

PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE PELÍCULAS DE QITOSANO PROVENIENTE DE CALAMAR GIGANTE "*Dosidicus gigas*" PARA USO MÉDICO

Lina Belén Fuentes Yalli*^a, Ana Pastor de Abram^a

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue el de desarrollar películas de quitosano proveniente de desechos del calamar gigante "*Dosidicus gigas*", evaluar sus propiedades físicas, mecánicas, biocompatibilidad y de bioadhesión para su uso como apósitos en el tratamiento de heridas por quemaduras.

Las propiedades mecánicas, bioadhesivas, grado de transmisión de vapor de agua (TVA) y de biocompatibilidad se estudiaron de acuerdo a la norma chilena NCh1151.Of76, y las normas internacionales ASTM D 5458-95, ASTM D 1653-93 y ASTM F 719-81, respectivamente.

Las películas de quitosano-NaOH (QNO-NaOH) y de complejo quitosano-alginato (CPEQA) mostraron baja irritación, además de adecuada permeabilidad, lo cual las hace aptas para ser utilizadas como apósitos.

Palabras clave: quitosano, películas de quitosano, complejo polielectrolito, apósito.

PREPARATION, CHARACTERIZATION AND CHITOSAN FILMS EVALUATION FROM GIANT SQUID "*Dosidicus gigas*" FOR MEDICAL USE

Lina Fuentes Yalli*^a, Ana Pastor de Abram^a

ABSTRACT

The objective of this study was to develop chitosan films from of squid giant "*Dosidicus gigas*" waste, and to evaluate their physical, mechanical, biocompatibility and bioadhesive properties as wound dressings.

The mechanical properties, bioadhesives, degree of water vapor transmission (TVA) and biocompatibility were studied according to NCh1151.Of76 chilean and international standards ASTM D 5458-95, ASTM D 1653-93 and ASTM F 719-81, respectively.

The film chitosan-NaOH and chitosan-alginate complex showed low irritation, as well as adequate permeability, which makes them suitable for use as wound dressings.

Key words: Chitosan, chitosan films, polyelectrolyte complex, wound dressing

INTRODUCCIÓN

En la actualidad los polímeros naturales o biopolímeros son utilizados como biomateriales, siendo uno de los más importantes el quitosano,¹ polisacárido catiónico lineal compuesto por unidades de β -(1-4)-2-desoxi-2-amino-D-glucopiranososa (D-glucosamina) (GlcN) y β -(1-4)-2-desoxi-2-acetamido-D-glucopiranososa (N-acetyl - D- glucosamina) (GlcNAc); derivado

^a Sección Química, Pontificia Universidad Católica del Perú, Av. Universitaria cuadra 18 s/n, Lima 23, Perú, lfuentes@pucp.edu.pe

por desacetilación de quitina: poli [β -(1-4)-2 acetamida-2-desoxi-D-glucopiranososa]; esta última es la segunda sustancia polimérica natural más abundante en la naturaleza después de la celulosa; se obtiene por métodos químicos de los exoesqueletos de crustáceos y de la concha caliza (pluma) de moluscos.²

El quitosano tiene aplicaciones farmacéuticas como matriz de liberación prolongada de drogas y en terapia génica, aplicaciones biomédicas como material bioadhesivo, fungistático, hemostático y como apósito para el tratamiento de quemaduras.

En el tratamiento de heridas por quemaduras se aplican vendajes húmedos denominados apósitos, que deben comportarse como piel alcanzando un 85% de humedad y buena permeabilidad, otorgándole, además, condiciones para repararla sin alteraciones. El quitosano ha mostrado buenos resultados facilitando la cicatrización y mejorando las funciones de las células inflamatorias.¹

El quitosano puede asociarse a sustancias cargadas negativamente, incluidas proteínas, polisacáridos aniónicos y ácidos nucleicos presentes en la piel; posee propiedades hemostáticas y antimicrobianas, es biocompatible, clínicamente ha demostrado no producir reacciones alérgicas después de su implantación, inyección o aplicación tópica. Es biodegradable en los mamíferos, se degrada y reabsorbe *in vivo*. Forma películas con buenas propiedades mecánicas y de permeabilidad; a pH neutro o básico posee grupos amino libres, a pH ácido se encuentra protonado y es soluble en agua.¹

PARTE EXPERIMENTAL

El quitosano empleado fue obtenido a partir de plumas de *Dosidicus gigas* (“pota”). Se aisló quitina la cual se desacetiló. Adicionalmente se empleó alginato Sigma-Aldrich Inc. Alg3500 (3.500 cP, 2%), ácido acético glacial (Merck), ácido láctico (Merck), etanol (Merck), gentamicina 0,3% (Laboratorio Chile, Chile), NaOH (Merck) y suero fisiológico (NaCl 0,9%. Laboratorios Sanderson S.A., Chile).

Para purificarlo se disolvió en ácido acético 1% v/v, se precipitó con NaOH 1M, se filtró, lavó y liofilizó. Se determinó el grado de desacetilación (GD) por RMN-¹H (Bruker, 300 MHz) según Lavertu y col.³; el peso molecular (PM) por viscosimetría relacionando el PM con la ecuación de Mark-Houwink.⁴ El contenido de cenizas, humedad y material insoluble se determinó gravimétricamente;⁴ el contenido de nitrógeno por el método Kjeldahl,⁵ la cristalinidad por difracción de rayos X (X Bruker D8 Advance),⁶ con ángulo de difracción de 2,5° a 40°.

Preparación de películas de quitosano y de cpeqa

Soluciones de QNO al 0,8% p/v en ácido láctico al 1% p/v se microfiltraron (filtro 0,45 μ m Sartorius, SM16249) a presión de 40 psi. Se determinó el pH (Potenciómetro Hanna Instruments HI 8417) y turbidez (turbidímetro Hanna Instruments, HI 93703, EE.UU.). Se moldearon 15 mL de la solución sobre placas Petri de diámetro 8,8 cm, las cuales fueron secadas por más de 18 horas. Se midió el pH por incubación en agua por 24 horas a 40 °C. Algunas películas fueron sumergidas por 5 minutos en 100 mL de NaOH 0,1 M, lavadas 3 veces en 100 mL de agua – etanol (20:80), luego secadas por 18 horas a 30 °C.

Las películas de complejo polielectrolito quitosano – alginato (CPEQA), se prepararon según Cárdenas y col.⁷ con modificaciones. Se mezcló QNO filtrado (0,8% p/v en ácido láctico) y alginato (0,8% p/v) 1:1 dejándose reaccionar 1 hora con agitación constante, vertida en placas Petri y se secó por 24 horas a 30 °C, obteniéndose películas de CPEQA, con apariencia similar a la clara de huevo revuelta.

Las películas fueron cortadas de acuerdo con las dimensiones requeridas en los ensayos y se almacenaron en ambiente controlado a 21 ± 1 °C y $50 \pm 2\%$ HR.

Evaluación de las películas

Determinación de las propiedades mecánicas

Se evaluó el Alargamiento Porcentual (A%) y el Esfuerzo de Tracción en el Corte (ETC) en N mm^{-2} , de acuerdo con la norma Oficial Chilena NCh1151.Of.76,⁸ equivalente a la norma ISO R1184-1970, con pequeñas modificaciones.⁹

Determinación de propiedades bioadhesivas

Se utilizó la norma ASTM D5458-95¹⁰ con algunas variaciones.⁹ Se determinó la fuerza máxima de desprendimiento ($F_{\text{máx}}$) y el trabajo de desprendimiento (T_{des}) necesarios para retirar la película de la piel de ensayo.

Determinación del grado de transmisión de vapor de agua (TVA)

El TVA se determinó según la norma ASTM D1653-93 – Método de la copa húmeda.¹¹ El procedimiento se repitió 4 veces para cada tipo (películas lavadas y sin lavar de quitosano y películas de CPEQA).

Biocompatibilidad de las películas-test de irritación primaria dérmica

Se utilizaron películas de QNO-NaOH y de CPEQA preparadas bajo campana de flujo laminar clase II, en condiciones asépticas, con material esterilizado en autoclave.

Este test se realizó en conejos con la norma ASTM F 719– 81¹² con algunas modificaciones.⁹ Los estudios se realizaron en el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP). Los resultados se evaluaron según los índices de la tabla 1. (ASTM F 719 – 81) para eritema y edema.

El índice promedio de irritación primaria (PII Promedio) fue calculado sumando los promedios de puntajes para eritema y edema de las zonas con y sin abrasión para cada muestra ensayada (tabla 2).¹³

Tabla 1. Tabla de puntuación utilizada para los ensayos de irritación primaria.

Puntaje	Eritema	Edema
0	Sin eritema	Sin edema
1	Eritema levemente perceptible	Edema levemente perceptible
2	Eritema definido	Edema leve,
3	Eritema moderado a severo	Edema moderado
4	Eritema severo y con llagas	Edema severo

Tabla 2. Interpretación de puntajes para el ensayo de irritación primaria

Valor	Interpretación
0 – 1,9	No irritante
2,0 – 3,9	Medianamente irritante
4,0 – 8,0	Demasiado irritante

Análisis estadístico de datos

Se utilizó el método one-way ANOVA del software ORIGIN. (Varianza *t de Student*, indicador de diferencias significativas $p \leq 0,05$) para evaluar las diferencias entre grupos. Los resultados se muestran como: promedio \pm desviación estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las condiciones óptimas para la obtención de QNO de pota se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de obtención de quitosano

Condición	[NaOH] %	Tiempo (min)	Relación w/v	Temperatura °C
DP	8	120	1:10	60
DA	40	240	1:10	60
Desproteización: DP			Desacetilación: DA	

Caracterización de quitosano

El QNO ensayado tiene PM promedio de 980 kDa adecuado para la formación de CPEQA; el GD fue de 90%, esto le confiere una adhesión suficiente para su uso como apósito y una buena solubilidad en medio ácido, para facilitar la formación de películas con buenas características.

Para evaluar la cristalinidad se comparó el espectro del QNO de pota con el del QNO estándar Sigma de configuración α (figuras 1 y 2). Se encontró diferencias, primero en la posición del ángulo 2θ para el QNO de pota a $10,68^\circ$ y $20,14^\circ$ mientras que el Sigma está a $10,08^\circ$ y $19,94^\circ$. Estos valores confirman que nuestro QNO no es de configuración α . El QNO de pota posee mayor cristalinidad al tener mayor intensidad debido al ordenamiento de las cadenas en configuración β .

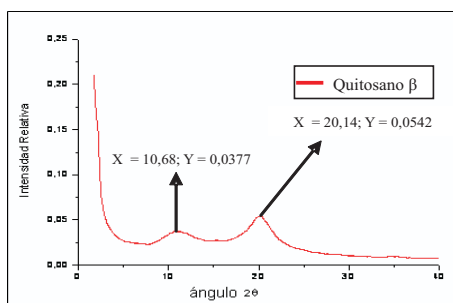


Figura 1. Espectro DRX QNO pota (β) Picos de los ángulos 2θ a $10,68^\circ$ de intensidad 0,0377, y a $20,14^\circ$ de intensidad 0,0542.

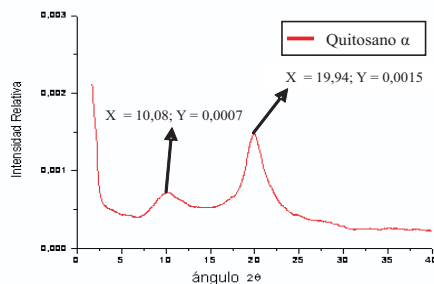


Figura 2. Espectro DRX QNO (α) Picos de los ángulos 2θ a $10,08^\circ$ de intensidad 0,0007, y a $19,94^\circ$ e intensidad 0,0015.

Películas de quitosano y cpeqa

El QNO se disolvió fácilmente en ácido láctico pues forma una sal soluble por las interacciones electrostáticas entre el grupo amino protonado del quitosano y el ion carboxilato del ácido láctico.

Se usó ácido láctico por ser biocompatible, de baja toxicidad, intermediario en procesos de fermentación de azúcares y poseer mejores características para la formación de películas.¹⁴

Las soluciones filtradas de QNO y de alginato son transparentes, con pH muy diferentes de $2,86$ y $6,45$ (*t-student*; $p \leq 0,05$; $n=3$), respectivamente. Presentan baja turbidez de $3,02 \pm 0,10$ y $4,48 \pm 0,15$ FTU, respectivamente, asegurando pureza y transparencia.

Las películas de QNO son transparentes, suaves, compactas, homogéneas e incoloras; con pH $2,9 \pm 0,02$ semejante al de sus soluciones ($2,86 \pm 0,01$), presentan espesores de 35 ± 1 μm .

Las películas tratadas con NaOH son insolubles en agua debido a la neutralización del grupo amino protonado del QNO formando bases libres de QNO insoluble y la sal sódica de lactato; estas películas tratadas se mantuvieron transparentes, incoloras, pero rugosas; su pH varió hasta un valor de $5,47 \pm 0,06$; con espesores de $33 \pm 1 \mu\text{m}$, de apariencia menos uniforme que las de QNO. Las películas de CPEQA fueron heterogéneas, rugosas y opacas de espesores $66 \pm 5 \mu\text{m}$, con pH $5,52 \pm 0,03$, similar al de las películas de quitosano tratadas con NaOH (*t-student*; $p \leq 0,05$, $n=3$).

Cuando se forma un complejo polielectrolito con quitosano, el grupo amino del quitosano genera enlaces de hidrógeno con los grupos presentes en la gelatina, rompiéndose el enlace de hidrógeno como resultado de la estructura amorfa del mismo. Esta disminución de la cristalinidad se refleja en la opacidad confirmando que el enlace de hidrógeno entre gelatina y quitosano muestra buena compatibilidad.

Las películas de QNO fueron neutralizadas con el fin de obtener películas con pH similar a la piel humana.

Evaluación de las películas de quitosano y cpeqa

Propiedades mecánicas

Las películas de QNO resultaron ser significativamente más elásticas que las películas de QNO-NaOH con valores de $65,81 \pm 7,08 \%$ y $31,89 \pm 1,46\%$, respectivamente (*t-student*; $p \leq 0,05$, $n=5$). La disminución de la elasticidad se debería a la reducción del ion lactato plastificante durante el lavado. Ambas son más elásticas que las películas del CPEQA.

Las películas de QNO - NaOH y QNO resultaron ser más resistentes, con valores de ETC de $30,09 \pm 2,84 \text{ N mm}^{-2}$ y $29,36 \pm 4,50 \text{ N mm}^{-2}$, respectivamente, contra $10,11 \pm 1,78$ de las películas de CPEQA. Los resultados se muestran en tabla 4 y figuras 3 y 4.

Otros estudios ¹ muestran resultados diferentes al nuestro; estas diferencias dependen de la especie de origen, del PM y del GD así como del proceso de fabricación, de las condiciones ambientales de las pruebas y de la velocidad de análisis.

Películas	A%	ETC	F _{máx} (N)	T _{des} (N mm)
QNO	$65,81 \pm 7,08$	$29,36 \pm 4,50$	$0,20 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,02$
QNO-NaOH	$31,89 \pm 1,46$	$30,09 \pm 2,84$	$0,24 \pm 0,04$	$0,25 \pm 0,04$
CPEQA	$3,70 \pm 0,60$	$10,11 \pm 1,78$	$0,16 \pm 0,02$	$0,07 \pm 0,01$

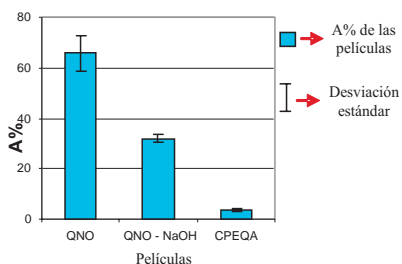


Figura 3. Comparación del A% A 20 mm/min norma Chilena Oficial NCh1151 ($n=5$).

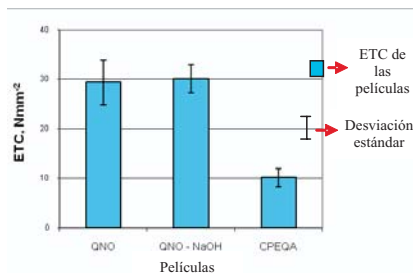


Figura 4. Comparación del ETC A 20 mm/min norma Chilena Oficial NCh1151 ($n=5$).

Propiedades de bioadhesión

Las propiedades intrínsecas importantes de los polímeros son: PM, concentración del polímero, flexibilidad de las cadenas poliméricas y grupos químicos, los cuales determinan las propiedades de bioadhesión debido a que los polímeros pueden formar sobre la piel, uniones electrostáticas o secundarias como puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals. Por otro lado, los factores ambientales, pH, tiempo de contacto y grado de hinchamiento, afectan significativamente las propiedades de bioadhesión.¹

Los resultados se muestran en la tabla 4 y figura 5.

La humedad relativa de trabajo (HR) de la piel de cerdo fue de $21 \pm 0,89\%$ ($n=10$). Se trabajó a este valor de % HR muy estable. La piel de cerdo guarda gran similitud con la piel humana siendo adecuada para estudios de bioadhesión *in vitro* además de su disponibilidad y bajo costo.¹⁵

Las películas de QNO-NaOH tienen mejores propiedades de bioadhesión que las no tratadas, con F_{\max} de $0,24 \pm 0,04$ N y un T_{des} de $0,25 \pm 0,04$ N mm contra un F_{\max} de $0,20 \pm 0,01$ N y un T_{des} de $0,20 \pm 0,01$ N mm respectivamente, estas diferencias no son significativas para el F_{\max} (*t-student*; $p \leq 0,05$, $n=5$).

Las películas de QNO-NaOH presentan mayor rugosidad permitiendo buen contacto con la piel a pesar de no estar totalmente ionizadas. Las películas de QNO poseen grupos catiónicos que interactúan con la superficie de la piel cargada negativamente, dándole características bioadhesivas.

Las propiedades de bioadhesión de los complejos son inferiores a los de las películas de QNO y QNO-NaOH con valores de F_{\max} de $0,16 \pm 0,02$ N y un T_{des} de $0,07 \pm 0,01$ N mm (*t-student*; $p \leq 0,05$, $n=5$), debido a las uniones quitosano alginato reduciendo las interacciones electrostáticas y probablemente estableciendo débil unión a la piel de cerdo a través de puentes de hidrógenos u otras uniones más débiles, quedando grupos amino protonados en la molécula del QNO.

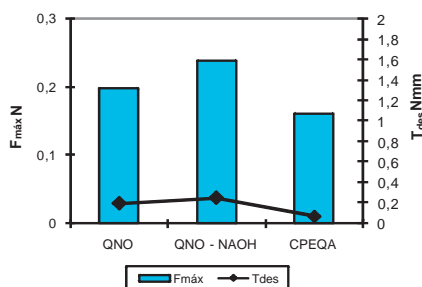


Figura 5. (F_{\max}) y (T_{des}) de las películas.

Las barras indican los valores de F_{\max} de cada tipo de película y la línea el T_{des} de cada una de ellas. Ensayo a velocidad de 5 mm/min.

El alto PM del QNO influyó en estas propiedades: a mayor PM, mayor polimerización y, por lo tanto, mayor posibilidad de formación de puentes de hidrógeno aumentando la bioadhesión. A diferentes % HR de la piel de cerdo se observa que una mayor humedad otorgaría una mayor bioadhesión.

La mayoría de los apósitos utilizados actualmente contienen algún adhesivo; el apósito al ser retirado se adhiere a la herida arrancando el epitelio recientemente formado, causando dolor, retrasando el proceso de curación y, aumentando la formación de cicatrices.

Los resultados de esta propiedad en películas preparadas de QNO, QNO-NaOH y CPEQA, indican que no sería necesaria la adición de adhesivos en ellas.

Nuestras películas muestran pequeña adhesión, calidad importante para ser usadas como apósitos; por tanto podrían ser retiradas de la piel sin ningún trauma para el paciente.

Grado de transmisión de vapor de agua, TVA

Se usaron los datos de agua evaporada entre los días 7 y 12, por presentar mejor linealidad, figura 6. Los valores obtenidos de TVA se muestran en la tabla 5 y figura 6.

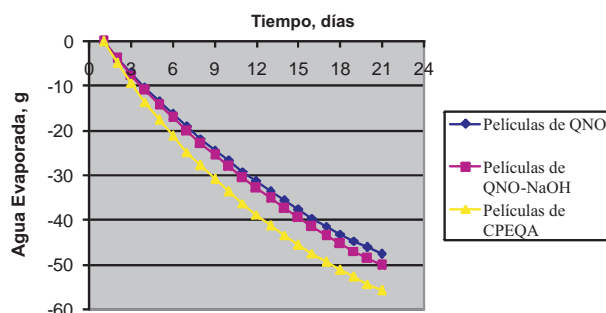


Figura 6. Cinética de evaporación del agua a través de las películas. Pérdida de peso (g) en función del tiempo.

Tabla 5. Propiedades de permeabilidad de las películas

Películas	Agua Total Evaporada (g)	TVA ($\text{g m}^{-2}\text{h}^{-1}$)	TVA ϵ ($\text{mm g m}^{-2}\text{h}^{-1}$)
QNO	47,64 \pm 4,68	20,35 \pm 2,33	0,71 \pm 0,08
QNO-NaOH	50,14 \pm 2,93	21,24 \pm 0,69	0,70 \pm 0,02
CPEQA	55,86 \pm 1,61	23,29 \pm 0,37	1,54 \pm 0,02

Las películas del CPEQA son significativamente más permeables al vapor de agua que las de QNO y QNO-NaOH, con valores de TVA de 23,29 \pm 0,37 contra 20,35 \pm 2,33 y 21,24 \pm 0,69 respectivamente (*t-student*; $p < 0,05$; $n = 4$).

El TVA ϵ informa de la influencia de los espesores sobre el TVA. No existen diferencias significativas (*t-student*; $p < 0,05$; $n = 4$) entre las películas de QNO y QNO-NaOH 0,71 \pm 0,08 y 0,70 \pm 0,02, respectivamente, sugiriendo que la disminución en el espesor de las tratadas con NaOH, aumenta la resistencia a la transferencia debido a su rugosidad.

Por otro lado, el TVA ϵ del CPEQA 1,54 \pm 0,02 es mayor que los de las películas de QNO y QNO-NaOH (*t-student*; $p < 0,05$; $n = 4$), debido a que posee mayor porosidad.

Un apósito debe acelerar la curación de heridas mediante la prevención de la pérdida de fluidos para mantener un buen ambiente fisiológico; como la superficie de una quemadura contiene agua y exudados, es necesario evaporarlos a través del apósito para que éste se adhiera a la superficie de la herida y para que el exudado no se acumule entre la herida y el mismo, evitando de esta manera infección, daño de los tejidos y retraso del proceso de curación. Esto significa que un apósito ideal debería controlar la pérdida por evaporación de agua de la superficie de la herida. El TVA de la piel normal es de 8 – 21 $\text{g m}^{-2}\text{h}^{-1}$. Los apósitos deben tener valores del mismo orden.

Todas las películas mostraron valores de TVA cercanos y mayores a los de la piel; su hidrofiliidad permite que las moléculas de agua interactúen con la matriz polimérica. Nuestras películas tienen capacidad para prevenir la acumulación de fluidos en heridas con exudados medios a altos, evitando la deshidratación total de la herida y manteniendo un ambiente húmedo.

Biocompatibilidad -test de irritación primaria dérmica (PII)

Evalúa la aceptabilidad del organismo a las películas, reconociendo para esto, el nivel de irritación al contacto con la piel del conejo con y sin abrasiones.

Las películas de QNO sin lavar no fueron ensayadas debido a su pH ácido. Se usaron películas neutralizadas a pH similares a la piel humana y las del CPEQA. En la tabla 6 se muestran los valores del PII promedio.

Tabla 6. Valores de formación de eritema, edema y PII promedio de las películas

Películas	Eritema	Edema	PII Promedio	Interpretación
QNO-NaOH	0,167 ± 0,333	0	0,167 ± 0,333	No irritante
CPEQA	0,167 ± 0,279	0	0,167 ± 0,279	No irritante
Control	0	0	0	No irritante

El PII promedio considera la suma de los promedios de la formación de eritema y edema.

Las películas de QNO-NaOH y CPEQA presentan mínima formación de eritema, sin edema, con valores iguales y cercanos a cero, haciéndolas ideales para su uso como apósito.

CONCLUSIONES

El quitosano proveniente de *Dosidicus gigas*, “pota”, posee características valiosas para uso biomédico al tener una estructura cristalina ordenada tipo β -quitosano; sus soluciones son muy transparentes con mínimo contenido de cenizas, material insoluble y nitrógeno proteico.

Las películas de QNO para uso médico deben tratarse con NaOH para alcanzar pH cercano a la piel humana. Este tratamiento las compacta disminuyendo levemente su flexibilidad y aumentando la resistencia.

El CPEQA producto de la interacción electrostática entre el residuo de glucosamina del QNO y el grupo carboxilato del alginato, se moldeó en películas de estructura compacta de mayor rigidez que las de QNO. La mínima bioadhesión en estos materiales se debió a la neutralización de las cargas positivas del QNO por parte del alginato.

Las películas de QNO y QNO-NaOH mostraron buenas propiedades mecánicas, bioadhesivas y de permeabilidad. Las películas de CPEQA, fueron menos resistentes, flexibles y bioadhesivas.

Las películas de QNO-NaOH y de CPEQA mostraron baja irritación (cercana a cero), además de una adecuada permeabilidad, lo cual las hace aptas para ser utilizadas como apósitos gracias a su biocompatibilidad ya que mantienen un ambiente húmedo que promueve la curación de quemaduras.

AGRADECIMIENTO

Esta investigación fue posible gracias al apoyo de la Dirección Académica de Investigación (DAI)-PUCP, al Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, CYTED, y a la Universidad de Chile.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pastor de Abram A. Editor. Quitina y Quitosano: Obtención, Caracterización y Aplicaciones. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima: CYTED; 2004.
2. ASTM F 2103-01. Standard guide for characterization and testing of chitosan salts as starting materials intended for use in biomedical and tissue-engineered medical product applications. American Society for Testing and Materials, Philadelphia. 2001.
3. Lavertu M, Xia A, Serreqi A, Berrada M, Rodrigues A, Wang D. et. al. A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *J Pharm Biomed Anal* 2003; 32 (6): 1149-1158.
4. Wei Wang, Shuqin Bo, Shuqing Li, Wen Qin. Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation. *Int J Biol Macromol* 1991; 13 (5): 281-285.
5. ASTM E 258-67 (Reapproved 1987). Standard test method for total nitrogen in organic materials by modified kjeldahl method. American Society for Testing and Materials, Philadelphia. 311-313 (1987).
6. Mingyu Cheng, Jinguang Deng, Fei Yang, Yandao Gong, Nanming Zhao, Xiufang Zhang. Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. *Biomaterials* 2003; 24(17): 2871-2880.
7. Cárdenas A, Argüelles W, Goycoolea F, Huiguera I. and Peniche C. Diffusion through membranes of the Polyelectrolyte Complex of Chitosan and Alginate. *Macromol Biosci* 2003; 3 (10): 535-539.
8. Norma Oficial Chilena NCh1151.Of76. Láminas y películas plásticas – Determinación de las propiedades de tracción. 1999.
9. Fuentes Yalli L. Preparación, caracterización y evaluación *in vitro* e *in vivo* de películas de quitosano para su aplicación como apósito en heridas por quemaduras. [Tesis de Maestría]. Lima, Perú: Pontificia Universidad Católica del Perú; 2007.
10. ASTM D 5458-95. Standard test method for peel cling of stretch wrap film. American Society for Testing and Materials, Philadelphia. 1-8 (2001).
11. A.S.T.M D 1653 – 93 (Reapproved 1999). Standard test methods for water vapor transmission of organic coating films. American Society for Testing and Materials, Philadelphia. 1-4 (1999).
12. A.S.T.M F 719 - 81 (Reapproved 1996). Standard practice for testing biomaterials in rabbits for primary skin irritation. American Society for Testing and Materials, Philadelphia. 178-179 (1998).
13. Mazzanti G, Daniele C, Tita B, Vitali F, Signore A. Biological evaluation of a polyvinyl siloxane impression material. *Dent Mater* 2005; 21 (4): 371-374.
14. Khan, TA, Peh KK and Chang HS. Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing, *J. Pharm. Pharm Sci* 2000; 3 (3): 303-311.
15. Sullivan T, Eaglstein W, Davis S. and Mertz P. The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair Regen* 2001; 9(2): 66-76.