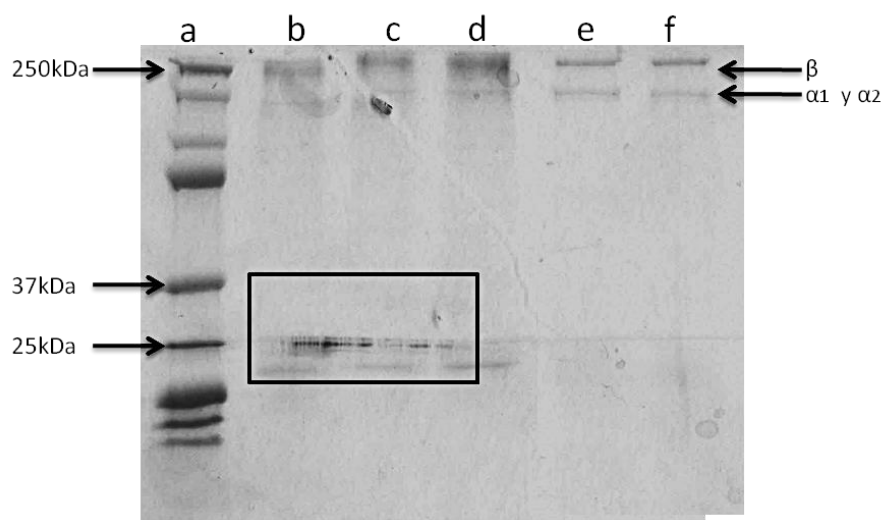


Figura 5. PAGE- SDS de muestras de colágena porcina, donde: a) Marcador de peso molecular, b) L1 1mg/mL, c) L1 1.6mg/mL, d) L1 2mg/mL, e) L2 1.6mg/mL y f) L2 2mg/mL.

9.5 Caracterización de colágena comercial extraída de piel de ternera.

Para la producción de andamios mediante la metodología de iniciación térmica y entrecruzamiento con glutaraldehído se utilizó colágena tipo I de la marca Sigma obtenida a partir de piel de ternera. A esta proteína se le realizó un espectro de infrarrojo al igual que a la colágena porcina obtenida del lote 2, dichos espectros se muestran en la figura 6.

El espectro de infrarrojo obtenido de la colágena comercial utilizada para la realización de los andamios así como la colágena porcina muestran las bandas características de la colágena tipo I, resumidas en la tabla 7. De los tres grupos funcionales, la banda de la amida I es la más característica y es resultado de la vibración de estiramiento del grupo carbonilo y se caracteriza por la formación de tres bandas (Sellaro *et al*, 2007) estas bandas también han sido reportadas por Lazarev *et al* (1985) como características del grupo poliprolina, formado por tres aminoácidos que forman un “monómero” de glicina-prolina-prolina.

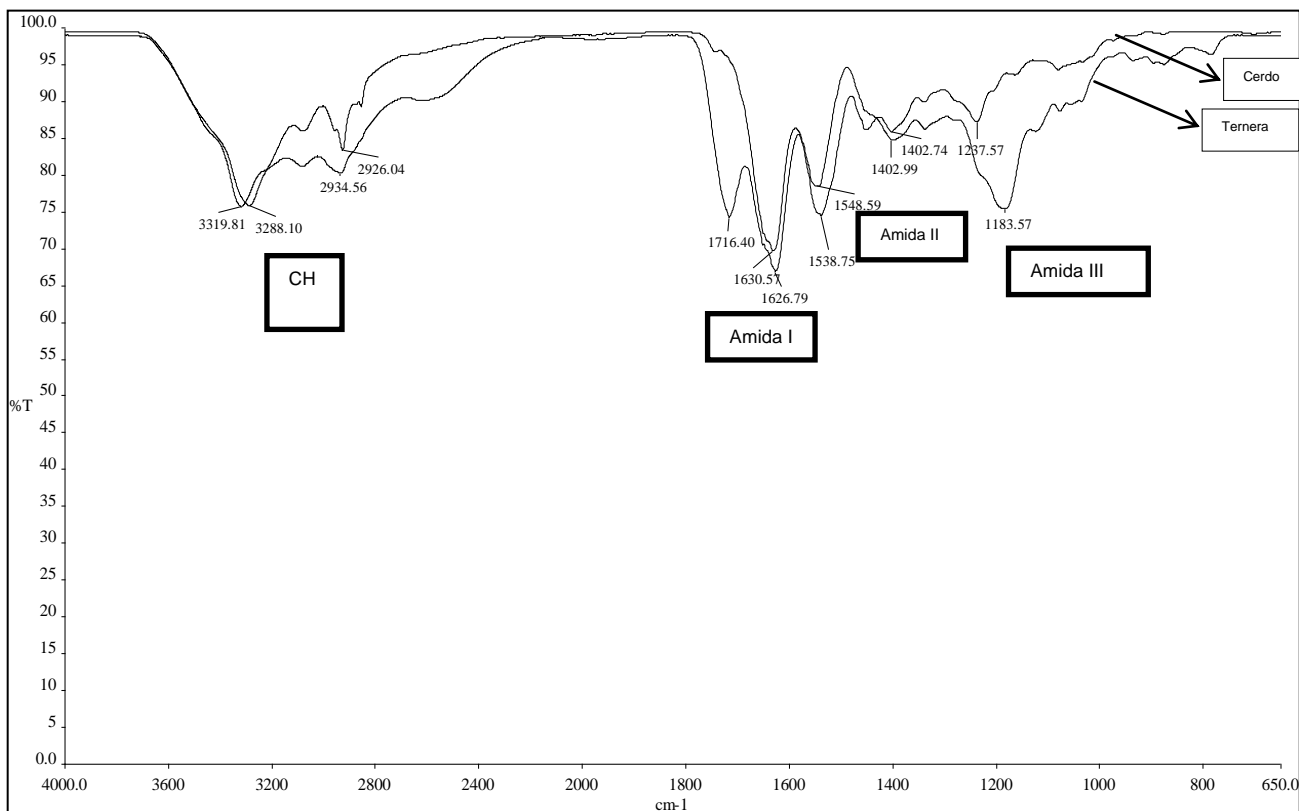


Figura 6. Espectro de infrarrojo obtenido de la colágena tipo I de piel de ternero de la marca SIGMA y de la colágena porcina extraída de piel de pata de cerdo.

Tabla 7. Grupos funcionales de la colágena tipo I de piel de ternero y de cerdo.

Longitud de onda de la colágena de ternero (cm^{-1})	Longitud de onda de la colágena de cerdo (cm^{-1})	Grupo funcional
1626.79, 1548.50	1630.57, 1538.59	Amida I
1408.01	1402.74	Amida II
1183.27	1237.57	Amida III

Por otra parte, con la finalidad de observar su estructura, se realizó un estudio de microscopía electrónica de barrido de la colágena comercial. En las figuras 7 A y B se observa que no hay una formación uniforme de poros en esta colágena. En la figura 7 C se aprecian pequeños fibras de colágena. Esta formación heterogénea de poros y ligera degradación del material se puede deber a hidrólisis, por el método de extracción realizado por SIGMA.

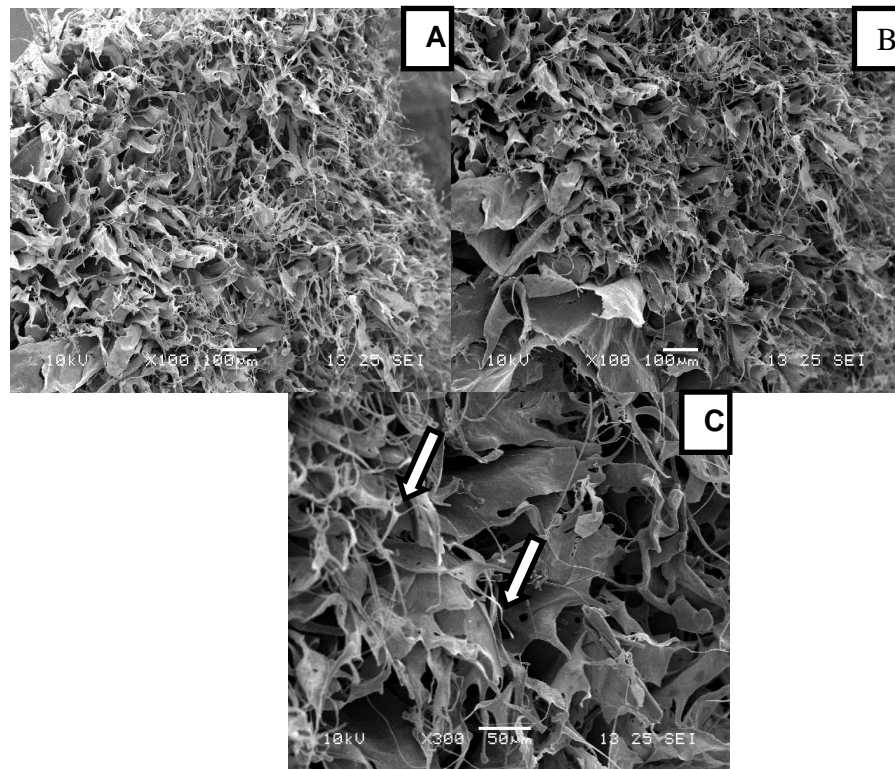


Figura 7. Micrografía electrónica de barrido de colágena tipo I de piel de ternero de la marca SIGMA. A) 100x, B) 100x, C) 300x. Las flechas señalan hilos de colágena.

La estructura formada por la colágena de SIGMA (figura 7), no era la esperada ya que se ha reportado que la colágena tipo I de fuentes animales tiene la capacidad de formar estructuras tridimensionales con tamaños de poro uniforme (Parenteau-Bareil *et al*, 2011).

La formación uniforme de poros así como el tamaño son importantes en la formación de un andamio debido a que éste ayuda, principalmente, a la retención y adhesión de las células en el andamio y, por lo tanto, a la formación del neot Tejido en cuestión (Kim *et al*, 2007; Ma *et al*, 2003).

9.6 Síntesis de andamios porosos basados en quitosano y colágena porcina tipo I.

9.6.1 Método de mezcla e iniciación térmica de formación de cadenas de colágena.

Se utilizaron dos proporciones de colágena y quitosano (2:1 y 1:1 en peso (p/p)), con ambas se obtuvieron materiales blancos, quebradizos y frágiles. La micrografía de fluorescencia con blanco de calcoflúor como cromóforo se muestra en la figura 8, se señalan con un círculo

rojo las zonas con mayor fluorescencia. Dichas áreas contienen mayor cantidad de quitina-quitosano, pues el blanco de calcoflúor posee afinidad por los enlaces $\beta(1-4)$ de la quitina y quitosano (Moore, 1990). En las micrografías que se presentan se observó fluorescencia debido a que el quitosano se encuentra a lo largo de toda la estructura de colágena, para obtener más detalle de ello se realizó una SEM.

En la figura 9 se muestra una micrografía electrónica de barrido, donde el material presentó poros con aglomerados del quitosano a lo largo de las cadenas de colágena debido al aumento del pH (pH= 7.4), que provoca que el quitosano se precipite a lo largo de la estructura de colágena, impidiendo así la formación de poros. Se observa que la aglomeración no fue uniforme, lo que concuerda con las micrografías de fluorescencia. El material obtenido presentó características diferentes a lo reportado por Xiaoliang (2011), en la formación de poros y la aglomeración de quitosano, ya que en este trabajo los poros no fueron uniformes, puede deberse a la colágena utilizada, que presentaba degradación o no fue suficiente el tiempo para permitir la formación de las cadenas de colágena.

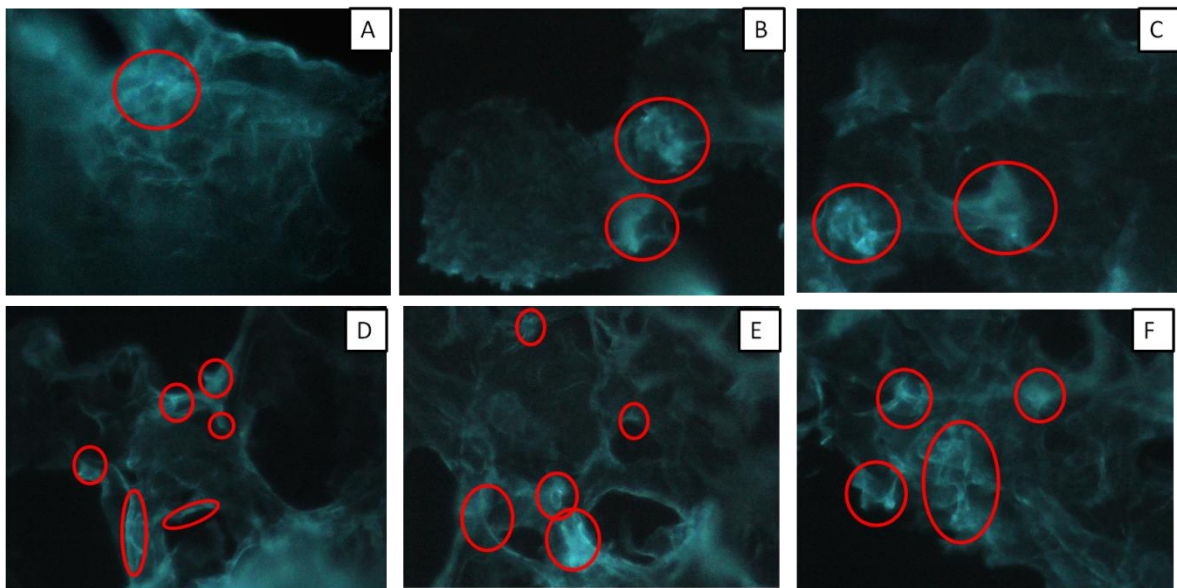


Figura 8. Micrografías de fluorescencia del material de colágena-quitosano obtenido por método de iniciación térmica. Donde A, B y C son proporción de masa 2:1 y D, E y F son proporción de masa 1:1. El aumento utilizado fue 40x. El círculo rojo encierra las zonas con mayor fluorescencia.

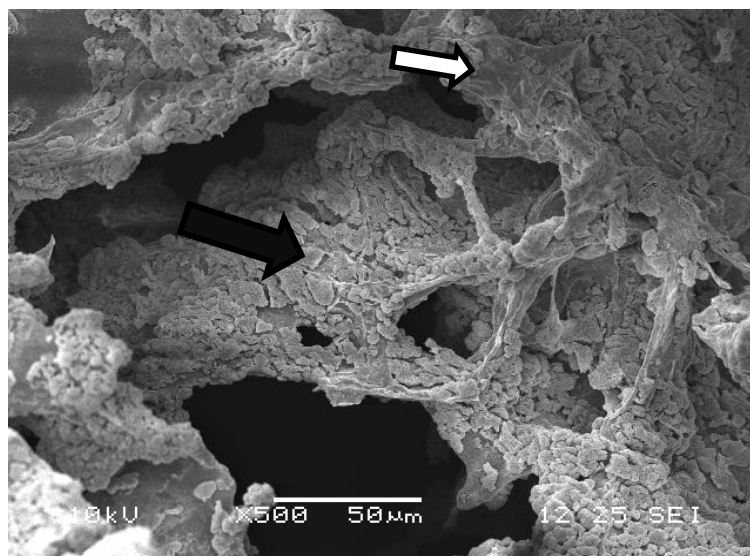


Figura 9. Micrografía electrónica de barrido obtenida del material de colágeno-quitosano obtenido por método de iniciación térmica en proporción de masa 2:1. El aumento utilizado fue 500x. La flecha negra señala el quitosano, mientras que la blanca el colágeno.

Por otro lado, en la figura 10 se muestra una micrografía electrónica de barrido del material obtenido a partir de método de iniciación térmica con una proporción en peso de 1:1. Se observa que el material presenta formación de poros heterogéneos y aglomeración de quitosano en algunas áreas del material, el quitosano se precipita debido al aumento de pH (pH=7.4) que se realiza durante la metodología de síntesis. Se tomaron 4 zonas distintas que presentaron poros y se midieron aquellos que se podía distinguir el contorno completo, de esto se obtuvieron tamaños de poro de 20.6 a 133µm. Se observa que la aglomeración del quitosano no es uniforme, lo que concuerda con que la fluorescencia tampoco lo haya sido. El material obtenido presenta características distintas en cuanto a formación de poro y aglomeración de quitosano comparado con lo reportado por Xiaoliang (2011). Esto pudo deberse a que en este estudio se emplearon quitosanos con características distintas y colágena de fuente diferente a la utilizada por Xiaoliang.

En las micrografías obtenidas de ambas proporciones de colágena y quitosano (2:1 y 1:1), se observó que no presentaron formación de poros, que acorde con otros autores, son necesarios para promover la adhesión de las células a estas estructuras (Xiaoliang et al, 2011; Ding et al, 2007; Arpornmaeklong et al, 2007), sin embargo se obtuvo una estructura rugosa, en el cual las células podrían crecer, aunque al ser tan frágiles los materiales obtenidos no se pudieron utilizar para pruebas de viabilidad celular.

Posteriormente se realizó análisis de espectrofotometría de infrarrojo de los materiales obtenidos mediante iniciación térmica, para las proporciones de masa de 2:1 y 1:1 respectivamente (Figuras 11 y 12). En ambos espectros se localizan principalmente las bandas características de la colágena (región 1635.8cm^{-1} de la amida I y 1560cm^{-1} de amida II) que traslapan las bandas debidas al quitosano. En ninguno de los dos espectros hubo deformación de picos o formación de bandas, esto debido a que no se forman enlaces covalentes sino enlaces iónicos entre el grupo amino del quitosano y el carboxilo de los aminoácidos glicina y prolina de las cadenas polipeptídicas de la α hélice del colágena (Zonggang *et al*, 2007).

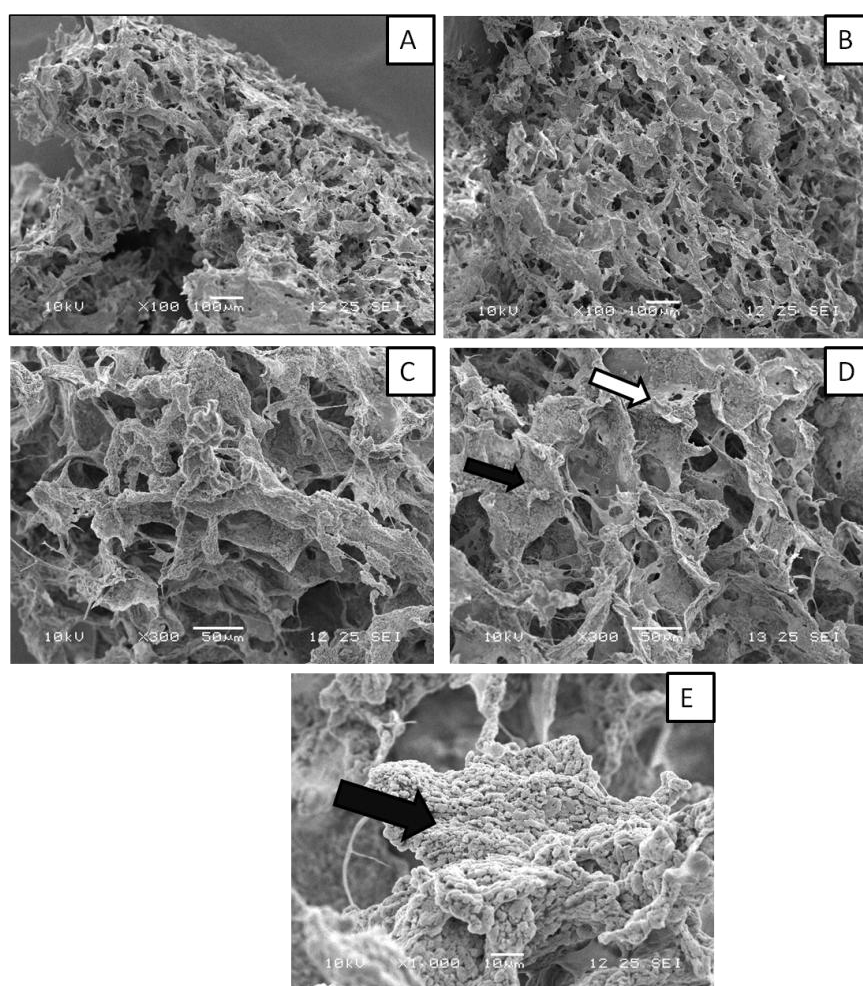


Figura 10. Micrografía electrónica de barrido del material de colágena-quitosano obtenido por método de mezcla e iniciación térmica en proporción de masa 1:1. Donde: A)100x, B)100x, C)300x, D) 300x y E) 1000x. La flecha negra señala el quitosano, mientras que la blanca el colágeno.

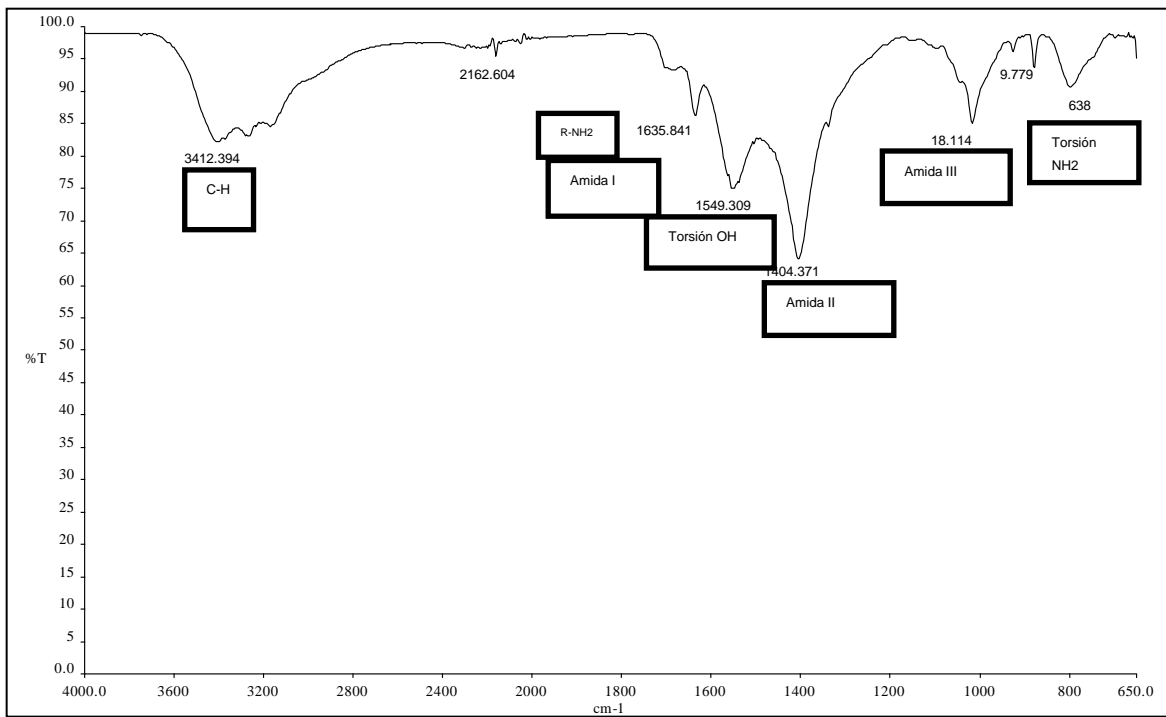


Figura 11. Espectro de infrarrojo obtenido para el material de colágena-quitosano mediante el método de iniciación térmica, en proporción de masas de 2:1.

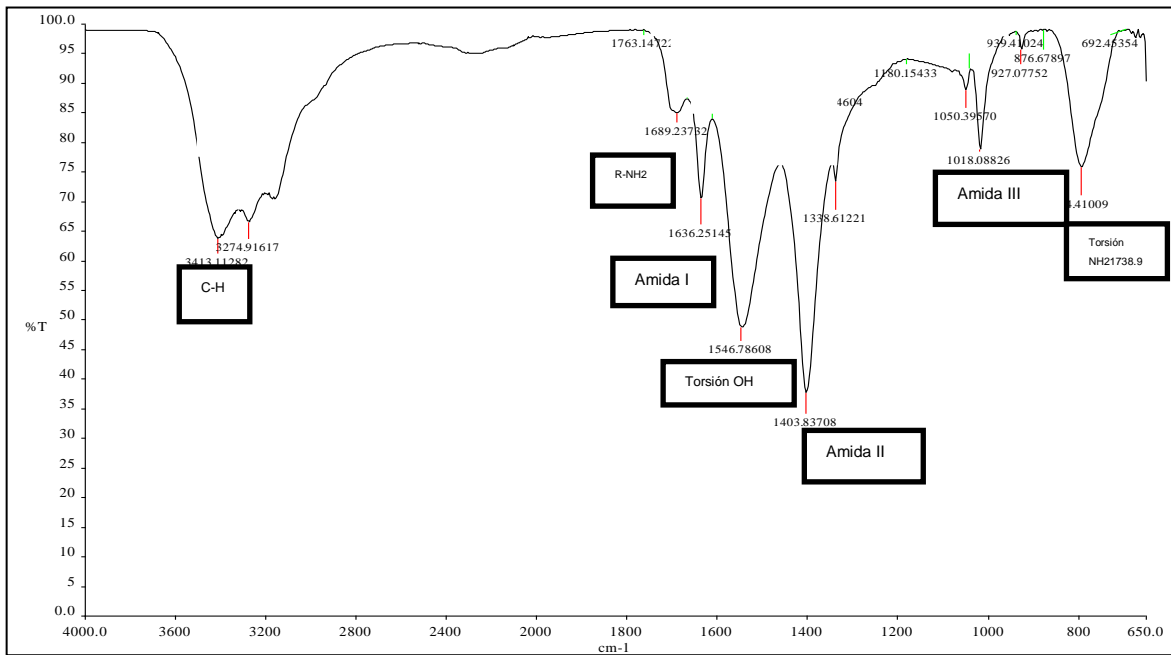


Figura 12. Espectro de infrarrojo obtenido para el material de colágena-quitosano mediante el método de mezcla e iniciación térmica, en proporción de masas de 1:1

9.6.2 Método de entrecruzamiento de quitosano y colágena con glutaraldehído.

Se produjeron andamios de colágena-quitosano en proporciones 2:1 y 1:1, obteniéndose materiales esponjosos, con formación de poros evidente y de color blanquecino. Se les realizó análisis de microscopía de fluorescencia con blanco de calcoflúor, para observar la distribución de quitina-quitosano. En la figura 13 se señalan mediante un círculo rojo las zonas con mayor fluorescencia, dichas áreas presentaron mayor cantidad de quitina-quitosano. En las seis micrografías que se presentan en dicha figura se ve una fluorescencia general, esto debido a que el quitosano se encuentra a lo largo de toda la estructura de colágena, para obtener más detalle de ello se realizó SEM.

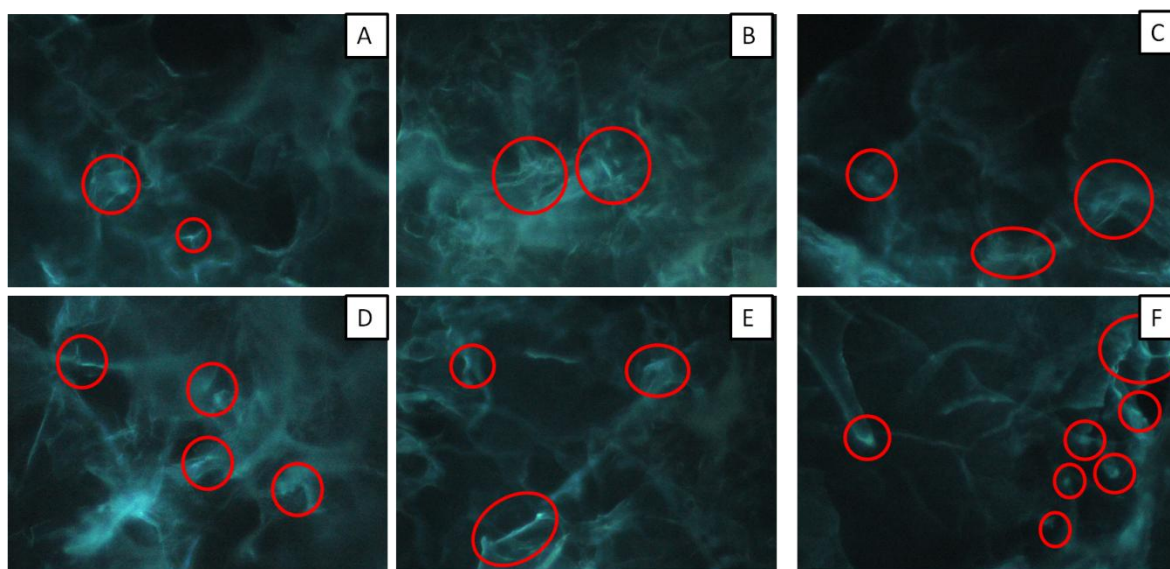


Figura 13. Micrografías de fluorescencia del material de colágena-quitosano obtenido por método de entrecruzamiento con glutaraldehído. Donde A, B y C son proporción de masa 2:1 y D, E y F son proporción de masa 1:1. El aumento utilizado fue 40x. El círculo rojo encierra las zonas con mayor fluorescencia.

En la figura 14 se muestra una micrografía electrónica de barrido, se puede observar la formación heterogénea de poros y una nanoestructura fibrosa y enredada debido al entrecruzamiento producido por el glutaraldehído en la colágena y el quitosano así como el entrecruzamiento entre cadenas de colágena. Se analizaron 4 zonas distintas con poros y se midieron aquellos a los que se les podía distinguir el contorno completo, de éstos se obtuvieron tamaños de poro de 14 a 116 μm . El material producido presentó características similares, en cuanto a la formación de poro y nanoestructura, con lo reportado por Xiaoliang (2011).

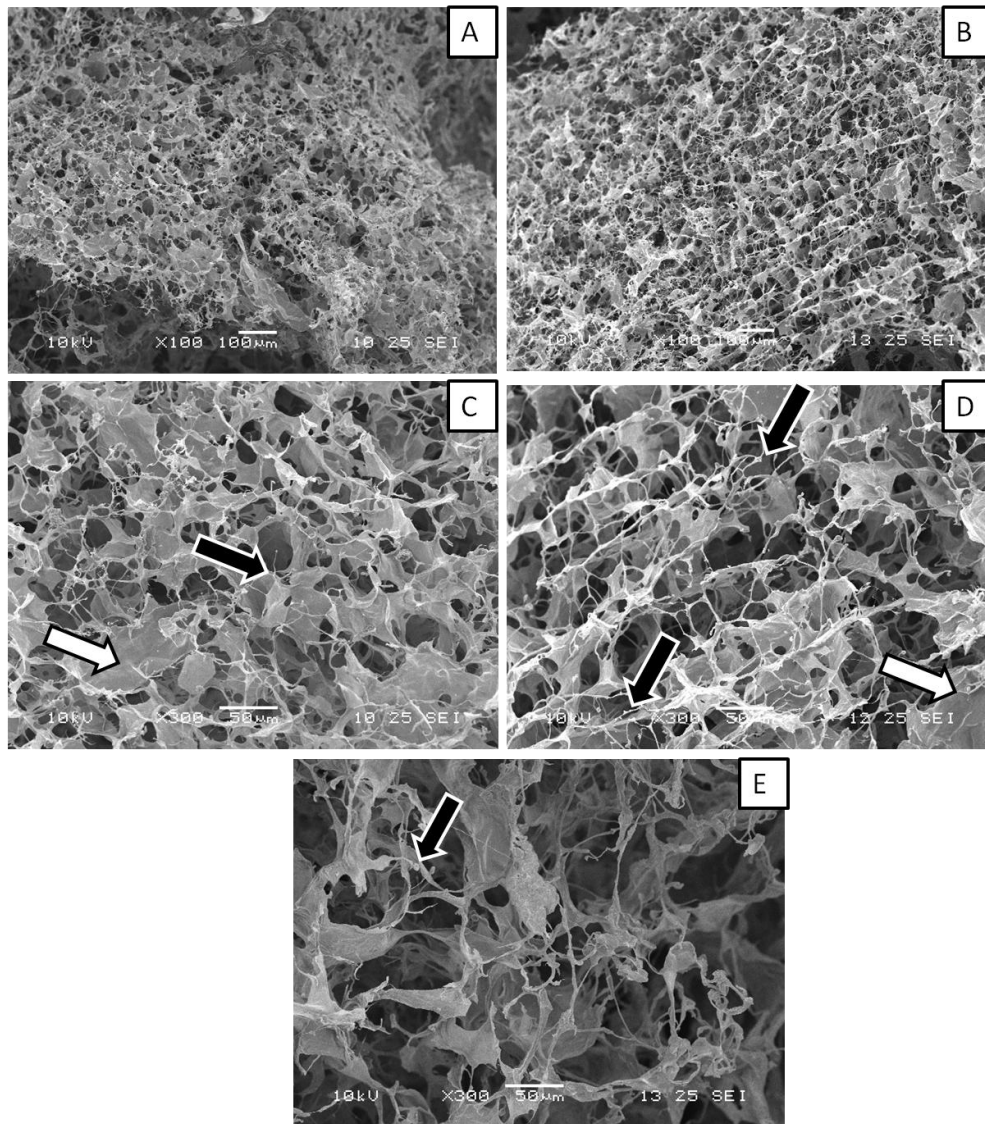


Figura 14. Micrografía electrónica de barrido obtenida del material de colágena-quitosano obtenido por método de entrecruzamiento con glutaraldehído en proporción de masa 2:1. Donde: A)100x, B)100x, C)300x, D) 300x y E) 300x. La flecha negra señala el quitosano, mientras que la blanca el colágeno.

En la figura 15 se muestra una micrografía electrónica de barrido, donde el material presentó formación heterogénea de poros así como hileras en “escamas” y una nanoestructura fibrosa y enredada debido al entrecruzamiento. Se tomaron 4 zonas distintas que presentaron poros y se midieron aquellos a los que se les podía distinguir el contorno completo, de éstos se obtuvieron tamaños de poro de 25.6 a 100µm. Al comparar el material obtenido con lo

reportado por Xiaoliang (2011), presentó características parecidas en cuanto a la formación de poro y nanoestructura.

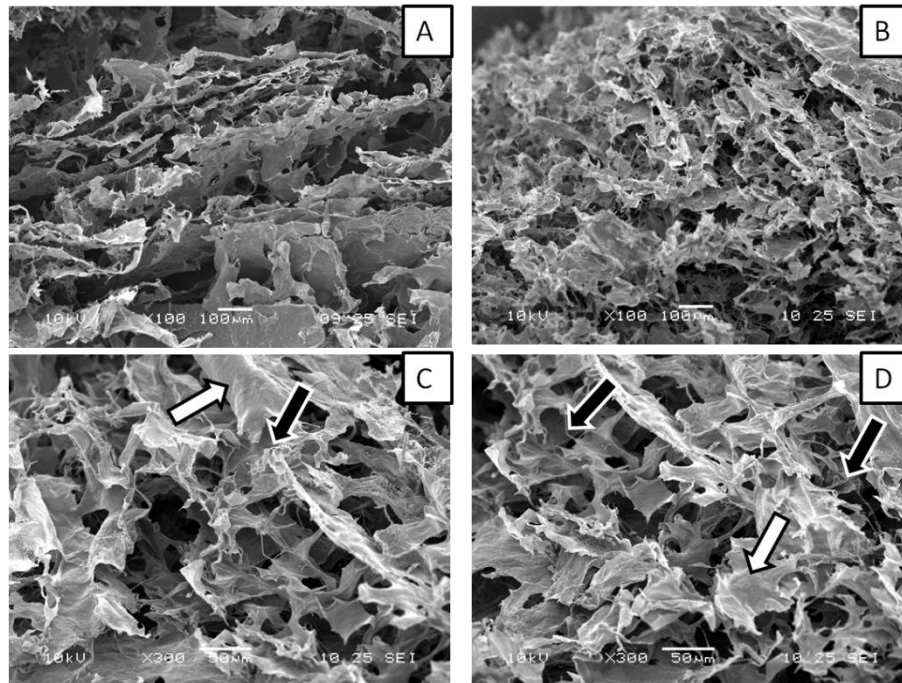


Figura 15. Micrografía electrónica de barrido obtenida del material de colágena-quitosano obtenido por método de entrecruzamiento con glutaraldehído en proporción de masa 1:1. Donde: A)100x, B)100x, C)300x y D) 300x. La flecha negra señala el quitosano, mientras que la blanca el colágeno.

Los materiales obtenidos con el método de entrecruzamiento de colágena con quitosano mediante glutaraldehído presentaron poros con tamaño adecuado para la adhesión de células como fibroblastos (Xiaoliang *et al*, 2011; Ding *et al*, 2007), así como una estructura esponjosa lo cual presenta mayor potencial para ser utilizados para realizar las pruebas de viabilidad celular.

Finalmente se realizó espectrofotometría de infrarrojo a los materiales obtenidos para la identificación de los enlaces formados acordes con la reacción presentada en la figura 16.

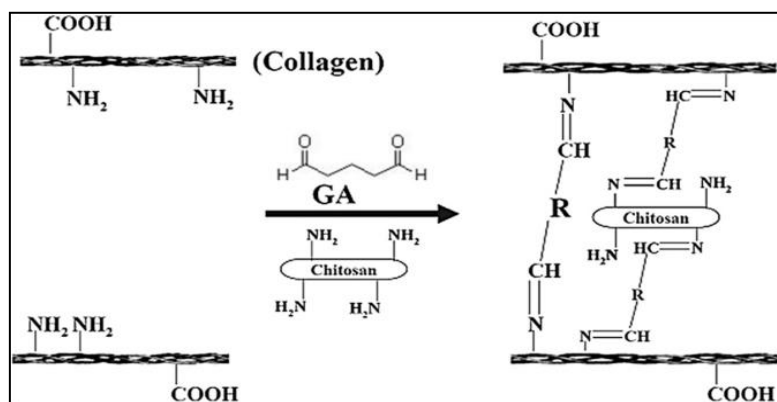


Figura 16. Reacción de entrecruzamiento entre colágena y quitosano, utilizando glutaraldehído como agente entrecruzante (Ma et al, 2003).

En las figuras 17 y 18 se muestran los espectros de infrarrojo obtenidos a partir de los materiales realizados por el entrecruzamiento de colágena tipo I y quitosano con glutaraldehído. El entrecruzamiento con glutaraldehído se lleva a cabo mediante un enlace covalente entre el grupo amino del quitosano con uno de los carboxilo terminales del glutaraldehído formando una imina, mientras que la colágena forma de igual manera una imina entre los grupo amino de los aminoácidos y el carboxilo terminal del glutaraldehído (Xiaoliang *et al*, 2011).

En ambas figuras (17 y 18) se observa una disminución en la banda del grupo amino del quitosano que se presenta aproximadamente a una longitud de onda de 1619.99cm^{-1} con su confirmación a los 849.70cm^{-1} . En los espectros que se obtienen para ambos materiales se observa principalmente las bandas características del colágeno, lo cual indica que la modificación que se está llevando a cabo es en el grupo amina perteneciente a los aminoácidos que forman a la colágena (Ma et al, 2003).

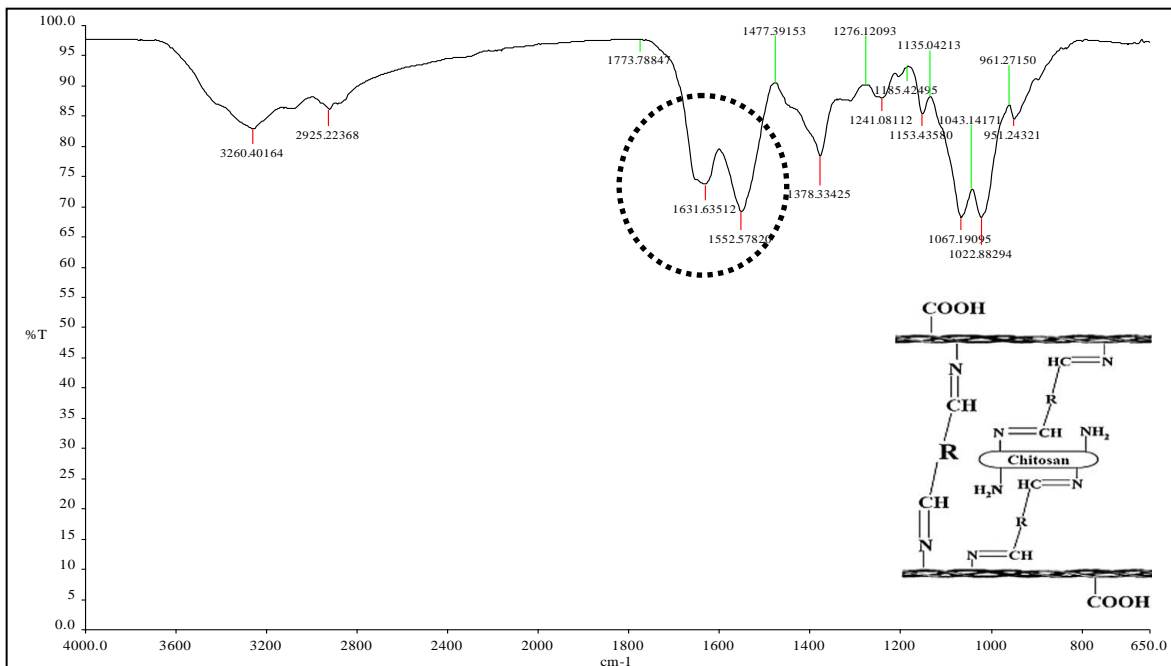


Figura 17. Espectro de infrarrojo obtenido para el material de colágena-quitosano entrecruzado con glutaraldehído, en proporción de masas de 2:1. El círculo punteado señala la banda del grupo amino del quitosano que se ve modificada.

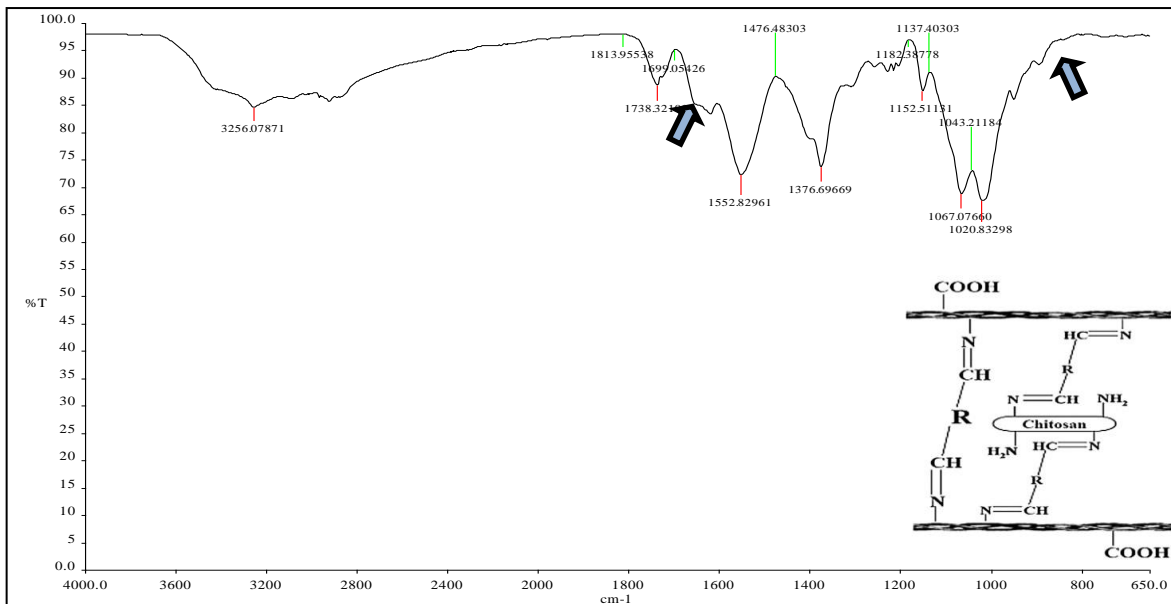


Figura 18. Espectro de infrarrojo obtenido para el material de colágena-quitosano entrecruzado con glutaraldehído, en proporción de masas de 1:1. La fecha gris señala las bandas del grupo amino que señala la banda del grupo amino del quitosano que se ve modificada.

9.6.3 Rendimiento.

El rendimiento en masa de los materiales obtenidos por el método de iniciación térmica y mediante entrecruzamiento con glutaraldehído fue 47.82 ± 4.57 y 61.01% , respectivamente, esta diferencia fue significativa ($\alpha \leq 0.05$) y se observó un mayor rendimiento con el método de entrecruzamiento con glutaraldehído.

9.6.4 Espesor.

Se midió el espesor de los materiales obtenidos por el método de iniciación térmica y mediante entrecruzamiento con glutaraldehído, obteniéndose una media de 1.61 ± 0.25 y 1.71 ± 0.63 mm respectivamente, sin haber diferencia significativa ($\alpha \leq 0.05$) entre los tratamientos.

9.6.5 Prueba de hinchamiento.

Una vez realizadas las pruebas anteriores con la colágena de piel de ternera se prosiguió a obtener los andamios con colágena de piel de cerdo, se varió el quitosano utilizando un quitosano comercial (Sigma) de bajo peso molecular ($PM = 136.6$ kDa y $DA = 16.24\%$) y el quitosano biológico-químico obtenido y caracterizado anteriormente. A éstos se les realizó la prueba de hinchamiento, erosión y viabilidad de fibroblastos, ya que presentaban menor fragilidad y no se encontraron reportes acerca de andamios hechos con éste tipo de colágena y quitosano biológico-químico y los únicos andamios encontrados en la literatura están sintetizados con base en quitosano comercial y colágena bovina (Xiaoliang *et al*, 2011; Ma *et al*, 2003)

Para determinar la capacidad de hinchamiento de los andamios obtenidos, se incubaron en DMEM, a 37°C para simular condiciones fisiológicas. En la figura 19 se observa el su comportamiento, el obtenido a partir de quitosano biológico-químico se saturó a los 5 días, mientras que el producido con el quitosano comercial, a los 2 días se hincha completamente.

Los andamios obtenidos mediante iniciación térmica a partir de quitosano biológico-químico mostraron un hinchamiento en el equilibrio de $810.11 \pm 53.05\%$, mientras que los obtenidos de quitosano comercial fue de $656.85 \pm 144.05\%$ no mostrando diferencia significativa entre ellos mediante la prueba de Tukey, indicando que no hay efecto del quitosano empleado en la elaboración del andamio mediante el método de iniciación térmica sobre el hinchamiento que presentan los materiales a lo largo del tiempo.

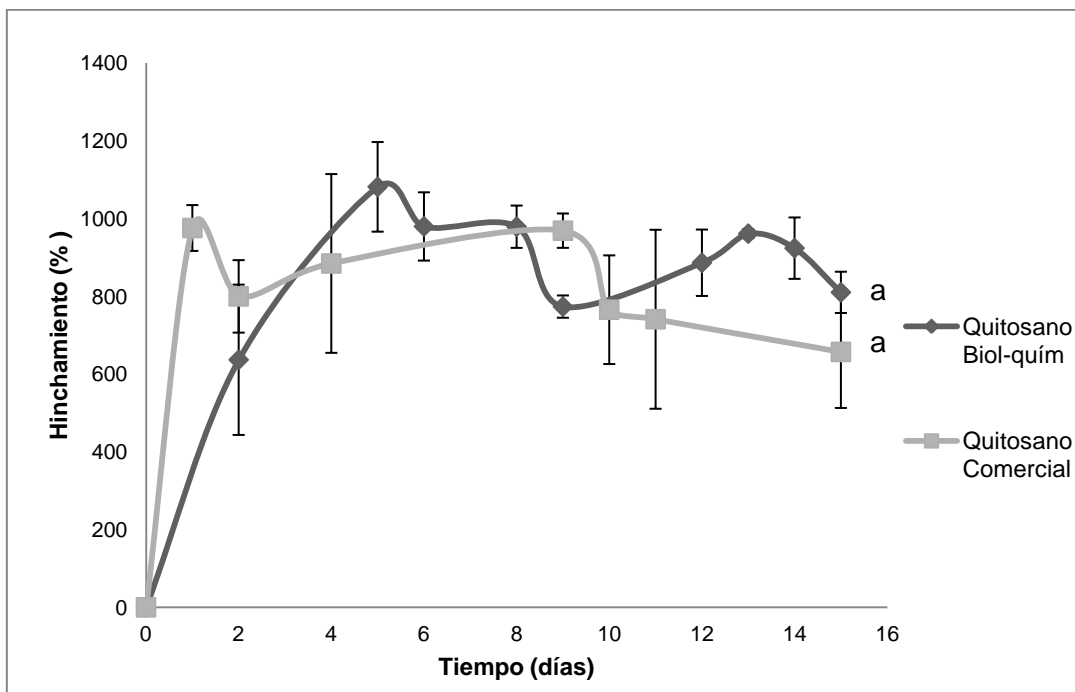


Figura 19. Cambio en la capacidad de hinchamiento de los andamios obtenidos a partir de colágena porcina tipo I y quitosano biológico-químico (Biol-quím) y comercial, mediante el método de iniciación térmica de formación de cadenas de colágena. Letras diferentes presentan diferencia significativa ($\alpha \leq 0.05$) con la prueba de Tukey.

Por otro lado, se analizó la capacidad de hinchamiento de los andamios obtenidos a partir del entrecruzamiento del quitosano con la colágena mediante glutaraldehído. En la figura 20 se observa el producido con quitosano comercial presenta hinchamiento máximo a los 4 días, mientras que los de quitosano bilógico-químico hasta el día 9. Los elaborados a partir de quitosano biológico-químico presentaron un hinchamiento a los 15 días de prueba de $3439.45 \pm 320.24\%$ mientras que los de quitosano comercial de $2544.91 \pm 39.49\%$, mostrando diferencia significativa ($\alpha \leq 0.05$) entre ellos mediante la prueba de Tukey. Por lo que proponemos el quitosano empleado en la elaboración del andamio mediante el método entrecruzamiento con glutaraldehído tiene efecto sobre el hinchamiento del material. Siendo el producido con quitosano biológico-químico el que presenta mayor hinchamiento a los 15 días de prueba, esto puede deber se a que, al tener una masa molecular mayor, comparado con el comercial, el polímero es más largo y es más difícil que absorba el agua rápidamente, por lo que tiene que pasar más tiempo para poder hincharse con mayor facilidad. Cabe mencionar que con este tratamiento no se llegó a un hinchamiento en el equilibrio, por lo que se analizó el hinchamiento presentado al último día de prueba (día 15).

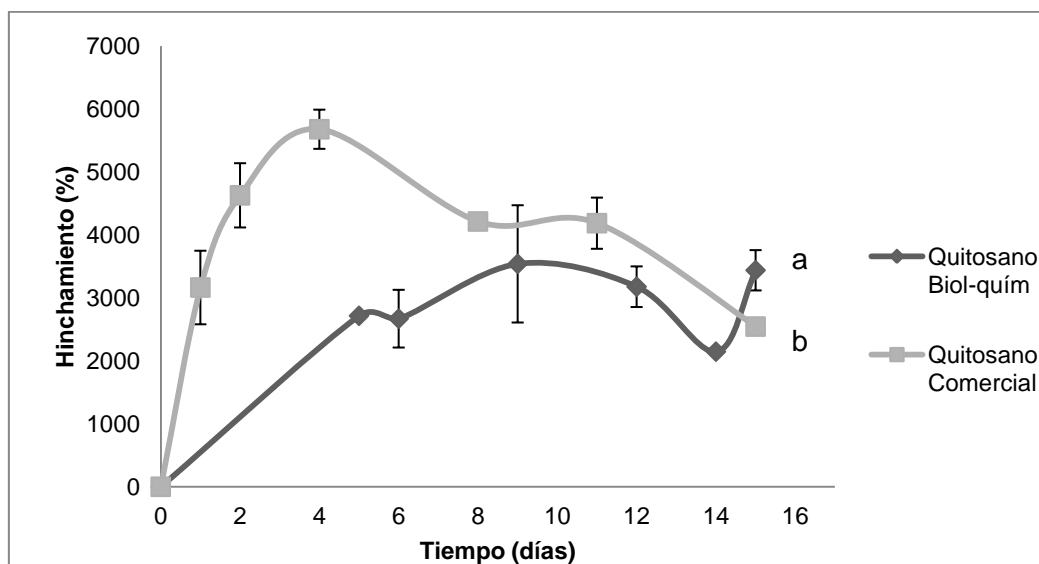


Figura 20. Cambio en la capacidad de hinchamiento de los andamios obtenidos a partir de colágena porcina tipo I y quitosano biológico-químico (Biol-quím) y comercial, mediante el método de iniciación térmica de formación de cadenas de colágena. Letras diferentes presentan diferencia significativa ($\alpha \leq 0.05$) con la prueba de Tukey.

Al realizar el análisis estadístico de comparación de medias de Tukey entre los métodos de obtención y los quitosanos empleados, se observa que existe una diferencia significativa entre las metodologías empleadas (Tabla 8). Siendo el entrecruzamiento con glutaraldehído con quitosano biológico-químico y la colágena porcina tipo I el que presenta una capacidad de hinchamiento mayor que los demás, lo que es deseable ya que al poder absorber mayor cantidad de medio de cultivo (DMEM), es lógico pensar que podría proporcionar un mejor medio para el desarrollo celular.

Tabla 8. Capacidad de hinchamiento a los 15 días de estudio de los materiales obtenidos a partir de los métodos de iniciación térmica y de entrecruzamiento con glutaraldehído, utilizando dos quitosanos diferentes. Letras diferentes presentan diferencia significativa ($\alpha \leq 0.05$) con la prueba de Tukey.

Método de obtención y quitosano empleado	Hinchamiento (%)
Térmico, quitosano biológico-químico.	810.11±53.05 ^a
Térmico, quitosano comercial.	656.85±144.05 ^a
Entrecruzamiento con glutaraldehído, quitosano biológico-químico.	3439.45±320.24 ^b
Entrecruzamiento con glutaraldehído, quitosano comercial.	2544.91±39.49 ^c

9.6.6 Prueba de erosión.

La prueba de erosión se realizó para observar la degradación que presentan los materiales con el tiempo en DMEM a 37°C, para simular condiciones fisiológicas. En la figura 21 se muestra el comportamiento de los materiales obtenidos a partir del método de iniciación térmica con quitosano biológico-químico y comercial. Se observó que los materiales producidos con quitosano comercial presentan una mayor erosión desde el día 2 del análisis, en comparación con los producidos con el quitosano biológico-químico.

Al día 14 de incubación, los andamios elaborados mediante iniciación térmica con quitosano biológico-químico presentan una erosión del $21.54 \pm 2.18\%$, mientras que los de quitosano comercial, $40.09 \pm 6.94\%$. Aunque la diferencia parece grande, no fue significativa (prueba Tukey, $\alpha \leq 0.05$), es decir que no hay efecto del quitosano utilizado sobre la erosión que presentan los andamios en el día catorce de análisis, por lo que se puede utilizar cualquiera de los dos quitosanos.

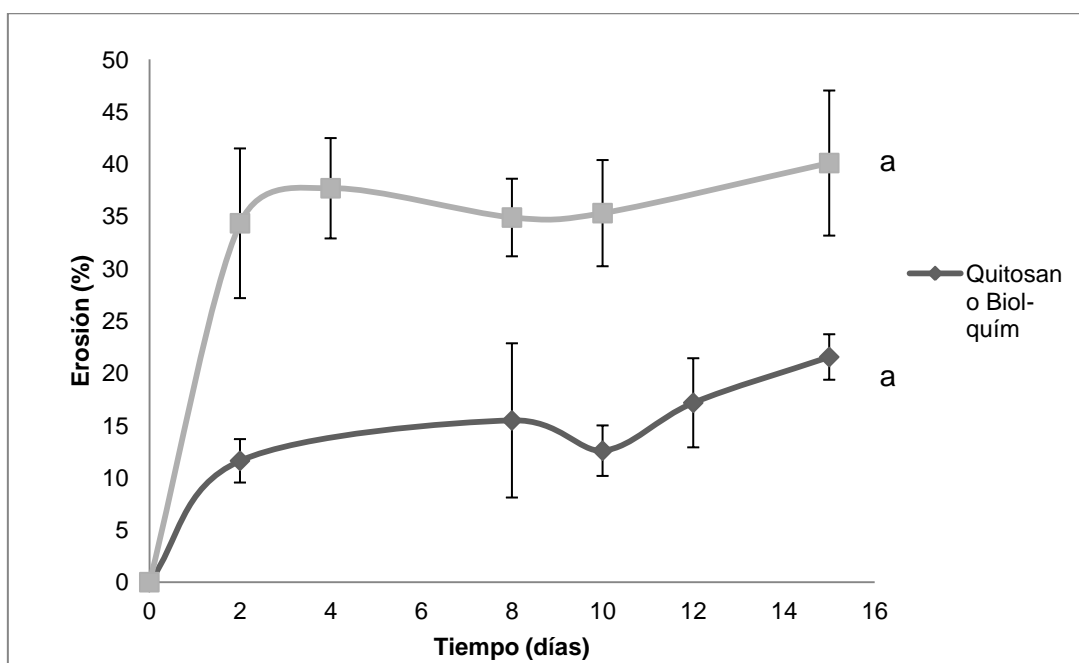


Figura 21. Cambio en la erosión de los andamios obtenidos a partir de colágena porcina tipo I y quitosano biológico-químico (Biol-quím) y comercial, mediante el método de iniciación térmica de formación de cadenas de colágena. Letras diferentes presentan diferencia significativa ($\alpha \leq 0.05$) con la prueba de Tukey.

Se realizó en los materiales sintetizados a partir del entrecruzamiento químico con glutaraldehído y quitosano biológico-químico y comercial. En la figura 22 se presenta el comportamiento de los andamios en la prueba de erosión; se observa que ninguno de los dos materiales presentan erosión hasta el día ocho, donde los materiales con quitosano comercial presentan mayor deterioro. Al realizar el análisis estadístico (prueba Tukey, $\alpha \leq 0.05$) se observa que no hay diferencia significativa en el deterioro de los materiales producidos con quitosanos diferentes, en la erosión que se presenta al día 14 de incubación; por lo que es factible utilizar cualquiera de los dos quitosanos y no influirá en la erosión de los materiales.

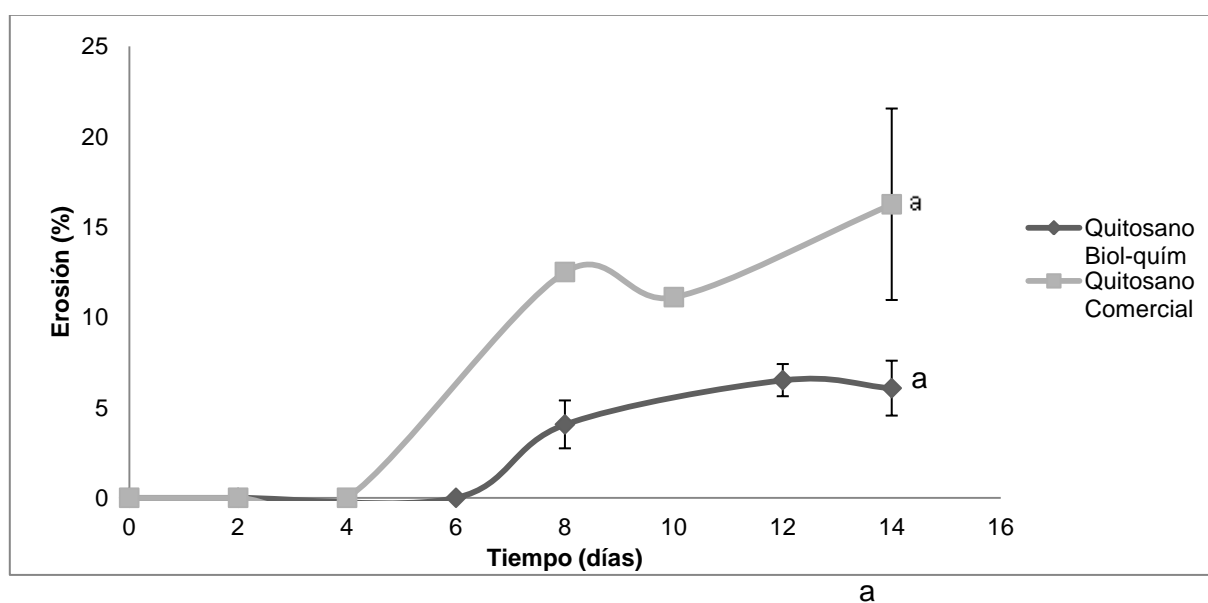


Figura 22. Cambio en la erosión de los andamios obtenidos a partir de colágena porcina tipo I y quitosano biológico-químico (Biol-quím) y comercial, mediante el método entrecruzamiento con glutaraldehído. Letras diferentes presentan diferencia significativa ($\alpha \leq 0.05$) con la prueba de Tukey.

Se realizó el análisis estadístico de comparación de medias de Tukey ($\alpha \leq 0.05$) entre los métodos de obtención y los quitosanos empleados y se observó diferencia significativa entre las metodologías empleadas y entre los quitosanos empleados (Tabla 9). Siendo el entrecruzamiento con glutaraldehído con el quitosano biológico-químico y comercial y la colágena porcina tipo I los que presentan una erosión menor que los demás, lo cual es deseable ya que proporcionarán por mayor tiempo una estructura de soporte para las células.

Tabla 9. Erosión de los materiales obtenidos a partir de los métodos de iniciación térmica y de entrecruzamiento con glutaraldehído, utilizando dos quitosanos diferentes. Letras diferentes presentan diferencia significativa ($\alpha \leq 0.05$) con la prueba de Tukey.

Método de obtención y quitosano empleado	Erosión (%)
Térmico, quitosano biológico-químico.	21.54±2.18 ^a
Térmico, quitosano comercial.	40.04±6.94 ^{a,b}
Entrecruzamiento con glutaraldehído, quitosano biológico-químico.	6.07±1.52 ^b
Entrecruzamiento con glutaraldehído, quitosano comercial.	16.25±5.30 ^b

9.6.7 Viabilidad celular mediante el método de calceína AM.

Para observar la viabilidad de los fibroblastos en los andamios de colágena con quitosano obtenidos por los dos métodos y dos quitosanos diferentes, se realizó un análisis de la fluorescencia de los fibroblastos sembrados mediante el microscopio de epifluorescencia a los 2, 7 y 10 días de cultivo. Debido a que los materiales sintetizados con quitosano comercial presentaron mucha autofluorescencia y, en algunos casos, las células no presentaron la morfología típica del fibroblasto la variabilidad en los resultados fue demasiado alta y no se reportan los resultados.

La figura 23 se muestra la colonización de los fibroblastos sobre los materiales sintetizados por iniciación térmica con quitosano biológico-químico y comercial con colágena porcina tipo I. Se observa que los fibroblastos sembrados en las esponjas con quitosano biológico-químico (figura 23 a, b y c) son viables (verde fluorescente) aunque no presentan alargamiento en los días analizados, además hay células muertas (puntos rojos) desde el día 2 de incubación. Por otro lado, los materiales producidos con quitosano comercial (figura 23 d, e y f) también presentan células muertas desde los 2 días de incubación, aunque en éstos hay fibroblastos alargados y adheridos, presentando, al día 10, la mayoría de las células en su forma diferenciada.

La presencia de células alargadas en los materiales con quitosano comercial al día 10 se puede explicar con base en la masa molecular del quitosano, ya que de acuerdo con Minagawa (2006) si el polímero tiene menor peso molecular puede ser degradado con mayor facilidad produciendo oligómeros que aumentan la producción de enzimas y proliferación celular. Además, hay que mencionar que los quitosanos presentaron grados de acetilación distintos (quitosano comercial: 16.24% y biológico-químico: 5.09%). Chatelet (2001) encontró que a menor grado de acetilación mayor la adhesión y proliferación de fibroblastos, los resultados obtenidos en este trabajo fueron contrarios ya que a mayor grado de acetilación los fibroblastos presentaron mayor adhesión, proliferación y morfología alargada. Finalmente, podemos concluir que se obtuvieron mejores resultados en la viabilidad de fibroblastos humanos in vitro que lo reportado por Mori (1997), quien encontró que el quitosano no favorece la viabilidad ni la reproducción de fibroblastos in vitro.

En la figura 24 se muestra el desarrollo de los fibroblastos humanos en los materiales sintetizados por entrecruzamiento con glutaraldehído de quitosano biológico-químico y comercial con colágena porcina tipo I. Se observa que los fibroblastos sembrados en las esponjas con quitosano biológico-químico (figura 24 a, b y c) presentan viabilidad (verde fluorescente), algunas células muertas (puntos rojos) y forma esférica en todos los días de estudio. Por otro lado en los andamios sintetizados con quitosano comercial (figura 24 d, e y f) hay células muertas desde los 2 días de incubación y los fibroblastos no presentan forma fusiforme en ninguno de los días analizados. La ausencia de células elongadas se puede deber a que al realizar el entrecruzamiento de quitosano con la colágena mediante glutaraldehído se forman nuevos enlaces y se hace una red de polímero más compleja que no permite que sea degradada fácilmente y que no puedan ser liberados los oligómeros del quitosano, que se ha visto que son los responsables de la producción enzimática y proliferación celular (Minagawa, 2006).

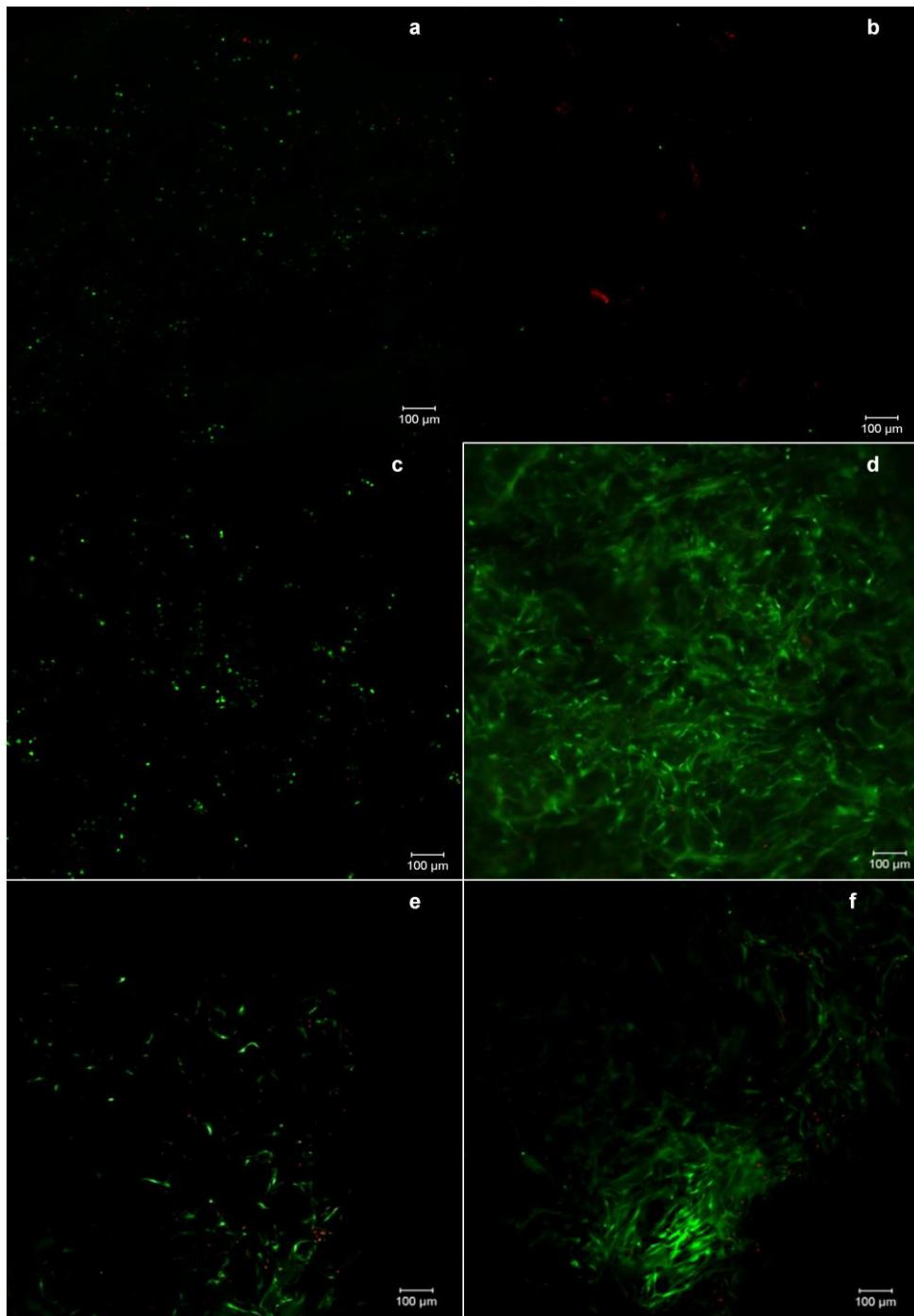


Figura 23. Micrografías de fibroblastos humanos sembrados en esponjas de quitosano con colágena porcina tipo I obtenida con el método iniciación térmica, teñidos mediante el método de calceína-AM. Donde a, b y c corresponden a los materiales con quitosano biológico-químico y d, e y f a los de quitosano comercial. Los días de incubación son: a, d 2 días; b, e 7 días y c, f 10 días. Las micrografías se muestran con un aumento de 10x.

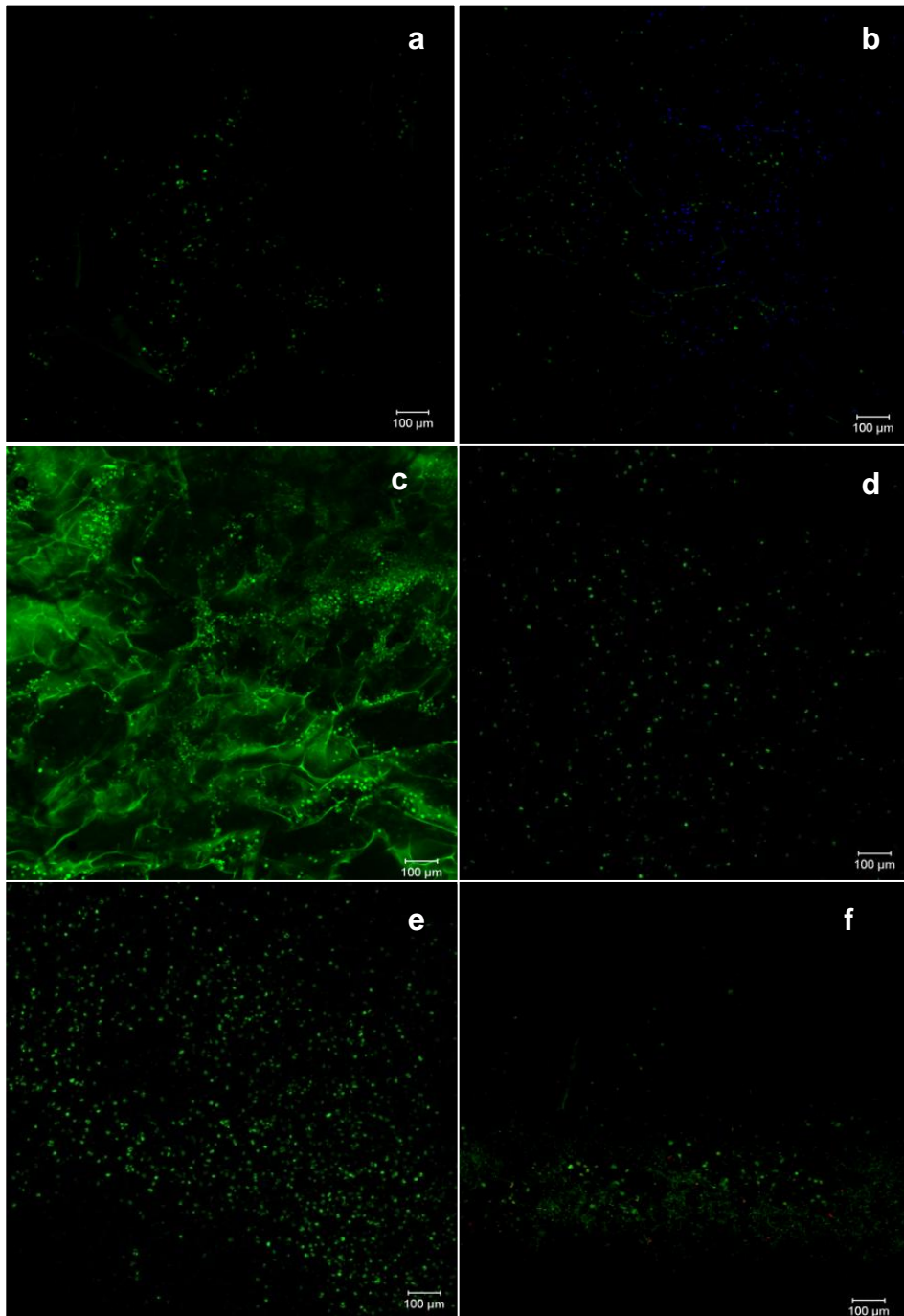


Figura 24. Micrografías de fibroblastos humanos sembrados en esponjas de quitosano con colágena porcina tipo I obtenida con el método de entrecruzamiento, teñidos mediante el método de calceína-AM. Donde a, b y c corresponden a los materiales con quitosano biológico-químico y d, e y f a los de quitosano comercial. Los días de incubación son: a, d 2 días; b, e 7 días y c, f 10 días. Las micrografías se muestran con un aumento de 10x.

9.7 Síntesis de películas con base en quitosano y colágena porcina tipo I.

9.7.1 Películas de quitosano-co-cítrico.

La concentración utilizada de quitosano y de ácido cítrico se decidió con base en la literatura (Corona-Suárez, 2010), que reporta que la concentración mínima necesaria de ácido cítrico para disolver 1.15% (p/v) de quitosano es 2.88% (p/v). La ecuación de la reacción de modificación del quitosano con ácido cítrico se muestra en la figura 25.

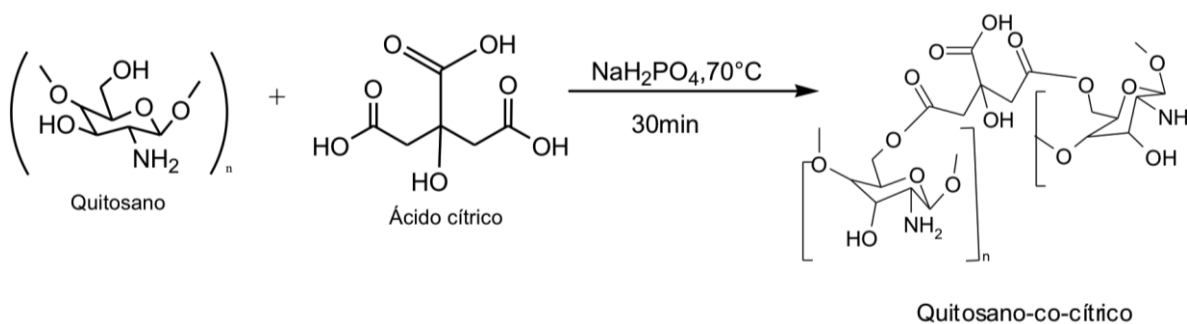


Figura 25. Reacción Ecuación de la reacción general para obtener quitosano-co-cítrico.

Con base en lo reportado por Alonso et al., (2009), la reacción comienza debido a la electronegatividad del oxígeno del grupo hidroxilo que se encuentra unido al metilo del quitosano (carbono 6), que puede atacar al o los carbonos carboxílicos y formar un enlace éster con el ácido cítrico en el carbón 1. Se utiliza como catalizador al monofosfato de sodio debido a que éste forma momentáneamente el citrato de sodio y favorece la formación del producto. Cabe mencionar que a pesar de que en el mecanismo y reacción anteriores solo se muestra la unión de una molécula de quitosano con el ácido cítrico a éste se le pueden unir más moléculas de quitosano en los dos carbonos carboxílicos libres, ya que el ácido cítrico tiene tres sitios de unión donde las cadenas de quitosano pueden reaccionar. El producto se obtiene en una disolución compuesta por quitosano-co-cítrico y ácido cítrico que no reaccionó. El mecanismo de reacción de la síntesis, propuesto, se presenta en la figura 26.

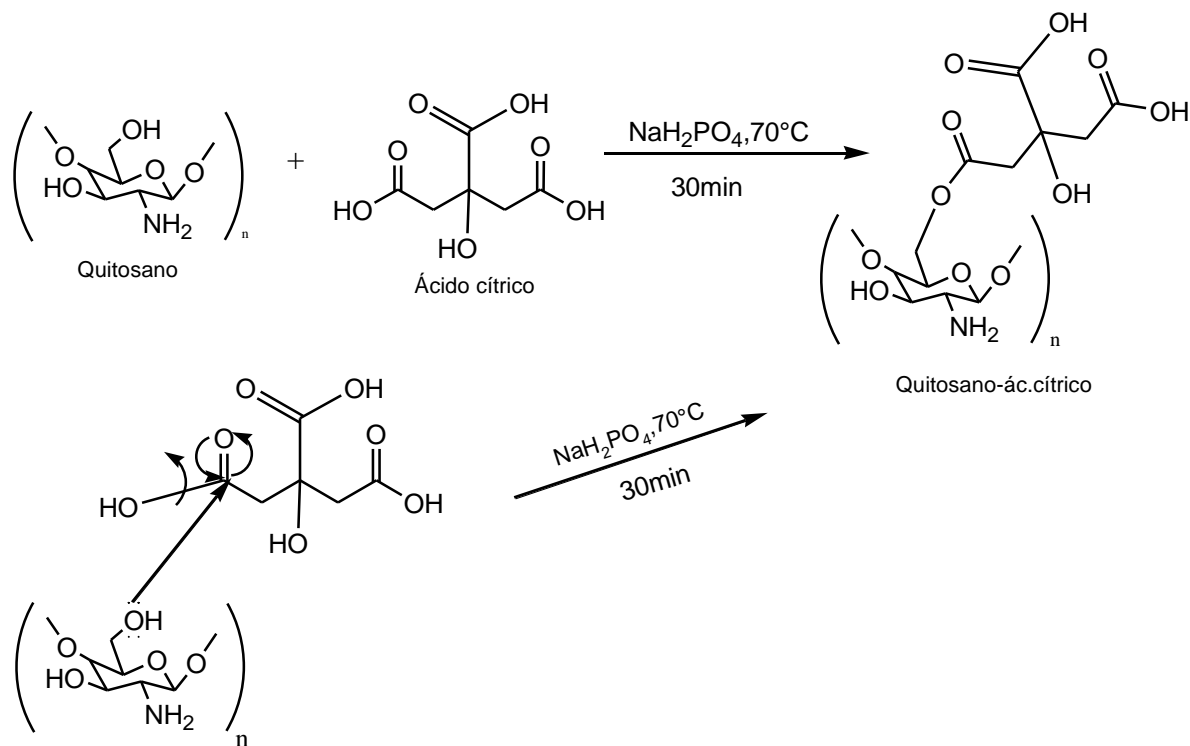


Figura 26. Mecanismo de reacción simplificado para la obtención de quitosano co-cítrico.

Fracción molar

Se probaron tres concentraciones de catalizador (NaH_2PO_4) de 0.066, 2.3 y 5% con la finalidad de determinar si hay una diferencia significativa en la incorporación de ácido cítrico en el quitosano, así como el efecto de esta modificación sobre el pH y la solubilidad en medio acuoso de los materiales obtenidos.

Se determinó la fracción molar de ácido cítrico incorporado al quitosano a las películas de quitosano-co-cítrico obtenidas mediante HRMN integrando los picos producidos por los protones del OH del ácido cítrico y de los protones H del quitosano. Ya que en dichos protones se propone que se está llevando a cabo la formación de un enlace éster y por lo tanto habrá una alteración en las señales emitidas por estos protones. Los resultados se muestran en la tabla 9, se observa que al utilizar 2.3% de catalizador se obtiene la mayor incorporación de ácido con respecto al quitosano, esto concuerda con lo reportado por

Alonso et al., (2009) quien realizó una reacción similar al entrecruzar quitosano con celulosa mediante ácido cítrico.

En la tabla 10 se resume el pH y la solubilidad de los copolímeros sintetizados con diferentes porcentajes de catalizador y purificados con acetona mediante la técnica de goteo en frío. En dicha tabla se observa que al utilizar 2.3% de catalizador no solo se obtiene la mayor fracción molar incorporada, sino también el pH más ácido debido a que hay más ácido cítrico en la molécula y la solubilidad más baja, ya que hay mayor alteración de la molécula de quitosano con el ácido cítrico. Es por ello que se decidió seguir trabajando con 2.3% de NaH_2PO_4 para la síntesis de quitosano-co-cítrico.

Tabla 10. Fracción molar de ácido cítrico incorporado al quitosano con diferentes proporciones de catalizador (NaH_2PO_4), pH y solubilidad en agua destilada presentada por los materiales sintetizados. Letras diferentes presentan diferencia significativa ($\alpha \leq 0.05$) con la prueba de Tukey.

NaH_2PO_4 (%)	Citrato		Solubilidad (%)
	Fracción molar (%)	pH	
0.066	20	4.44±0.08 ^a	76.70±3.51 ^a
2.3	65.1	3.50±0.18 ^b	49.76±2.23 ^b
5	22.1	5.27±0.40 ^c	81.17±2.06 ^a

Purificación de las películas de quitosano-co-cítrico.

Una vez elegido el porcentaje de fosfato se realizaron películas por el método de casting y se purificaron mediante Soxhlet con modificando el tiempos de purificación. Posteriormente, se analizó el pH y la solubilidad que presentaron las películas en agua, en la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos. Se observa que no hay diferencia significativa en la solubilidad en agua destilada que presentan las películas de quitosano-co-cítrico con el tiempo de lavado. Por el contrario, al realizar el análisis estadístico (Tukey, $\alpha \leq 0.05$) se encontró diferencia significativa en el pH de las películas, siendo las 24 h de lavado la que presenta la mayor remoción de ácido cítrico no reaccionado en la película. A pesar de que hay diferencia significativa en el pH de las películas, se decide utilizar un lavado de 8h con

acetona, ya que no existe diferencia significativa en la solubilidad presentada por los materiales y dicha variable respuesta tiene mayor impacto en el presente estudio.

Tabla 11. pH y solubilidad de las películas de quitosano-co-cítrico en agua destilada, purificadas mediante Soxhlet con acetona con tiempo de purificación. Letras diferentes presentan diferencia significativa ($\alpha \leq 0.05$) con la prueba de Tukey.

Tiempo de purificación (h)	pH	Solubilidad (%)
8	3.83±0.02 ^a	71.65±7.63 ^a
18	3.52±0.09 ^b	75.49±3.89 ^a
24	4.17±0.06 ^c	72.43±6.21 ^a
48	4.17±0.13 ^c	77.13±3.88 ^a

Posteriormente, se decidió realizar una segunda purificación en Soxhlet con etanol, ya que es más polar y puede remover mayor cantidad de ácido cítrico no reaccionado. Con base en los resultados obtenidos con la acetona se decidió hacer un lavado de 7h y analizar el pH y solubilidad que presentan los materiales, los resultados se muestran en la tabla 12. Se observa que con 7h de lavado se aumenta el pH de las películas y disminuye su solubilidad hasta un 10.51±0.69%, que se considera aceptable para los fines prácticos del proyecto.

Tabla 12. pH y solubilidad en agua destilada de las películas de quitosano-co-cítrico purificadas con acetona y posteriormente con etanol mediante Soxhlet. Letras diferentes presentan diferencia significativa ($\alpha \leq 0.05$) con la prueba de Tukey.

Tiempo (h)	pH	Solubilidad (%)
7	4.67±0.58	10.51±0.69

Espesor de las películas purificadas.

Una vez obtenidas las películas de quitosano-co-cítrico purificadas se les midió el espesor con un micrómetro, se obtuvo una media de 0.130±0.002mm.

Espectrofotometría de infrarrojo (ATR-FTIR).

Se realizó una espectrofotometría de infrarrojo (ATR-FTIR) al quitosano, ácido cítrico y a las películas purificadas, con la finalidad de detectar alteración en las bandas características del quitosano o del ácido cítrico. Los espectros obtenidos se muestran en las figuras 3, 27 y 28 respectivamente, así como las tablas (5, 13 y 14) donde se resumen las longitudes de onda con los grupos químicos a los cuales corresponden.

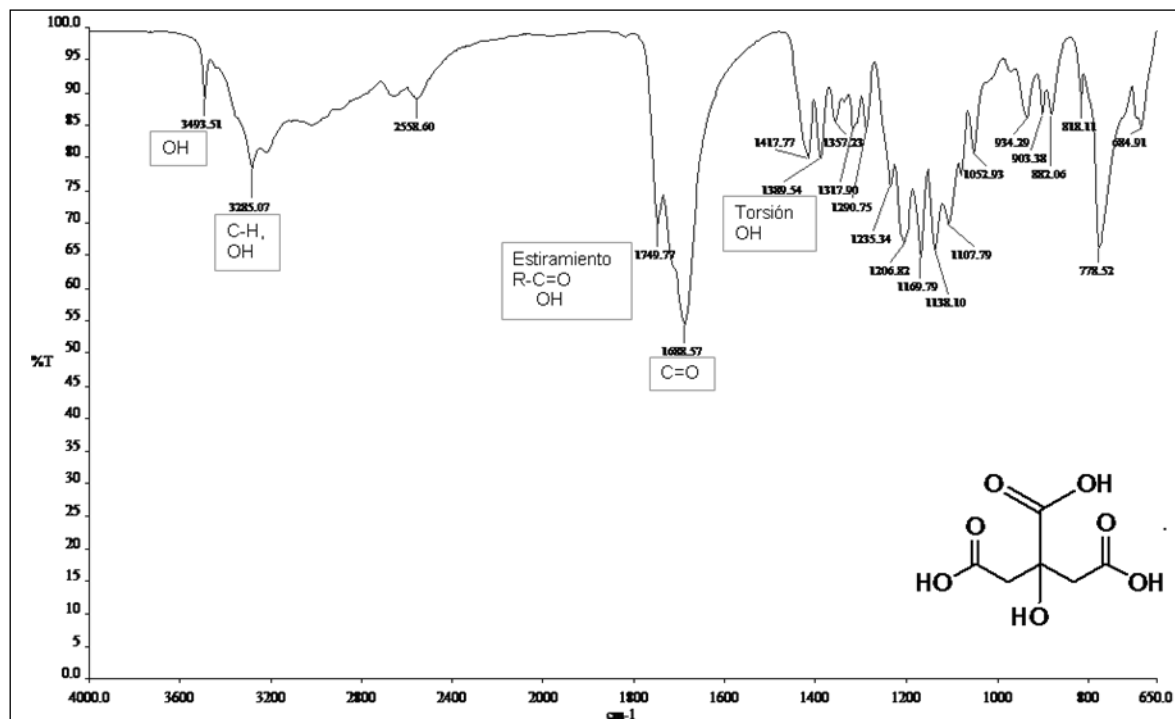


Figura 27. Espectro de infrarrojo obtenido con ATR-FTIR de una muestra de ácido cítrico.

Tabla 13. Grupos funcionales del espectro del ácido cítrico.

Longitud de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional
3493.51	Alcohol.
3285.07	Alcohol, alcanos.
1749.77	Estiramiento del grupo carboxilo.
1688.57	Confirmación de grupo carbonilo.
1389.54	Torsión del alcohol.

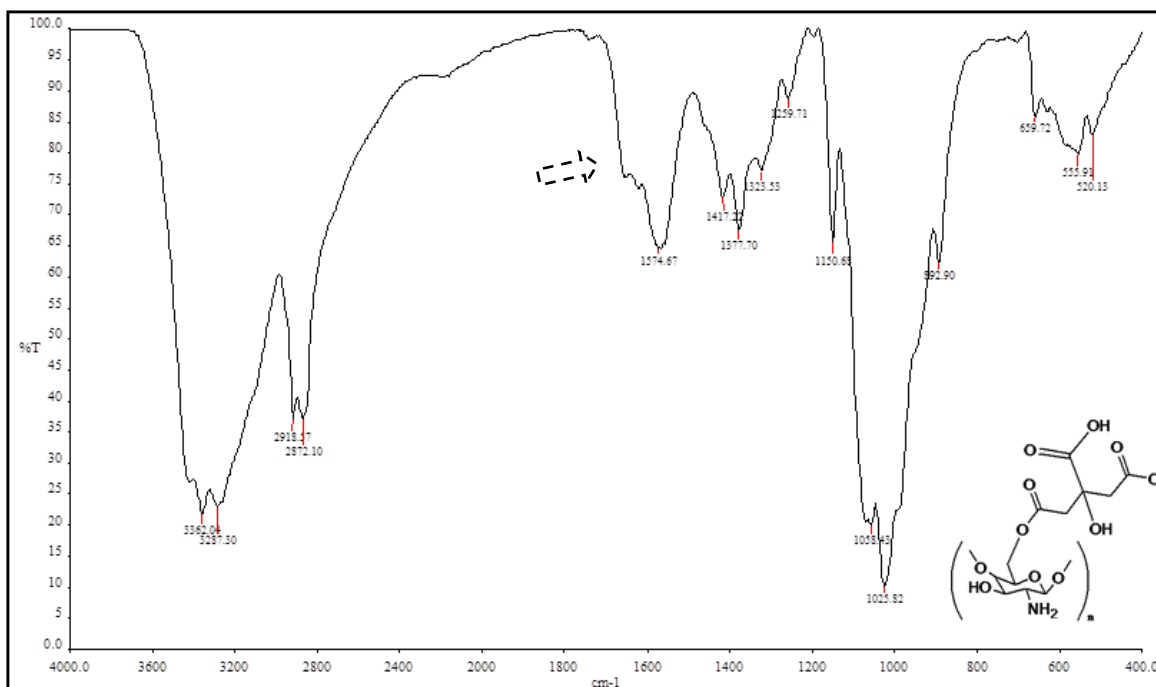


Figura 28. Espectro de infrarrojo obtenido de la película de quitosano-co-cítrico purificada. La flecha discontinua señala la posible banda debido al enlace éster formado entre el quitosano y el ácido cítrico.

Tabla 14. Grupos funcionales del quitosano-co-cítrico acorde al espectro obtenido con el ATR-FTIR.

Longitud de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional
3362.06 y 3287.30	Alcohol, amina primaria.
2918.57	Alcohol, carboxilo, amina primaria y alcanos.
1700 aprox.	Éster, confirmación del carbonilo.
1377.70	Torsión asimétrica de metilos.
1058.43 y 1150.68	Alcohol primario.
1058.43, 1150.68, 1259.71 y 1323.53	Confirmación de éster.

Al comparar las bandas obtenidas en los espectros de las figuras 5 y 28 se observa que en la última aparece una banda en 1700cm^{-1} aproximadamente, éste se debe al enlace éster que se forma entre el ácido cítrico y el quitosano (Alonso *et al*, 2009). Al observar la figura 27, correspondiente al espectro de transmitancia, obtenido del ácido cítrico se observa que en la figura 28 desaparecen diversos picos, principalmente el de 1749.77 cm^{-1} esto puede explicarse a la formación del enlace éster entre el carbono 6 del quitosano y el carbono 1 (carboxílico) del ácido cítrico, que se hace presente al formar una posible banda a 1700 cm^{-1} , así como su confirmación con las bandas obtenidas en 1058.43 , 1150.58 , 1259.71 y 1323.53cm^{-1} . Debido a que el espectro de infrarrojo no es muy claro en la presencia de una banda que confirme el enlace éster que se está formando entre el quitosano y el ácido cítrico se realizó un análisis de RMN H^1 de la película obtenida de quitosano-co-cítrico purificada con acetona y etanol. El espectro obtenido se muestra en la figura 30. Por otro lado se realizó un análisis del quitosano biológico-químico para compararlo con el obtenido con el quitosano-co-cítrico. Acorde con lo reportado por Pacheco, (2007), los picos característicos del espectro de resonancia magnética nuclear de protón del quitosano en su forma clorhidrato a 200MHz son:

Massif A: unidades acetiladas del protón H_2 y de los protones H_3 y H_6 entre 4 y 3.5ppm.

Massif B: unidades desacetiladas del protón H_2 de 3.3 y 3 ppm.

CH_3 grupo acetilado del biopolímero a los 2ppm.

Como se puede observar en la figura 29 se encuentra un espectro típico del quitosano RMN H^1 de quitosano en forma clorhidrato a 200MHz.

Acorde con Rodríguez *et al.* (2010) se sabe que el ácido cítrico presenta dos picos característicos en el espectro de RMN H^1 a 3.01 ppm y a 2.84 ppm siendo ambos dobletes. Como se observa en la figura 30 dichos picos aparecen alrededor de las ppm antes mencionadas, estos corresponden al ácido cítrico que se encuentra en el material. Por otro lado, al comparar la figura 29 con la figura 30 se observa que hay un cambio en el Massif A del quitosano y aparecen nuevos picos; esto se adjudica a la formación del enlace éster con el carbono 6 del quitosano y, por lo tanto, hay una variación en el comportamiento del núcleo y en su absorción de energía. Cabe mencionar que Larsen *et. al.*, (2008) publicaron la formación de un enlace éster no simétrico entre el ácido cítrico y el ácido 5-aminosalicílico, el cual se manifestaba en el espectro de RMN H^1 como un pico de absorción que se

interpretaba como “impureza” en el átomo de carbono correspondiente, por lo que es lógico pensar que en el caso del quitosano sucede lo mismo solo que en el pico del Massif A.

Una vez realizada la purificación con Soxhlet se observa que el pH es ácido, por lo que se realizó un lavado directo con agua destilada hasta pH=6 y se neutralizó con NaOH 2M y se lavó con agua destilada hasta pH neutro. Se realizó un análisis de HRMN de la película de quitosano-co-cítrico purificada mediante el método de Soxhlet con acetona y etanol y con pH neutro (Figura 30). Se obtuvo un espectro más limpio donde se observa la alteración del massif A debido al enlace éster formado, así como los dobles dobletes del ácido cítrico.

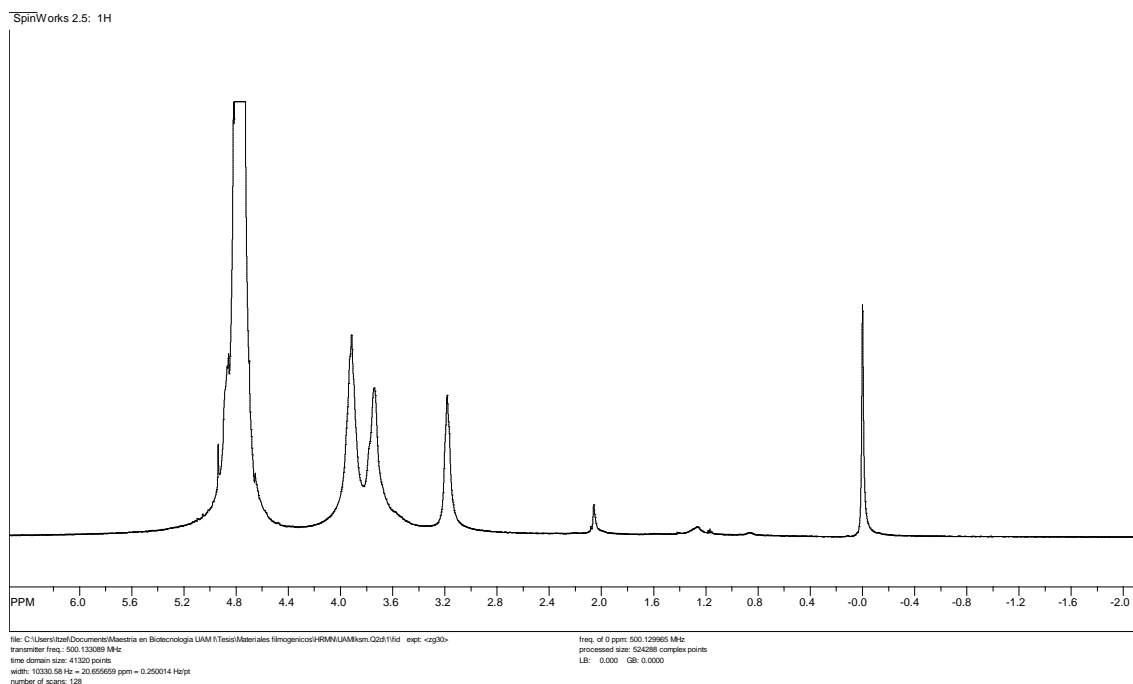


Figura 29. Espectro de RMN H^1 del quitosano biológico-químico utilizado.

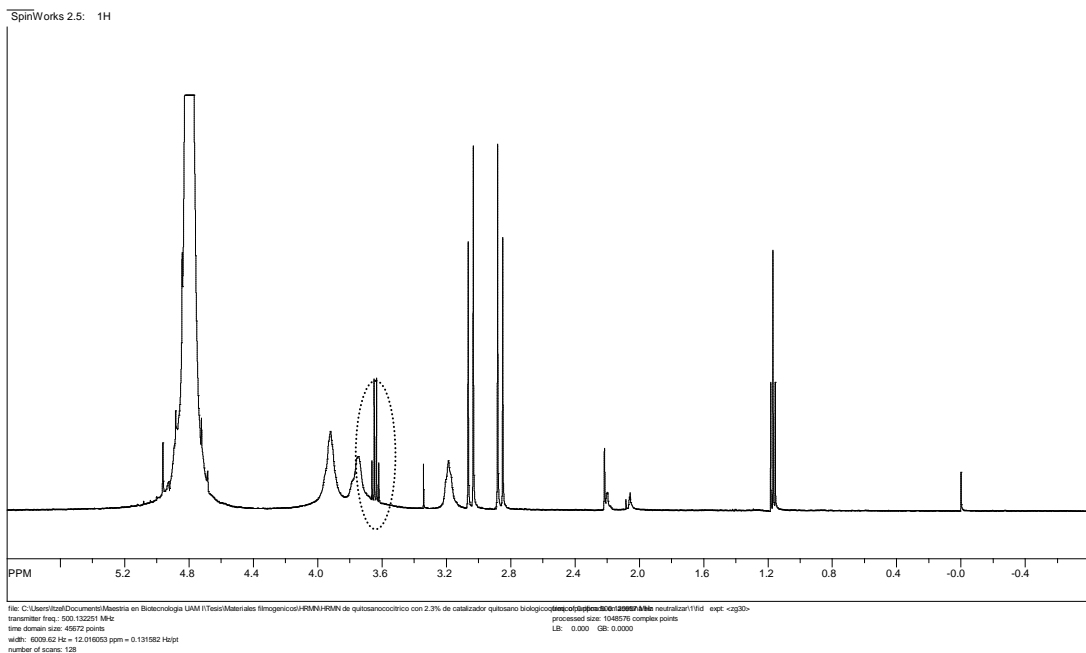


Figura 30. Espectro de RMN H¹ de las películas de quitosano-co-cítrico con quitosano biológico-químico, purificadas mediante Soxhlet con acetona y etanol. El círculo punteado indica la alteración en el massif A del quitosano.

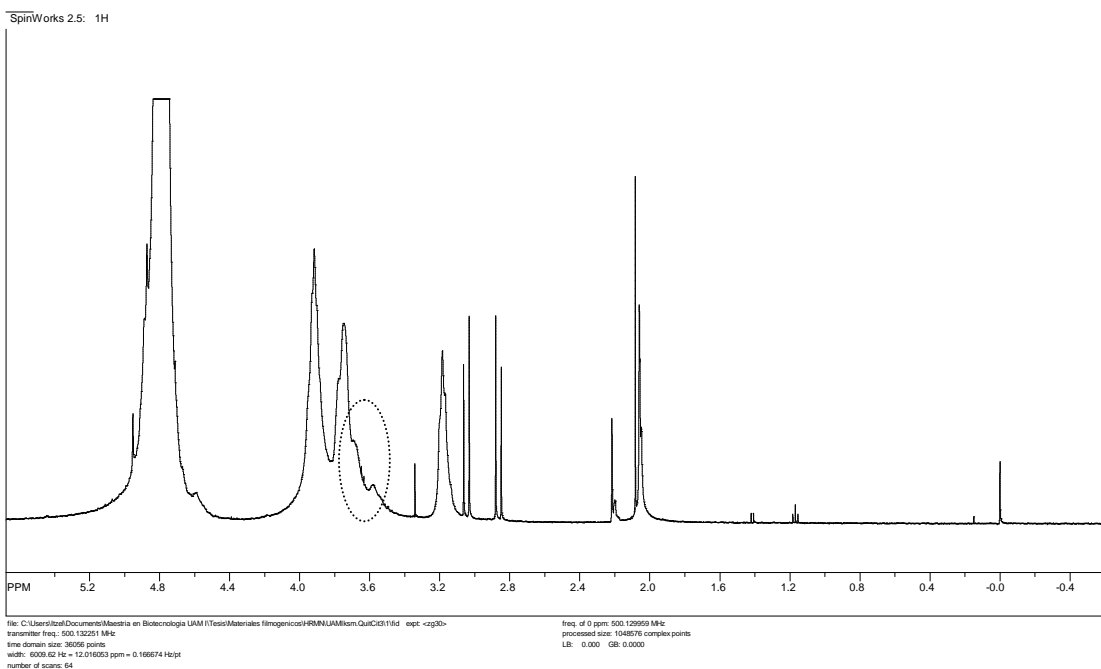


Figura 31. Espectro de RMN H¹ de las películas de quitosano-co-cítrico con quitosano biológico-químico, purificadas mediante Soxhlet con acetona y etanol y con pH neutro. El círculo punteado indica la alteración en el massif A del quitosano.

9.7.2 Películas de quitosano-co-cítrico recubiertas con colágena porcina tipo I.

Una vez que se determinaron las condiciones de purificación del quitosano-co-cítrico así como su caracterización, se recubrieron con la solución de colágena y fueron lavadas con agua destilada hasta pH neutro. Se realizó un análisis de espectrofotometría de infrarrojo (ATR-FTIR), los espectros obtenidos se muestran en la figura 32.

En la figura 32 C se observa el espectro correspondiente a las películas de quitosano-co-cítrico cubiertas de colágena porcina tipo I, en éste se observan las bandas características de la colágena por lo que se concluye que dicho material se encuentra en la superficie de la película. Como se mencionó anteriormente a las películas cubiertas con colágena se lavaron con agua destilada hasta pH neutro, el espectro correspondiente se muestra en la figura 32D donde se observa que la colágena se mantiene en la superficie de la película a pesar del lavado y del pH neutro.

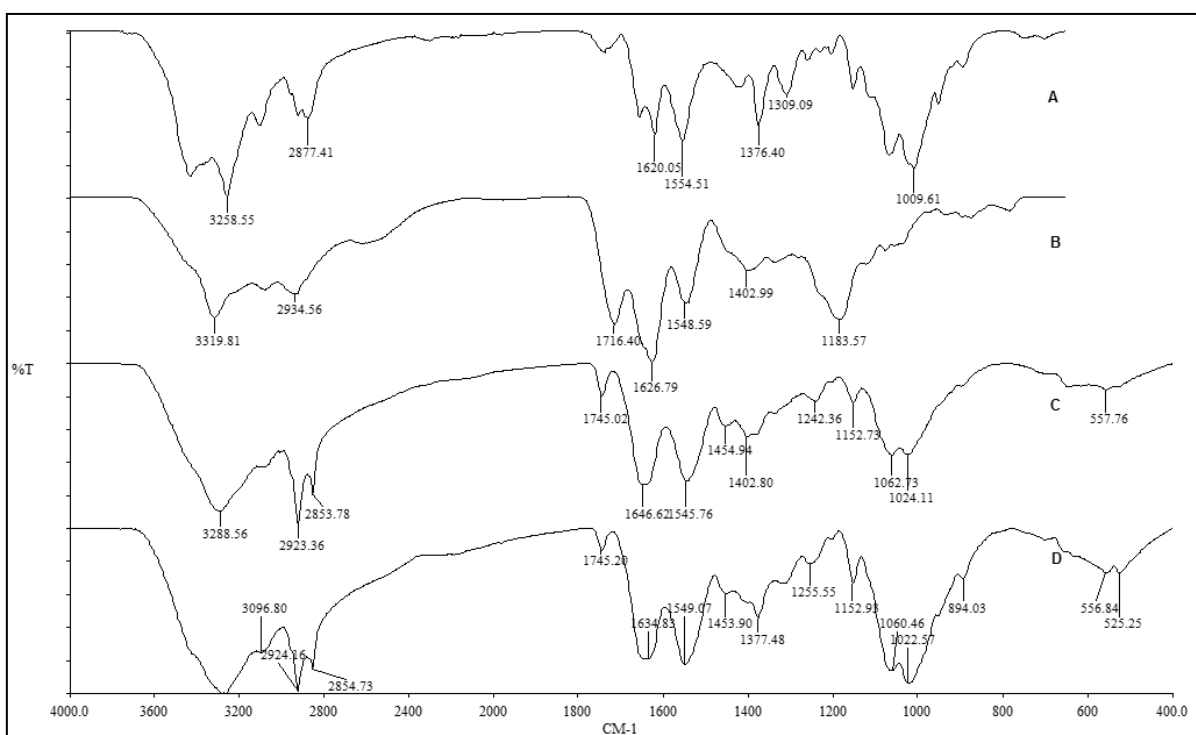


Figura 32. Espectro de infrarrojo ATR-FTIR obtenido de las películas de: A) quitosano biológico-químico, B) colágena porcina tipo I, C) películas de quitosano-co-cítrico cubiertas de colágena porcina tipo I y D) películas de quitosano-co-cítrico cubiertas de colágena porcina tipo I lavadas con agua destilada hasta pH neutro.

9.7.3 Prueba de hinchamiento de las películas de quitosano-co-cítrico y quitosano-co-cítrico cubiertas con colágena porcina tipo I.

La prueba de hinchamiento se realizó para determinar la capacidad de absorción de en DMEM de los materiales en el tiempo, a 37°C para simular condiciones fisiológicas. En la figura 33 se observa el comportamiento mostrado por los andamios obtenidos con quitosano biológico-químico y comercial. El material obtenido con quitosano biológico-químico presenta su saturación al primer día de estudio, mientras que el producido con el quitosano comercial hasta los 14 días presenta su máximo.

Las películas de quitosano-co-cítrico con quitosano biológico-químico presentan un hinchamiento en el equilibrio de $91.78 \pm 15.97\%$, mientras que los sintetizados con quitosano comercial su hinchamiento al día 14 fue de $168.27 \pm 9.52\%$, cabe mencionar que éstas últimas películas no llegaron al equilibrio durante los días de estudio. Al realizar la comparación de medias mediante la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$) se observó que hay diferencia significativa entre los quitosanos utilizados, es decir que hay efecto del quitosano empleado en la elaboración de las películas sobre el hinchamiento que presentan los materiales a lo largo del tiempo, siendo el quitosano comercial el que presenta una media mayor.

Por otro lado también se realizó esta prueba a las películas de quitosano-co-cítrico cubiertas con colágena porcina tipo I, los resultados se muestran en la figura 34. Las películas con quitosano comercial mostraron su máximo hinchamiento a los 5 días, mientras que las sintetizadas con quitosano biológico muestran se saturaron hasta los 14 días.

Las películas de quitosano-co-cítrico-colágena con quitosano biológico-químico presentan un hinchamiento a los 14 días de $200.53 \pm 44.66\%$, mientras que los sintetizados con quitosano comercial su hinchamiento al mismo día de estudio fue de $226.46 \pm 22.13\%$, cabe mencionar que las películas no llegaron al equilibrio durante los días de estudio. Al realizar la comparación de medias mediante la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$) se observó que no hay diferencia significativa entre los quitosanos utilizados, es decir que no hay efecto del quitosano empleado en la elaboración de las películas sobre el hinchamiento que presentan los materiales a lo largo del tiempo.

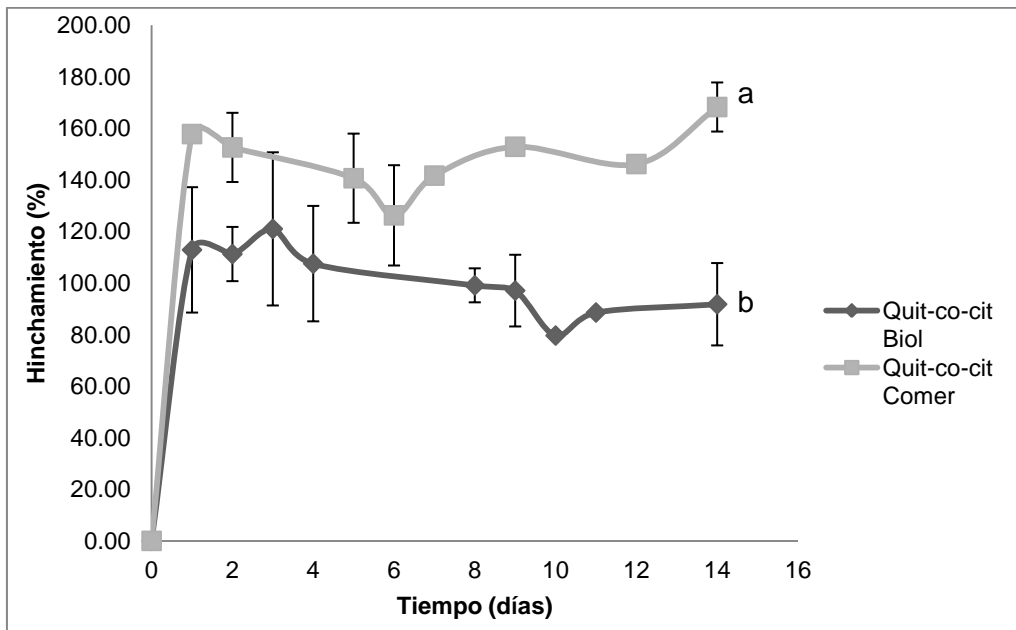


Figura 33. Cambio en la capacidad de hinchamiento de los andamios obtenidos a partir de quitosano biológico-químico (Biol-quím) y comercial, mediante la formación de películas de quitosano-co-cítrico. Letras diferentes presentan diferencia significativa ($\alpha \leq 0.05$) con la prueba de Tukey.

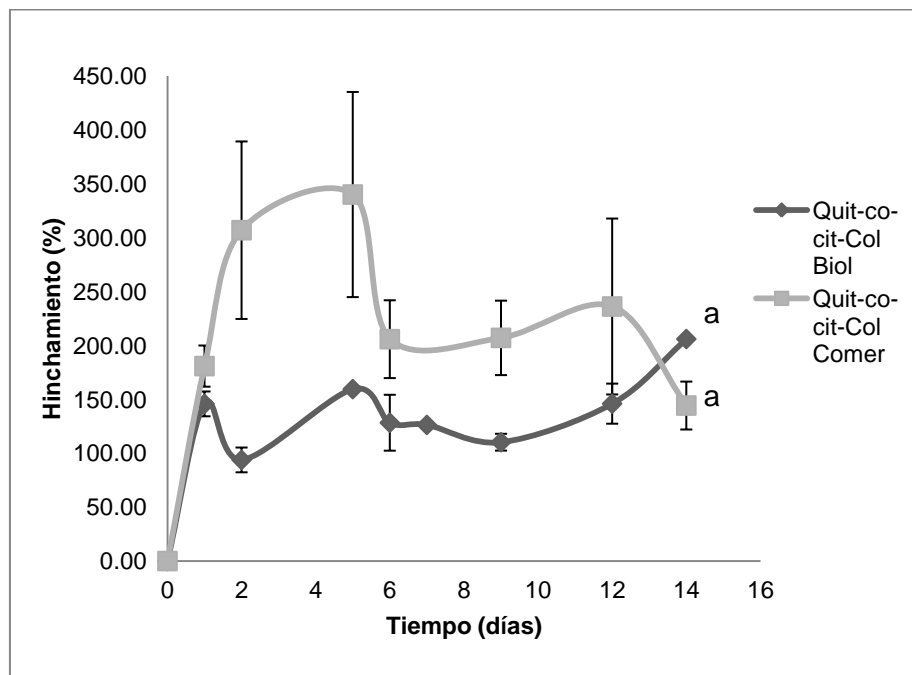


Figura 34. Capacidad de hinchamiento de los andamios obtenidos a partir de quitosano biológico-químico (Biol-quím) y comercial, de películas de quitosano-co-cítrico cubiertas con colágena porcina tipo I. Letras diferentes presentan diferencia significativa ($\alpha \leq 0.05$) con la prueba de Tukey.

Al realizar el análisis estadístico del porcentaje de hinchamiento a los 14 días de estudio que presentan las películas de quitosano-co-cítrico con las que se les añadió esta proteína, se encontró que hay diferencia significativa sobre el hinchamiento presentado por las películas debido al tratamiento y quitosano utilizado en su síntesis. Siendo los materiales: quitosano-co-cítrico con quitosano comercial y quitosano-co-cítrico con colágena con cualquiera de los dos quitosanos los que presentaron mayor hinchamiento.

Tabla 15. Capacidad de hinchamiento de las películas de quitosano-co-cítrico y quitosano-co-cítrico cubierto con colágena porcina tipo I, utilizando dos quitosanos diferentes. Letras diferentes presentan diferencia significativa ($\alpha \leq 0.05$) con la prueba de Tukey.

Tratamiento, quitosano utilizado	Hinchamiento a los 14 días de estudio (%)
Quitosano-co-cítrico, quitosano biológico.	91.78±15.97 ^a
Quitosano-co-cítrico, quitosano comercial.	271.25±33.41 ^b
Quitosano-co-cítrico-Colágena, quitosano biológico.	200.53±44.66 ^b
Quitosano-co-cítrico-Colágena, quitosano comercial.	226.46±22.13 ^b

9.7.4 Prueba de erosión de las películas de quitosano-co-cítrico y quitosano-co-cítrico cubiertas con colágena porcina tipo I.

Se realizó la prueba de erosión para determinar el grado la degradación que presentan los materiales a lo largo del tiempo en DMEM a 37°C, para simular condiciones fisiológicas. En la figura 35 se muestra el comportamiento de las películas de quitosano-co-cítrico con quitosano biológico-químico y comercial. En dicha figura se observa que los materiales realizados con quitosano comercial presentan mayor erosión desde el segundo día de análisis en comparación con los realizados con el quitosano biológico-químico.

Los materiales elaborados mediante películas de quitosano-co-cítrico con quitosano comercial presentan una erosión del 30.35±5.70% al día 15 de estudio, mientras que los de quitosano biológico-químico fue de 18.77±1.74%. Dichos resultados no presentan diferencia significativa (prueba Tukey, $\alpha \leq 0.05$), es decir que no hay efecto del quitosano utilizado sobre

la erosión que presentan los andamios en el día quince de análisis, por lo que se puede utilizar cualquiera de los quitosanos.

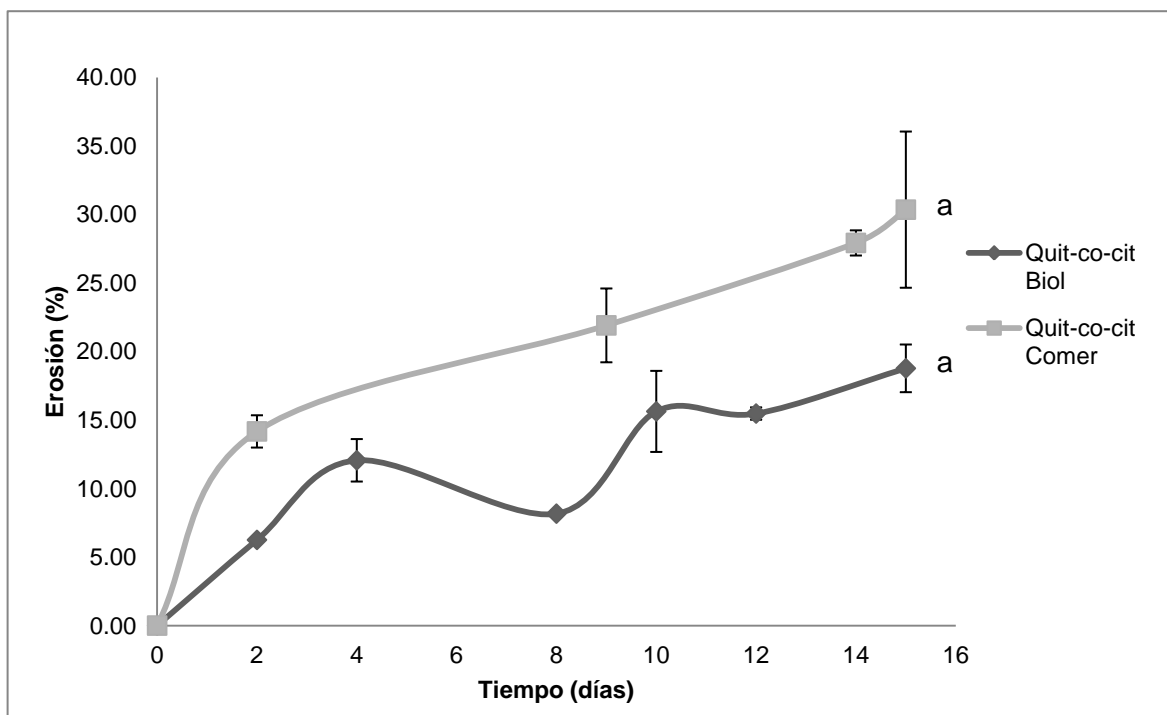


Figura 35. Cambio en la erosión de los andamios obtenidos a partir de quitosano biológico-químico (Biol-quím) y comercial, mediante la formación de películas de quitosano-co-cítrico. Letras diferentes presentan diferencia significativa ($\alpha \leq 0.05$) con la prueba de Tukey.

La prueba de erosión de las películas de quitosano-co-cítrico cubiertas con colágena porcina tipo I, utilizando quitosanos diferentes se muestra en la figura 36, donde se observa que los materiales sintetizados a partir de quitosano comercial presentan mayor erosión desde el segundo día de estudio que aquellos obtenidos con quitosano biológico-químico. Los materiales elaborados mediante películas de quitosano-co-cítrico-colágena con quitosano comercial presentan una erosión del $30.87 \pm 4.18\%$ al día 15 de estudio, mientras que los de quitosano biológico-químico fue de $17.37 \pm 0.18\%$. Dichos resultados no presentan diferencia significativa (prueba Tukey, $\alpha \leq 0.05$), es decir que no hay efecto del quitosano utilizado sobre la erosión que presentan los andamios en el día quince de análisis, por lo que se puede utilizar cualquiera de los quitosanos.

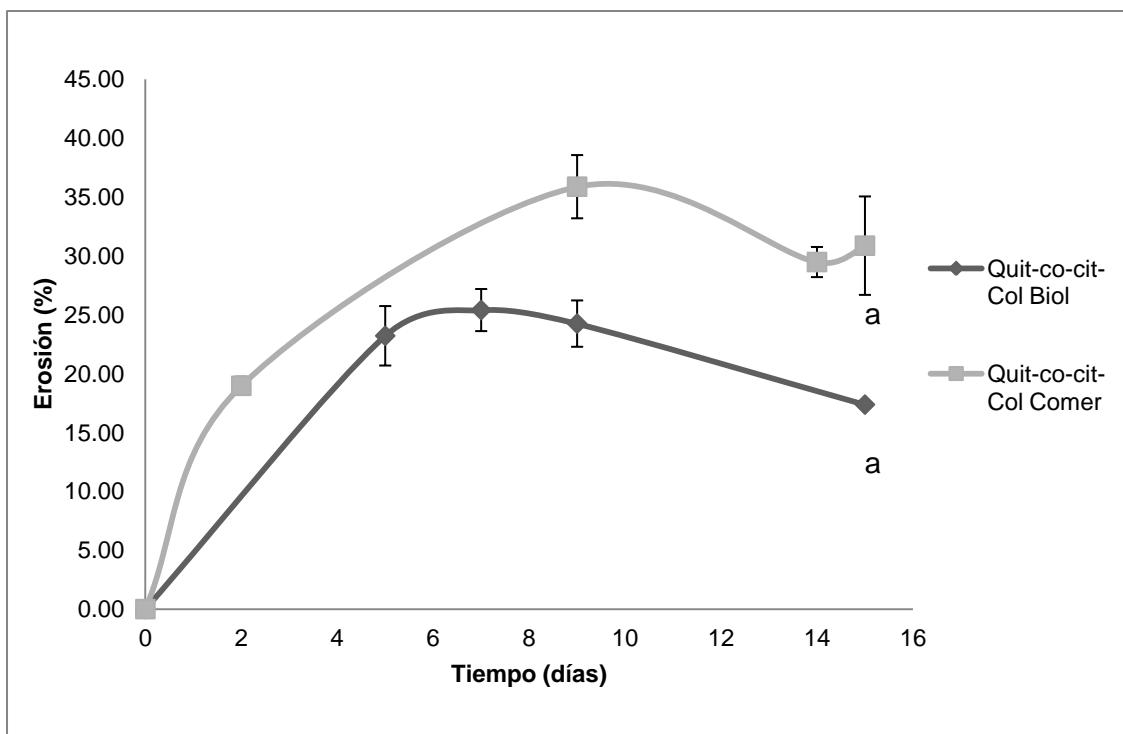


Figura 36. Cambio en la erosión de los andamios obtenidos a partir de quitosano biológico-químico (Biol-quím) y comercial, mediante la formación de películas de quitosano-co-cítrico cubiertas con colágena porcina tipo I. Letras diferentes presentan diferencia significativa ($\alpha \leq 0.05$) con la prueba de Tukey.

Al realizar el análisis estadístico del porcentaje de erosión presentado a los 15 días de estudio por las películas de quitosano-co-cítrico y las que se les añadió esta proteína, se encontró que no hay diferencia significativa sobre la erosión de las películas debido al tratamiento y quitosano utilizado en su síntesis.

9.7.5 Prueba antimicrobiana de las películas de quitosano, quitosano-co-cítrico y quitosano-co-cítrico cubiertas de colágena porcina tipo I.

Se ha encontrado que el quitosano en condiciones ácidas ($\text{pH} \leq 6$) actúa como agente antimicrobiano, ya que los grupo amino se protonan, quedando con carga positiva (Rabea *et al*, 2003); esto permite la interacción entre la carga positiva del grupo amino y las cargas negativas de la pared celular microbiana, lo cual afecta la permeabilidad de ésta última y permite la pérdida de constituyentes intracelulares (Shahidi *et al*, 1999). Es por ello que se realizó una prueba de inhibición bacteriana, para averiguar si las películas sintetizadas

además de tener un posible uso como andamio podían proveer de actividad antibacteriana. Se utilizó la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ya que es una de las principales bacterias causantes de infecciones en hospitales. Los resultados se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Porcentaje de inhibición en medio de cultivo caldo soya tripticaseína de *Pseudomonas aeruginosa* presente a diferentes horas de incubación con los materiales sintetizados, siendo Biol los materiales a base de quitosano biológico-químico y Com los de quitosano comercial. Letras diferentes entre columnas presentan diferencia significativa ($\alpha \leq 0.05$) con la prueba de Tukey.

Tratamiento	Inhibición del crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> (%)			
	Tiempo (h)			
	6	12	18	24
Quitosano (Biol).	65.33±18.09 ^a	21.25 ^a	22.46±21.20 ^a	31.81±0.30 ^a
Quitosano (Com).	59.22±4.64 ^a	57.07 ^a	10.60 ^{a,b}	25.93±2.94 ^a
Quitosano-co-cítrico (Biol).	54.91±12.94 ^a	62.37±5.90 ^a	31.72±5.61 ^{a,b}	41.60±1.25 ^b
Quitosano-co-cítrico (Com).	44.56±5.49 ^a	38.12±20.56 ^a	54.31±21.34 ^{a,b}	43.23±1.05 ^b
Quitosano-co-cítrico-Colágena (Biol).	55.89±7.13 ^a	59.54±12.15 ^a	74.26±11.41 ^b	86.46±1.58 ^c
Quitosano-co-cítrico-Colágena (Com).	34.12±29.08 ^a	59.77±12.47 ^a	78.04±10.92 ^b	70.15±1.22 ^d

En la tabla 16 se observa la inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* que presentan los materiales a diferentes horas de incubación de la bacteria. A las 6 y 12 horas de incubación no hay diferencia significativa entre los materiales. A las 18 y 24 horas de incubación se encontró diferencia significativa en la inhibición bacteriana, siendo los materiales de quitosano-co-cítrico cubierto con colágena porcina tipo I sintetizado con quitosano biológico-químico y comercial los que presentan mayor de inhibición del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*.

Con base en el comportamiento mostrado por los materiales se puede concluir que a las 6 horas de incubación todos los materiales presentan un efecto antimicrobiano igual. Tal efecto se ve disminuido en la fase logarítmica de la bacteria, pero se ve incrementado en la fase estacionaria de la misma siendo las películas de quitosano-co-cítrico cubiertas con colágena sintetizadas a partir de quitosano biológico-químico a las 24 horas de incubación las que

tienen mayor inhibición de bacterias, esto se puede deber a que el quitosano biológico-químico presenta mayor peso molecular y por lo tanto tiene cadenas más largas de polímero con mayor cantidad de grupo amino libres para protonarse, lo cual confiere mayor actividad antimicrobiana (Hu, 2004; Altiok, 2010).

Este efecto puede deberse a que, conforme la bacteria va creciendo, consume los nutrientes del medio y éste se va acidificando ligeramente lo cual provoca la protonación de los grupos amino libres del quitosano, los cuales son capaces de interactuar con las cargas negativas de la membrana celular microbiana, produciendo cambios en la permeabilidad del agua vinculante y trazas de metales (Devlieghere *et al*, 2004). Por otro lado, en los materiales que contienen ácido cítrico su actividad antimicrobiana se puede explicar por un ligero cambio en el pH en el medio de cultivo, debido a la liberación de protones H^+ al medio por el ácido cítrico que no haya reaccionado y que no se haya perdido durante la purificación y los grupos carboxilos con H disponibles para liberar al medio. Esto ocasiona la alteración en el pH del caldo soya tripticaseína (pH inicial de 7.3) lo cual interfiere en la proliferación de la bacteria.

Existen reportes en la literatura del poder antimicrobiano del ácido cítrico (Nielsen, 2006; Arias-Moliz, 2008), aunque el mecanismo de acción no se encuentra del todo dilucidado ya que depende del microorganismo en cuestión, sin embargo existen las siguientes hipótesis:

1. Disminución del pH, provocando acidificación intracelular (Nielsen, 2006).
2. Estrés osmótico (Nielsen, 2006).
3. Quelante de metales divalentes, resultando en inhibición de enzimas o alteración del metabolismo (Brul and Coote, 1999; Stratford, 1999; Arias-Moliz, 2008).
4. Alteración en la producción de algún producto, ejemplo: aumento en la producción de glicerol en la fermentación con *S. cerevisiae* (Omori *et al*, 1995; Lawrence *et al*, 2004).

9.7.6 Viabilidad celular con método de calceína AM de las películas de quitosano, quitosano-co-cítrico y quitosano-co-cítrico cubiertas de colágena porcina tipo I.

Se realizó un análisis de fluorescencia para los materiales sembrados con fibroblastos a los 2, 7 y 10 días para observar la viabilidad de las células en las películas de quitosano, quitosano-co-cítrico y quitosano-co-cítrico cubierto con colágena porcina tipo I, todos sintetizados con quitosano biológico-químico y comercial. Las micrografías correspondientes se muestran en las figuras 37, 38 y 39, cabe mencionar que en este caso no se realizó la

cuenta de células, debido a la presencia de cúmulos de células los cuales harían el conteo y la comparación no significativa, por lo que solo se hizo un análisis cualitativo basado en la diferenciación de los fibroblastos sobre el material en estudio.

En la figura 37 se muestran las micrografías obtenidas a partir de las películas de quitosano biológico-químico y comercial. En dicha figura se observa que los fibroblastos inoculados en las películas de quitosano biológico químico a los dos días (fig. 37a) presentan formación de cúmulos de células vivas (verdes) pero sin elongarse, por otro lado en el caso del quitosano comercial los fibroblastos se encuentran viables, formando de igual forma cúmulos de células y algunas ya están en su forma alargada (fig 37d). A los 7 y 10 días de incubación en el quitosano biológico los fibroblastos siguen en su forma esférica (fig 37 b y c). Para el caso del quitosano comercial a los 7 y 10 días de incubación las células siguen formando cúmulos y hay pocas con morfología elongada. En el caso del quitosano biológico-químico se muestra la proliferación de fibroblastos, acorde a lo reportado por Yao *et al* (2003); para el quitosano comercial de igual forma se observa la proliferación de fibroblastos así como su adhesión y morfología alargada.

En la figura 38 se muestran las micrografías de los fibroblastos inoculados en películas de quitosano-co-cítrico sintetizadas a partir de dos diferentes quitosanos. En la figura 38a, b y c se muestra el caso de los materiales a base de quitosano biológico-químico, en estas películas los fibroblastos mostraron proliferación y viabilidad pero no elongación en ninguno de los días de estudio. Mientras que las películas de quitosano-co-cítrico a base de quitosano comercial mostraron desde el día 2 la proliferación, viabilidad y elongación de los fibroblastos. Con los dos materiales se observaron células muertas (fig. 38 d, e y f).

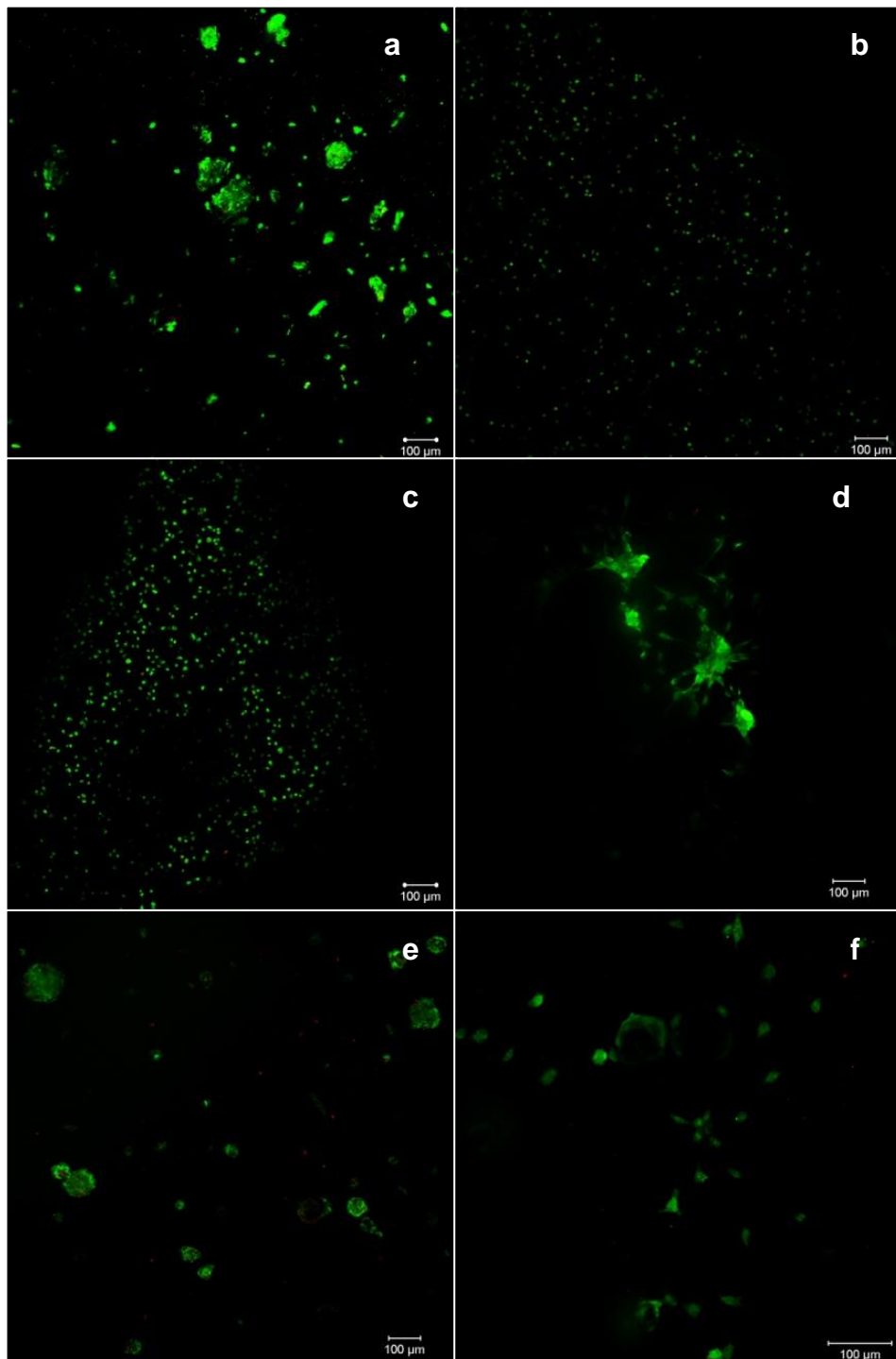


Figura 37. Micrografías de fibroblastos humanos inoculados en películas de quitosano, teñidos mediante el método de calceína-AM. Donde a, b y c corresponden a los materiales con quitosano biológico-químico y d, e y f a los de quitosano comercial. Los días de incubación son: a, d 2 días; b, e 7 días y c, f 10 días. Las micrografías se muestran con un aumento de 10x.

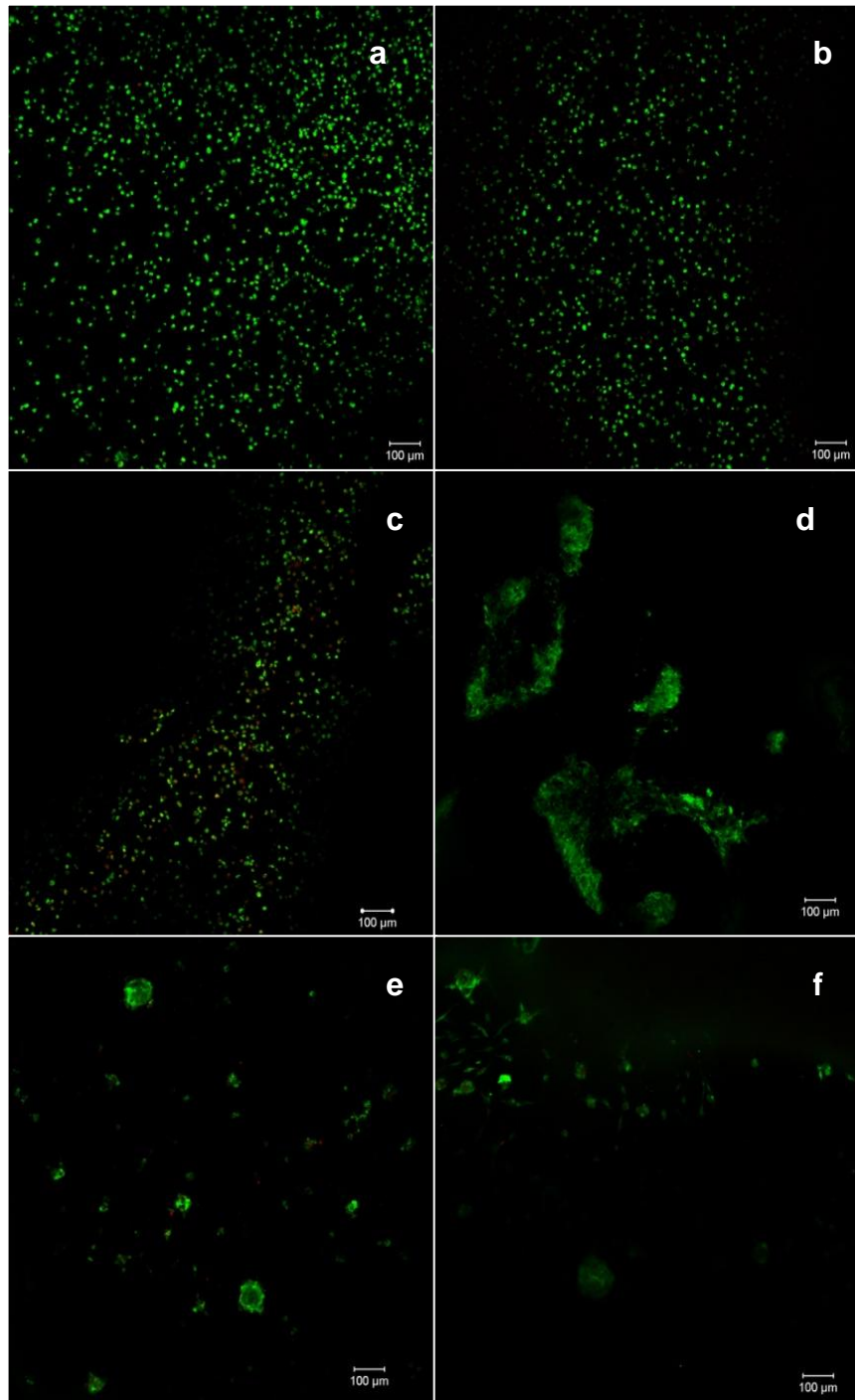


Figura 38. Micrografías de fibroblastos humanos inoculados en películas de quitosano-co-cítrico, teñidos mediante el método de calceína-AM. Donde a, b y c corresponden a los materiales con quitosano biológico-químico y d, e y f a los de quitosano comercial. Los días de incubación son: a, d 2 días; b, e 7 días y c, f 10 días. Las micrografías se muestran con un aumento de 10x.

En la figura 39 se muestran las micrografías de las películas de quitosano-co-cítrico cubiertas con colágena porcina tipo I. En las figuras 39 a, b y c correspondientes a los materiales a base de quitosano biológico-químico se observan que los fibroblastos muestran viabilidad y proliferación así como una morfología esférica durante los 10 días del ensayo. Las películas a base de quitosano comercial de igual forma presentan proliferación y viabilidad pero la morfología de los fibroblastos es alargada desde el segundo día de estudio, poblando para el día 10 la gran mayoría de la superficie del material con células alargadas.

La presencia de células alargadas en los materiales con quitosano comercial se puede explicar con base en el peso molecular del quitosano, ya que, acorde con Minagawa (2006), a menor peso molecular del polímero éste puede ser degradado con mayor facilidad, produciendo oligómeros los cuales se ha reportado que aumentan la actividad celular. Por otro lado, Chatelet (2001) menciona que a menor grado de acetilación mayor la adhesión y proliferación de fibroblastos, los resultados obtenidos fueron diferentes a lo reportado por dicho autor ya que a mayor grado de acetilación los fibroblastos presentaron adhesión, proliferación y morfología alargada (quitosano comercial: 16.24% y biológico-químico: 5.09%). Finalmente se obtuvieron mejores resultados en la proliferación de fibroblastos humanos in vitro que lo reportado por Mori (1997), quien dice que in vitro el quitosano no muestra casi ningún efecto en los fibroblastos, igual que Shahabeddin (1991) quien menciona que el quitosano no puede ser considerado un material factible para el cultivo de fibroblastos in vitro.

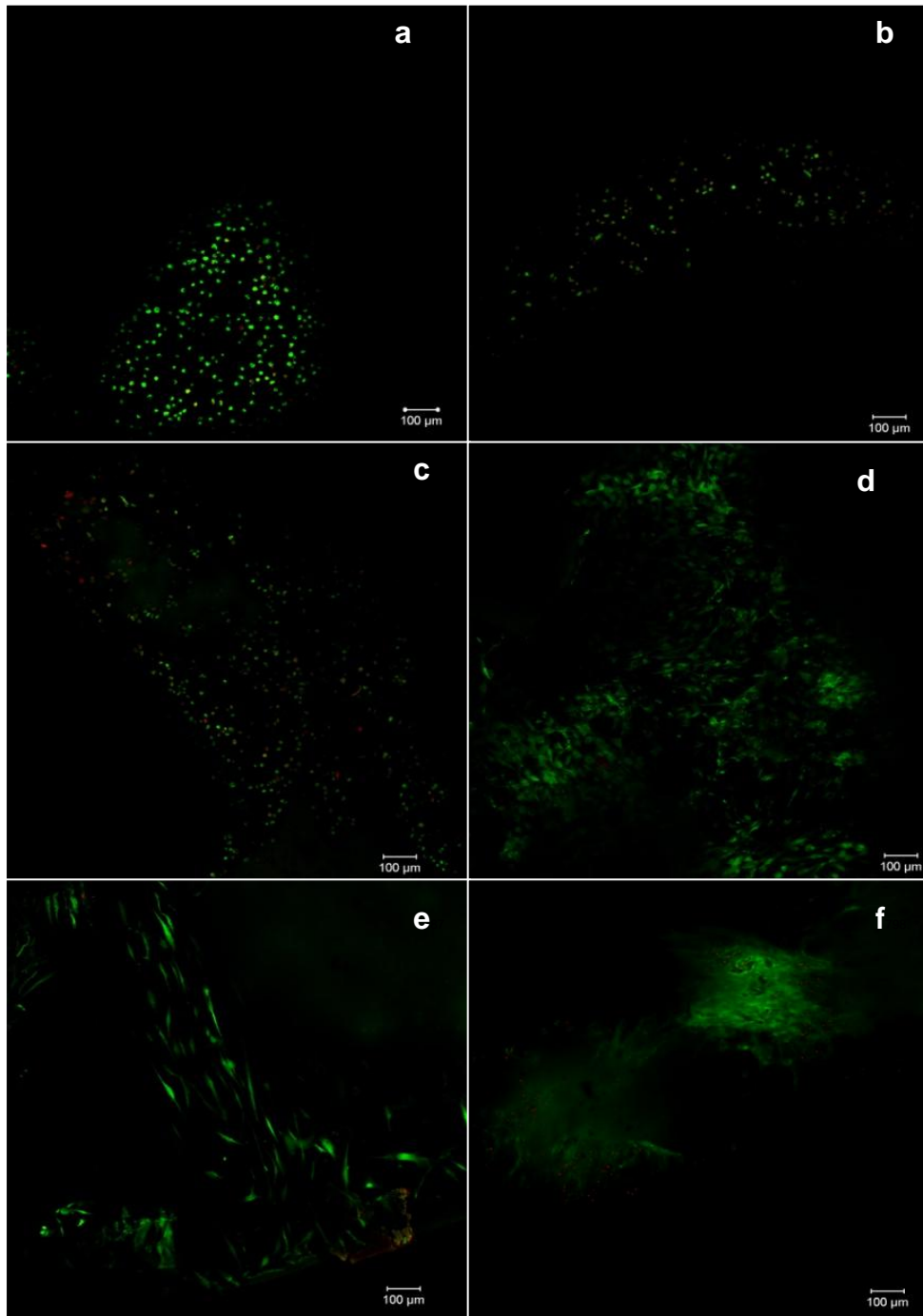


Figura 39. Micrografías de fibroblastos humanos inoculados en películas de quitosano-co-cítrico cubiertas con colágena porcina tipo I, teñidos mediante el método de calceína-AM. Donde a, b y c corresponden a los materiales con quitosano biológico-químico y d, e y f a los de quitosano comercial. Los días de incubación son: a, d 2 días; b, e 7 días y c, f 10 días. Las micrografías se muestran con un aumento de 10x.

10 CONCLUSIONES

Se obtuvieron y caracterizaron quitosano y colágena, el primero, a partir de desechos de camarón mediante un proceso biológico-químico, la segunda, a partir de patas de cerdo se caracterizó como colágena tipo I; ambos presentaron las propiedades necesarias para ser utilizado en la preparación de andamios celulares con fines biomédicos. Se produjeron dos tipos de andamios porosos mezclando los materiales antes mencionados y mediante dos métodos distintos: iniciación térmica de la formación de cadenas de colágena y entrecruzamiento con glutaraldehído del quitosano con el colágena.

Las esponjas de quitosano biológico-químico con colágena, entrecruzados con glutaraldehído, presentaron mayor capacidad de absorción de medio de cultivo. Los materiales que presentaron menor erosión fueron los entrecruzados con glutaraldehído, tanto de quitosano comercial como biológico así como el iniciado térmicamente con quitosano comercial.

El único material en el que se presentó crecimiento y diferenciación de los fibroblastos en cultivo primario fue el iniciado térmicamente con quitosano comercial, mientras que en los demás solo proliferación sin alargamiento de los fibroblastos. Las esponjas de quitosano comercial con colágena porcina producidas por iniciación térmica no tuvieron la mayor capacidad de absorción de medio sin embargo, se observó viabilidad y elongación de fibroblastos humanos.

Por otro lado se sintetizaron materiales con base en quitosano y colágena en forma de películas, de éstas las que presentaron una mayor capacidad de hinchamiento fueron las de quitosano-co-cítrico con quitosano comercial así como las de quitosano-co-cítrico cubierto de colágena con quitosano comercial y biológico. La erosión de las películas no fue diferente significativa entre ellas. Las películas de quitosano-co-cítrico con y sin recubrir con colágena y sintetizadas con quitosano biológico presentaron mayor actividad bacteriostática, seguidas por las sintetizadas con quitosano comercial a las 6h de estudio. A las 24 h, la mayor actividad antimicrobiana fue de las películas de quitosano-co-cítrico-colágena con quitosano biológico, seguido de este mismo tratamiento con quitosano comercial y quitosano-co-cítrico con quitosano biológico y comercial. Las películas de quitosano-co-cítrico con y sin recubrimiento de colágena con base en quitosano biológico solo presentaron proliferación y

morfología esférica de los fibroblastos, mientras que estos mismos tratamientos con quitosano comercial presentaron la proliferación y elongación de las células.

Se requiere un estudio más profundo sobre las diferencias estructurales de los quitosanos biológico-químico y comercial para comprender el comportamiento de los fibroblastos humanos en estos materiales. En virtud de que los quitosanos presentaron diferencias significativas en la cristalinidad y grado de acetilación, ya que el polímero obtenido parcialmente por biotecnología conservó una alta la cristalinidad y bajo grado de acetilación mientras que el comercial es amorfo y con mayor cantidad de grupos acetilo.

11 BIBLIOGRAFÍA

- Adekogbe I, Ghanem A. (2005). "Fabrication and characterization of DTBP crosslinked chitosan scaffolds for skin tissue engineering". Biomaterials **26**: 7241-50.
- Agrawal, C. y Ray, R. (2001). "Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering". Journal of Biomedical Materials Research **55**: 141-150.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2004). Molecular Biology of the cell. United States of America, Ed. Garland Science.
- Alonso, D., Gimeno, M., Olayo, R., Vázquez-Torres, H., Sepúlveda-Sánchez, J., Shirai, K. (2009). "Cross-linking chitosan into UV-irradiated cellulose fibers for the preparation of antimicrobial-finished textiles." Carbohydrate Polymers **77**: 536-543.
- Altioik, D., Altioik, E., Tihminlioglu, F., (2010). "Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications". Journal Materials Science: Materials Medicine. **21**: 2227-2236.
- Andres, Y., Giraud, L., Gerente, C., Le Cloirec, P. (2007). "Antibacterial effects of chitosan powder: Mechanisms of action". Environmental Technology. **28:12**, 1357-1363.
- Anónimo. Secretaría de Agricultura y Pesca (SAGARPA). (2009). Anuario Estadístico de Acuicultura y pesca. México. Conapesca.
- Anónimo. Secretaría de Salud. (2009). Vigilancia epidemiológica de las quemaduras. No. 25 Vol. 26
- AOAC. (1990). Official methods of analysis, 13th edition. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.
- Aparna Sarasam, Sundararajan V. Madihally. (2005). "Characterization of chitosan-polycaprolactone blends for tissue engineering applications". Biomaterials **26**: 5500-5508
- Arias-Moliz, M., Ferrer, C., Espigares, E., Liébana, J., Espigares, M. (2008). "Bactericidal activity of phosphoric acid, citric acid, and EDTA solutions against *Enterococcus faecalis*." OOOOE. University of Granda. **106(2)**: 84-89.

- Arpornmaeklong P., Suwatwirote N., Pripatnanont P., Oungbho K. (2007). "Growth and differentiation of mouse osteoblasts on chitosan–collagen sponges". International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. **36**: 328–337.
- Brul, S., Coote, P. (1999). "Preservative agents in foods—mode of action and microbial resistance mechanisms." Food Microbiology. **50**: 1-17.
- Campos, B., Mello, M. (2011). "Collagen type I amide I band infrared spectroscopy". Micron. **42**: 283-289.
- Cardea, S., Pisanti, P., Reverchon, E. (2010). "Generation of chitosan nanoporous structures for tissue engineering applications using a supercritical fluid assisted process". Journal of Supercritical Fluids **54**:290-295.
- Chatelet, C., Damour, O., Domard, A. (2001). "influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films." Biomaterials **22**: 261-268.
- Cira L., Huerta S., Hall G and Shirai K. (2002). "Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery". Process Biochemistry **37**:1359-1366.
- Ding, Z., Chen, J., Gao, S., Chang, J., & Zhang, J. (2004). Immobilization of chitosan onto poly-L-lactic acid film surface by plasma graft polymerization to control the morphology of fibroblast and liver cells. Biomaterials, *25*, 1059–1067.
- Duarte, M., Ferreira, M., Marvao, M., Rocha, J. (2002). "An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy". Int. Journal of Biological Macromolecules. **31**: 1-8.
- Eun Song, So Yeon Kim, Taehoon Chun, Hyun-Jung Byun, Young Moo Lee. (2006). "Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility". Biomaterials **27**: 2951-2961.
- Focher, B., Beltrame, P., Naggi, A., Torri, G. (1990). "Alkaline N-Deacetylation of chitin enhanced by flash treatments. Reaction kinetics and structure modifications". Carbohydrate polymers. **12**: 405-418.
- Frank G. Lyons, Amir A. Al-Munajjed, Stephen M. Kieran, Mary E. Toner, Ciara M. Murphy, Garry P. Duffy, Fergal J. O'Brien. (2010). "The healing of bony defects by cell-free collagen-based scaffolds compared to stem cell-seeded tissue engineered constructs". Biomaterials **31**

- Gobierno Federal, Salud. (2011). "Inicia operaciones el Centro Nacional de Investigación y Atención a Quemados". México Sano **4** (21): 3. Tomado de: http://portal.salud.gob.mx/sites/salud/descargas/pdf/period_mexsano/mexicosano21_11.pdf
- Gomes ME, Godinho JS, Tchalamov D, Cunha AM, Reis RL.(2002). "Alternative tissue engineering scaffolds based on starch: processing methodologies, morphology, degradation and mechanical properties". Mater Sci Eng C **20**:19–26.
- Goosen, M. (1997). Applications of chitin and chitosan. United States of America, Ed. Technomic.
- He Qifen, Yannan Zhao, Bing Chen, Zhifeng Xiao, Jing Zhang, Lei Chen, Wei Chen, Feilong Deng, Jianwu Dai. (2011). "Improved cellularization and angiogenesis using collagen scaffolds chemically conjugated with vascular endothelial growth factor". Acta Biomaterialia **7**: 1084-1093.
- Hirai, A., Odain, H., Nakajima, A. (1991). Polymer Boletin: 26, 87.
- Hirano, S. (1999). "Chitin and chitosan as novel biotechnological materials." Polymer International.
- Hu, S., Jou, C., Yang, M. (2004). "Biocompatibility and antibacterial activity of chitosan and collagen immobilized poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid). Carbohydrate polymers. **58**: 173-179.
- Ignatius A, Blessing H, Liedert A, Schmidt C, Neidlinger-Wilke C, Kaspar D, et al. (2005). "Tissue engineering of bone: effects of mechanical strain on osteoblastic cells in type I collagen matrices". Biomaterials **26**:311–8.
- In-Yong Kim, Seog-Jin Seo, Hyun-Seuk Moon, Mi-Kyong Yoo, In-Young Park, Bom-Chol Kim, Chong-Su Cho. (2008). "Research review paper: Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications". Biotechnology Advances **26**: 1–21
- Juárez, C. (2011). "Estudio del uso de enzimas comerciales en la preparación de quitina a partir de desperdicios de camarón". Tesis de especialidad en biotecnología. Universidad Autónoma de México – Iztapalapa.
- Kumar, M., Muzzarelli, R., Muzzarelli, C., Sashiwa, H. and Domb, A. (2004). "Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives". Chemical Review. **104**: 6017-6084

- Langer, R y Vacanti, J. (19993). "Tissue engineering". Science **260**: 920-927.
- Lamarque, G., Cretenet, M., Viton, C., Domard, A. (2005). "New route of deacetylation of alfa- and beta- chitins by means of freeze pump out thae cycles." Biomacromolecules **6**: 1380-1388.
- Larsen, J., Staerk, D., Cornett, C., Hansen, S., Jaroszewski, J. (2008). "Identification of reaction products between drug substances and excipients by HPLC–SPE–NMR: Ester and amide formation between citric acid and 5-aminosalicylic acid." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **49**: 839-842.
- Lazarev, Y., Grishkovsky, B., Khromova, T. (1985). "Amide I band of IR spectrum and structure of collagen and realted polypeptides". Biopolymers. **24**: 1449-1478.
- Leach JB, Schmidt CE. (2005). "Characterization of protein release from photocrosslinkable hyaluronic acid–polyethylene glycol hydrogel tissue engineering scaffolds". Biomaterials **26**:125–235.
- Li X, Jin L, Balian G, Laurencin CT, Greg Anderson D. (2006). "Demineralized bone matrix gelatin as scaffold for osteochondral tissue engineering". Biomaterials **27**:2426–33.
- Li Z, Ramay HR, Hauch KD, Xiao D, Zhang M. (2005). "Chitosan–alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering". Biomaterials **26**:3919–28.
- Liu, C., Xia, Z. y Czernuszka, J. (2007). "Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering". Chemical Engineering Research and Design **85**: 1051-1064.
- Liu, W. y Cao, Y. (2011). Tissue engineering and stem cell therapy. Cap. 5.28. Tissue – Engineering technology for tissue repair and regeneration. 353-375.
- Llames, S., García, E., García, V., Del Río, M., Larchar, F., Jorcano, J. Meana, A. (2006). Clinical results of an autologous engineered skin. *Cell and Tissue Banking*, **7**, 47-53.
- Ma L, Gao C, Mao Z, Zhou J, Shen J, Hu X, et al. (2003). "Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering". Biomaterials **24**:4833–41.
- Madihally, Howard W.T. Matthew, Sundararajan V. (1999). "Porous chitosan scaffolds for tissue engineering". Biomaterials **20**: 1133-1142.

- Mao, S., Augsten, C., Mäder, K., & Kissel, T. (2007). Characterization of chitosan and its derivatives using asymmetrical flow field-flow-fractionation: A comparison with traditional methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, *45*, 736-741
- Marilia M. Horn, Virginia C. Amaro Martins, Ana Maria de Guzzi Plepis. (2009). "Interaction of anionic collagen with chitosan: Effect on thermal and morphological characteristics". *Carbohydrate Polymers* *77*: 239-243.
- Minagawa, T., Okamura, Y., Shigemasa, Y., Minami, S., Okamoto, Y. (2007). "Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing". *Carbohydrate polymers*. **67**: 640-644.
- Moore, S. (1990). "Cell size specific binding of the fluorescent dye calcofluor to budding yeast". *Biochimica et Biophysica Acta*. **1035**: 206-213.
- Mori, T., Okumura, M., Matsuura, M, *et al.* (1997). "Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblast in vitro". *Biomaterials*. **18**: 947-951.
- Nielsen, M., Arneborg, N. (2006). "The effect of citric acid and pH on growth and metabolism of anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* cultures." *Food Microbiology* **24**: 101-105.
- Omori, T., Ogawa, K., Shimoda, M. (1995). "Effect of citric acid on glycerol formation by *Saccharomyces cerevisiae* in barley Shochu mash." *Seibutsu-kogaku* **73**: 89-95.
- Pacheco, N., Garnica-Gonzalez, M., Gimeno, M., Barzana, E., Trombotto, S., David, L., & Shirai, K. (2011). Structural Characterization of Chitin and Chitosan Obtained by Biological and Chemical Methods. *Biomacromolecules*, *12*, 3285–3290.
- Pacheco, N., Larralde-Corona, C., Sepulveda, J., Trombotto, S., Domard, A., Shirai, K. (2008). "Evaluation of chitosans and *Pichia guillermondii* as growth inhibitors of *Penicillium digitatum*." *International Journal of Biological Macromolecules*. **43**(20-26).
- Park, S., Chinnan, M., Shewfelt, R. (1994). "Edible coating effects on storage life and quality of tomatoes." *Journal of Food Science*. **59**(3): 568-570.
- Parenteau-Bareil, R., Gauvin, R., Cliche, S., Gariépy, C., Germain, L., Berthod, F. (2011). "Comparative study of bovine, porcine and avian collagens for the production of a tissue engineered dermis". *Acta Biomaterialia*. **7**: 3757-3765.

- Plascencia, M., Viniegra, G., Olayo, R., & Castillo, M. (2003). Effect of Chitosan and Temperature on Spore Germination of *Aspergillus niger*. *Macromol. Biosci.*, 3, 582–586.
- Rabea, E., Badawy, M., Stevens, C., Smagghe, G., Steurbaut, W. (2003). "Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action." *Biomacromolecules* 4(6): 1457-1465.
- Rabkin, E. y Schoen, F. (2002). "Cardiovascular tissue engineering". *Cardiovascular Pathology* 11: 305-317.
- Rodrigues, J., Erny, G., Barros, A., Esteves, V., Brandao, T., Ferreira, A., Cabrita, E., Gil, A. (2010). "Quantification of organic acids in beer by nuclear magnetic resonance (NMR)-based methods." *Analytica Chimica Acta* 674: 166-175.
- Sachols, E y Czernuszka, J. (2003). "Making tissue engineering scaffold work: review on the application of SFF technology to the production of tissue engineering scaffolds". *European Cells and Materials* 5: 29-40.
- Santerre JP, Woodhouse K, Laroche G, Labow RS. (2005). "Understanding the biodegradation of polyurethanes: from classical implants to tissue engineering materials". *Biomaterials* 26:7457–70.
- Sarasam A, Madihally SV. (2005). "Characterization of chitosan–polycaprolactone blends for tissue engineering applications". *Biomaterials* 26:5500–8
- Schmedlen RH, Masters KS, West JL. (2002). "Photocrosslinkable polyvinyl alcohol hydrogels that can be modified with cell adhesion peptides for use in tissue engineering". *Biomaterials* 23:4325–32.
- Sellaro, T., Hildebrand, D., Lu, Q., Vyavahare, N., Scott, M., Sacks, M. (2007). "Effects of collagen fiber orientation on the response of biologically derived soft tissue biomaterials to cyclic loading". *Biomedical Materials Research*. 80A: 194-205.
- Seo SJ, Kim IY, Choi YJ, Akaike T, Cho CS. (2006). "Enhanced liver functions of hepatocytes cocultured with NIH 3T3 in the alginate/galactosylated chitosan scaffold". *Biomaterials* 27:1487–95
- Shahabeddin, L., Damour, O., Berthod, F., Rousselle, P., Saintigny, G., Collomberl, C. (1991). "Reconstructed skin from co-cultured human keratinocytes and fibroblasts on a

chitosan cross-linked collagen GAG matrix." Journal of Materials Science: Materials Medicine. **2**: 222-226.

SH, Kang SG, Kim ES, Cho SH, Lee JH. (2003). "Fabrication and characterization of hydrophilic poly(lactic-co-glycolic acid)/poly(vinyl alcohol) blend cell scaffolds by melt-molding particulate leaching method". Biomaterials **24**:4011–21

Shahidi, F., Arachchi J., Jeon, Y. (1999). "Food applications of chitin and chitosans." Trends in Food Science & Technology **10**: 37-51.

Shrinivas, M., & Stevens, W. (2005). Chitin production by *Lactobacillus* fermentation of shirimp in a drum reactor and its chemical conversion to chitosan. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **80**, 1080-1087.

Suyatma, N., Copinet, A., Copinet, E., Fricoteaux, F., Coma, V. (2010). "Different Plasma Grafting Techniques on chitosan". *Journal Polymer Environmental*. 1-6.

Techatanawat, S., Surarit, R., Suddhasthira, T., Piboonniyom, S. (2011). "Type I collagen extracted from rat-tail and bovine Achilles tendon for dental application: a comparative study". *Assian Biomedicine* **5**(6): 787-798.

Torres, E. Marín V., Aburto J., Beltrán H.I. Shirai K., Villanueva, S., Sandoval G. (2012) Enzymatic modification of chitosan with quercetin and its application as antioxidant edible films. *Applied Biochemistry and Microbiology* **48**(2): 149-156.

Torres-Arreola, W., Pacheco-Aguilar, R., Sotelo-Mundo, R., Rouzaud-Sández, O., Ezquerra-Brauer, J. (2008). "Caracterización parcial del colágeno extraído a partir del manto, aleta y tentáculos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*)". *Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de los Alimentos*. **6** (2): 101-108

Wozney JM, Seeherman HJ. (2004). "Protein-based tissue engineering in bone and cartilage repair". Curr Opin Biotechnology **15**:392–8.

Wu YC, Shaw SY, Lin HR, Lee TM, Yang CY. (2004). "Bone tissue engineering evaluation based on rat calvaria stromal cells cultured on modified PLGA scaffolds". Biomaterials **27**:896–904.

Xia, W., Liu, W., Ciu, L, *et al.* (2004). "Tissue engineering of cartilage with the use of chitosan-gelatin complex scaffolds". Journal of Biomedical Materials Research **71**: 373-380.

Xiaoliang Wang, Lin Sang, Dongmei Luo, Xudong Li. (2011). "From collagen–chitosan blends to three-dimensional scaffolds: The influences of chitosan on collagen nanofibrillar structure and mechanical property". Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **82**: 233–240

Yan Huang, Stella Onyeri, Mbonda Siewe, Aliakbar Moshfeghian, Sundararajan V. Madhally. (2005). "In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering". Biomaterials **26**: 7616-7627

Yao, F., Chen, W., Wang, H., Liu, H., Yao, K., Sun, P., & Lin, H. (2003). A study on cytocompatible poly(chitosan-g-L-lactic acid). *Polymer.*, *44*, 6435–644.

Zonggang, C., Xiumei, M., Chuanglong, H., Hongsheng, W. (2007). "Intermolecular interactions in electrospun collagen-chitosan complex nanofibers". Carbohydrate polymers. **72**: 410-418.

12 ANEXOS

12.1 Análisis de varianza (ANOVA) y comparación múltiple de medias Tukey del hinchamiento de los materiales porosos.

Para determinar si hay efecto del quitosano y tratamiento utilizado en la síntesis de los materiales porosos sobre el porcentaje de hinchamiento que presentan, se realizó una ANOVA y Tukey como prueba de comparación múltiple de medias con un nivel de significancia de $\alpha \leq 0.05$. Siendo $H_a = A$ al menos un tratamiento y un quitosano utilizado presenta diferencia significativa en el porcentaje de hinchamiento mostrado por el material.

Tabla 17. Análisis de varianza para el porcentaje de hinchamiento de los materiales porosos ($\alpha \leq 0.05$).

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	41641590.050	1	41641590.050	1304.558	.000
Tratamiento	16540646.500	3	5513548.834	172.730	.000
Error	255360.611	8	31920.076		
Total	58437597.162	12			

Tabla 18. Prueba de comparación múltiple de medias de Tukey con un nivel de significancia de $\alpha \leq 0.05$.

Donde: QB es quitosano biológico-químico y QC es quitosano comercial.

Tratamiento	N	Subconjunto		
	1	2	3	1
Iniciación térmica, QC	3	656.8500		
Iniciación térmica, QB	3	810.1133		
Entrecruzamiento, QC	3		2544.9067	
Entrecruzamiento, QB	3			3439.4467

12.2 Análisis de varianza (ANOVA) y comparación múltiple de medias Tukey de la erosión de los materiales porosos.

Para determinar si hay efecto del quitosano y tratamiento utilizado en la síntesis de los materiales porosos sobre el porcentaje de erosión que presentan, se realizó una ANOVA y Tukey como prueba de comparación múltiple de medias con un nivel de significancia de $\alpha \leq 0.05$. Siendo $H_a = \text{Al menos un tratamiento y un quitosano utilizado presenta diferencia significativa en el porcentaje de erosión mostrado por el material.}$

Tabla 19. Análisis de varianza para el porcentaje de erosión de los materiales porosos ($\alpha \leq 0.05$).

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Tratamiento	1220.755	3	406.918	19.546	.007
Error	83.276	4	20.819		
Total	4828.252	8			

Tabla 20. Prueba de comparación múltiple de medias de Tukey con un nivel de significancia de $\alpha \leq 0.05$.

Donde: QB es quitosano biológico-químico y QC es quitosano comercial.

Tratamiento	N	Subconjunto	
	1	2	1
Entrecruzamiento, QB	2	6.0700	
Entrecruzamiento, QC	2	16.2500	
Iniciación térmica, QB	2	21.5400	21.5400
Iniciación térmica, QC	2		40.0950

12.3 Análisis de varianza (ANOVA) y comparación múltiple de medias Tukey del hinchamiento de los materiales en forma de película.

Para determinar si hay efecto del quitosano y tratamiento utilizado en la síntesis de las películas sobre el porcentaje de hinchamiento que presentan, se realizó una ANOVA y Tukey como prueba de comparación múltiple de medias con un nivel de significancia de $\alpha \leq 0.05$. Siendo $H_a = A$ l menos un tratamiento y un quitosano utilizado presenta diferencia significativa en el porcentaje de hinchamiento mostrado por el material.

Tabla 21. Análisis de varianza para el porcentaje de hinchamiento de las películas. ($\alpha \leq 0.05$).

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Tratamiento	45057.918	3	15019.306	14.760	.004
Error	6105.303	6	1017.551		
Total	401729.312	10			

Tabla 22. Prueba de comparación múltiple de medias de Tukey con un nivel de significancia de $\alpha \leq 0.05$.

Donde: QB es quitosano biológico-químico, QC es quitosano comercial, quitococit es quitosano-co-cítrico y quitococitCol es quitosano-co-cítrico cubierto con colágena porcina tipo I.

Tratamiento	N	Subconjunto	
		2	1
quitococit , QB	3	91.7797	
quitococitCol, QB	3		200.5316
quitococitCol, QC	2		226.4580
Quitococit, QC	2		271.2454

Tabla 23.

12.4 Análisis de varianza (ANOVA) y comparación múltiple de medias Tukey de la erosión de los materiales en forma de película.

Para determinar si hay efecto del quitosano y tratamiento utilizado en la síntesis de las películas sobre el porcentaje de erosión que presentan, se realizó una ANOVA y Tukey como prueba de comparación múltiple de medias con un nivel de significancia de $\alpha \leq 0.05$. Siendo $H_a = A$ l menos un tratamiento y un quitosano utilizado presenta diferencia significativa en el porcentaje de erosión mostrado por el material.

Tabla 24. Análisis de varianza para el porcentaje de erosión de las películas. ($\alpha \leq 0.05$).

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Tratamiento	316.437	3	105.479	7.956	.037
Error	53.028	4	13.257		
Total	5108.294	8			

Tabla 25. Prueba de comparación múltiple de medias de Tukey con un nivel de significancia de $\alpha \leq 0.05$.
Donde: QB es quitosano biológico-químico, QC es quitosano comercial, quitococit es quitosano-co-cítrico y quitococitCol es quitosano-co-cítrico cubierto con colágena porcina tipo I.

Tratamiento	N	Subconjunto
		1
quitococit Col, QB	2	17.3707
Quitococit, QB	2	18.7719
Quitococil, QC	2	30.3454
quitococit Col, QC	2	30.8653

12.5 Análisis de varianza (ANOVA) y comparación múltiple de medias Tukey de la actividad antimicrobiana de los materiales en forma de película.

Para determinar si hay efecto del quitosano y tratamiento utilizado en la síntesis de las películas sobre la actividad antimicrobiana que presentan, se realizó una ANOVA y Tukey como prueba de comparación múltiple de medias con un nivel de significancia de $\alpha \leq 0.05$. Siendo $H_a = A$ al menos un tratamiento y un quitosano utilizado presenta diferencia significativa en la actividad antimicrobiana mostrada por el material.

Tabla 26. Análisis de varianza para la actividad antimicrobiana a las 6h de las películas. ($\alpha \leq 0.05$).

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Tratamiento	1255.386	5	251.077	1.044	.470
Error	1443.303	6	240.550		
Total	35572.396	12			

Tabla 27. Prueba de comparación múltiple de medias de Tukey con un nivel de significancia de $\alpha \leq 0.05$.

Donde: QB es quitosano biológico-químico, QC es quitosano comercial, quitcocit es quitosano-co-cítrico y quitcocitCol es quitosano-co-cítrico cubierto con colágena porcina tipo I.

Tratamiento	N	Subconjunto
		1
quitcocit Col QC	2	34.1250
Quitcocit QC	2	44.5600
quitcocit QB	2	54.9100
quitcocit Col QB	2	55.8950
QC	2	59.2150
QB	2	65.3350

Tabla 28. Análisis de varianza para la actividad antimicrobiana a las 12h de las películas. ($\alpha \leq 0.05$).

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Tratamiento	6891.010	5	1378.202	1.398	.344
Error	5915.825	6	985.971		
Total	31077.560	12			

Tabla 29. Prueba de comparación múltiple de medias de Tukey con un nivel de significancia de $\alpha \leq 0.05$.

Donde: QB es quitosano biológico-químico, QC es quitosano comercial, quitcocit es quitosano-co-cítrico y quitcocitCol es quitosano-co-cítrico cubierto con colágena porcina tipo I.

Tratamiento	N	Subconjunto
		1
QB	2	4.1600
QC	2	10.1650
quitcocit QC	2	38.1150
quitcocit Col QB	2	59.5400
quitcocit Col QC	2	59.7700
Quitcocit QB	2	62.3700

Tabla 30. Análisis de varianza para la actividad antimicrobiana a las 18h de las películas. ($\alpha \leq 0.05$).

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Tratamiento	9813.017	5	1962.603	7.833	.013
Error	1503.428	6	250.571		
Total	33643.983	12			

Tabla 31. Prueba de comparación múltiple de medias de Tukey con un nivel de significancia de $\alpha \leq 0.05$.
 Donde: QB es quitosano biológico-químico, QC es quitosano comercial, quitococit es quitosano-co-cítrico y quitococitCol es quitosano-co-cítrico cubierto con colágena porcina tipo I.

Tratamiento	N	Subconjunto	
		2	1
QC	2	10.60	
QB	2	22.4650	22.4650
quitococit QB	2	31.7250	31.7250
quitococit QC	2	54.3100	54.3100
quitococit Col QB	2		74.2600
quitococit Col QC	2		78.0450

Tabla 32. Análisis de varianza para la actividad antimicrobiana a las 24h de las películas. ($\alpha \leq 0.05$).

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Tratamiento	5522.639	5	1104.528	431.237	.000
Error	15.368	6	2.561		
Total	35374.231	12			

Tabla 33. Prueba de comparación múltiple de medias de Tukey con un nivel de significancia de $\alpha \leq 0.05$.
 Donde: QB es quitosano biológico-químico, QC es quitosano comercial, quitcocit es quitosano-co-cítrico
 y quitcocitCol es quitosano-co-cítrico cubierto con colágena porcina tipo I.

Tratamiento	N	Subconjunto			
		2	3	4	1
QC	2	25.9350			
QB	2	31.8150			
quitcocit QB	2		41.6000		
quitcocit QC	2		43.2250		
quitcocit Col QC	2			70.1450	
quitcocit Col QB	2				86.4600