

Obtención y caracterización de oligómeros de quitosano para uso como sustituto dérmico

Arturo Barraza Rovira.

**Corresponding author:
arturobarraza03@gmail.com*

Resumen. En este trabajo de titulación se basa en la obtención y diseño de un sustituto dérmico a base de oligómeros de quitosano y ácido hialurónico por medio del método de degradación oxidativa, obtención de mezclas poliméricas de ácido hialurónico con oligómeros de quitosano y la caracterización de éstos para su posterior aplicación en usos médicos. Se combinan ciertas características antimicrobianas, biocompatibles y regenerativas del quitosano con las propiedades biológicas y funcionales del ácido hialurónico para su aplicación biomédica; el uso de un refuerzo como el ácido hialurónico conlleva a la posibilidad de incrementar las propiedades y beneficios del sustituto dérmico en la piel.

Se estudiaron las condiciones y metodologías de la obtención de los oligómeros de quitosano por el método reportado por Tao Sun (peróxido de hidrógeno) y Yunpeng Cai (peróxido de sodio) donde las variables que se controlan y modifican son: volumen del oxidante, tiempo de degradación, volumen del reactivo que se utiliza para la precipitación de los oligómeros de quitosano y el tiempo de reposo para permitir la precipitación; cabe destacar que modificando alguna variable de la metodología seleccionada influye en la calidad y características de los oligómeros obtenidos.

Palabras Clave: Sustituto dérmico, quitosano, ácido hialurónico, degradación.

Abstract. This degree project is based on the obtaining and design of a dermal substitute made from chitosan oligomers and hyaluronic acid through the method of oxidative degradation, obtaining polymer blends of hyaluronic acid with chitosan oligomers and characterizing them for their

subsequent application in medical uses. Certain antimicrobial, biocompatible, and regenerative characteristics of chitosan are combined with the biological and functional properties of hyaluronic acid for biomedical application; the use of a reinforcement like hyaluronic acid leads to the possibility of enhancing the properties and benefits of the dermal substitute in the skin.

Keywords: Dermal substitute, chitosan, hyaluronic acid, medical, degradation.

I. INTRODUCCIÓN

El objetivo de este trabajo fue desarrollar y caracterizar oligómeros de quitosano y ácido hialurónico mediante el método de degradación oxidativa, con el fin de reducir el exceso uso de antibióticos para tratar heridas y quemaduras.

Hoy en día el abuso constante de antibióticos ha sido clave para el incremento de resistencia bacteriana y por ello actualmente se deben usar cantidades más agresivas para el cuerpo humano. Es por ello por lo que se trabajó en una alternativa, en este caso un sustituto dérmico, para poder disminuir este problema y así mismo potenciar el crecimiento y protección de la piel sin generar daños por parte de las lesiones

I.1. Ácido hialurónico

El ácido hialurónico es un polisacárido natural conformado por unidades de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina unidas linealmente de manera alternada por uniones 1-3 y 1-4. Se encuentra en los tejidos vertebrados como un componente clave de la matriz extracelular; está presente en tejido conectivo, piel, ojo y líquido sinovial, donde es secretado continuamente por la membrana sinovial en el espacio articular y constituye la parte macromolecular principal del tejido sinovial

Este polímero aniónico lineal tiene una estructura semiflexible, lo que provoca que adopte una forma de bobina expandida similar a un gusano; cuando las cadenas de CH están agrupadas, sus dominios se ven obligados a interpenetrarse, lo que conduce a un comportamiento no lineal.

Este biopolímero es de particular interés debido a que tiene propiedades de biocompatibilidad con el cuerpo humano. Recientemente se ha demostrado que el AH desempeña una multitud de roles biofísicos, bioquímicos y regulatorios celulares en los tejidos sinoviales de las articulaciones: disminuye la sequedad en la piel y ofrece un gran potencial para la revitalización de la piel, la mantiene suave, lubrica articulaciones y desempeña un papel crucial en mejorar la condición de la piel y heridas. Está implicado en muchos procesos biológicos, incluyendo la fertilización, desarrollo embrionario, la migración y diferenciación celular, la cicatrización de heridas, la inflamación, el crecimiento y la metástasis de células tumorales, y siempre que ocurra una rápida renovación y reparación de tejidos (Csoka et al., 1997).

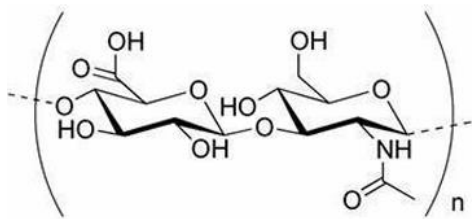


Figura 1. Estructura del ácido hialurónico

Biológicamente posee la función de mantener la elasticidad de los líquidos sinoviales e intraoculares y la hidratación de los tejidos, facilitar el transporte de agua en la matriz celular y el ensamblaje supramolecular de proteoglicanos en la matriz extracelular. (J. Necas, et al, 2008) [01]. El contenido de AH también puede determinarse mediante el análisis de los productos de oligosacáridos de la digestión enzimática, esta cuantificación se realiza mediante métodos de HPLC, electroforesis capilar (CE), espectrometría de masas o electroforesis de carbohidratos asistida por fluoróforo.

I.II. Quitina y Quitosano

La quitina y el quitosano son materiales naturales muy utilizados actualmente, pues se trata de una pareja de polisacáridos que ha tomado demasiado auge por la infinidad de aplicaciones que ha logrado sobre todo para el área de medicina, además de que presentan muy poco impacto ambiental, lo que los convierte en biopolímeros ideales para trabajar.

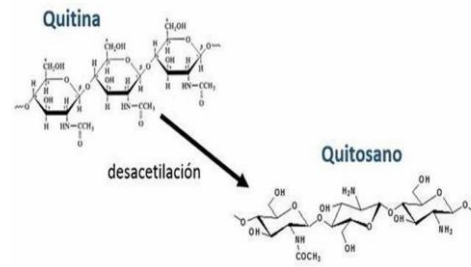


Figura 2. Desacetilación de la quitina

Se han desarrollado varios procedimientos para la obtención de quitosano en los últimos años. El método más utilizado es la reacción de conversión de quitina en este polisacárido natural principalmente por N-desacetilación alcalina. Dicho proceso se realiza mediante el tratamiento directo de la quitina con una solución concentrada de hidróxido de sodio o potasio (40-50%) a una temperatura de 100°C o más, con hidrólisis de la mayoría o todos los grupos acetilos del polímero. Otro de los procedimientos de obtención de este polímero, es también la desacetilación de la quitina por medio del uso de reactivos ácidos; sin embargo, este método puede provocar la hidrólisis del polisacárido y traer como consecuencia, bajos rendimientos del producto final (quitosano).

Por esta razón, los métodos alcalinos son los procesos comúnmente empleados para la desacetilación de la quitina. Los grupos N-Aceto (-NHCOCH₃) no pueden ser hidrolizados por reactivos ácidos, pues pueden provocar la hidrólisis del polisacárido, luego, los métodos alcalinos siendo más “suaves” resultan más comunes en la desacetilación de la quitina. Se ha comprobado que existe una relación lineal entre la temperatura y el grado de desacetilación en el intervalo entre 40-150°C.

I.III. Actividad antimicrobiana del quitosano

El quitosano muestra su actividad antibacteriana solamente en un medio ácido, el cual es usualmente atribuible a su poca solubilidad a pH altos. Se han reportado actividad antimicrobiana que podría ser efecto de quitosano disuelto en medios ácidos tales como ácido acético, (Devlieghere y col. 2004), ácido láctico (Papineau y col. 1991), ácido glutámico (Roller y Covill, 1999; Sudharshan y col. 1992) y ácido clorhídrico (Chung y col. 2003). Los grupos amino catiónicos del quitosano probablemente envuelven a los grupos aniónicos de los microorganismos, resultando en la inhibición del crecimiento bacteriano. Otros mecanismos mencionados en la literatura son la

interacción de productos hidrolizados difundidos con ADN microbiano, lo cual conduce a la inhibición del RNA mensajero y a la síntesis de proteínas y la quelación de metales, elementos esporulados y nutrientes esenciales.

1.3.1. Materiales:

- **Quitosano de peso molecular bajo:** quitosano 76% desacetilado, viscosidad 94cps, con un peso molecular de 50,000-190,000, obtenido de Aldrich.
- **Quitosano de peso molecular medio:** quitosano 84% desacetilado, viscosidad 525 cps, con un peso molecular de 190,000-310.000, obtenido de Aldrich.
- **Peróxido de hidrógeno:** 29-32% (H₂O₂, estabilizado) con un peso molecular de 34.01, obtenido en J.T Baker.
- **Ácido acético:** libre de aldehídos con un peso molecular de 60.05, obtenido en J.T Baker.
- **Peryodato de sodio:** reactivo al 98% con un peso molecular de 213.89, obtenido en Aldrich.
- **Perlas de hidróxido:** con un peso molecular de 40, obtenido de Macron Fine Chemicals.

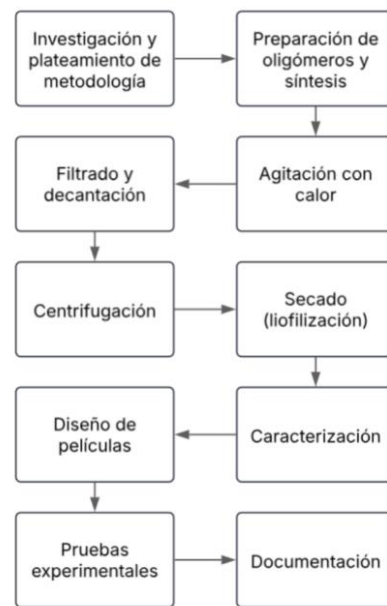


Figura 3. Diagrama de metodología

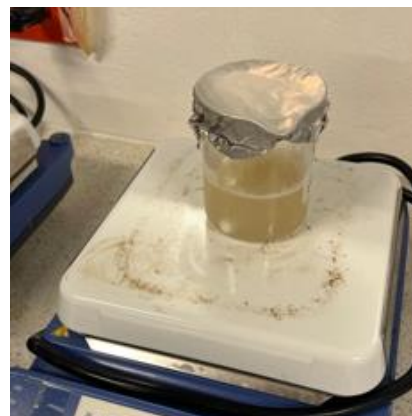
Se trabajó con dos diferentes métodos (peryodato de sodio y H₂O₂) de los cuales al final se obtuvieron 6 mezclas diferentes utilizando: quitosano de peso molecular bajo, quitosano de peso molecular medio y ácido hialurónico.

II.II. Formulaciones

Luego de la investigación en la literatura, se determinaron las medidas:

- Degradación con H₂O₂

Quitosano: de acuerdo con la metodología de Tao Sun, para ambos quitosanos se preparó una solución para su degradación disolviendo 2 gramos de quitosano en 100 ml de solución de ácido acético al 2%. Posteriormente se colocó en un agitador magnético para comenzar la agitación y se mantuvo así por 24 horas. Después se añadió 10 ml de H₂O₂ a la solución del quitosano y la solución se calentó en un baño de agua a una temperatura de 80 °C por 4 horas, para aumentar el movimiento molecular y facilitar la reacción iniciando así la degradación oxidativa del quitosano.



II. METODOLOGÍA

II.I. Fundamento

Se trabajó con dos diferentes métodos (peryodato de sodio y H₂O₂) de los cuales al final se obtuvieron 6 mezclas diferentes utilizando: quitosano de peso molecular bajo, quitosano de peso molecular medio y ácido hialurónico.

Figura 4. Degradación del quitosano

El peróxido de hidrógeno es un agente oxidante que al formar radicales libres ataca los enlaces del quitosano provocando así que se rompan y de la misma forma que reduzca su peso molecular. Se ajustó el pH a 10, a temperatura ambiente, con una solución de NaOH 5M, siendo indispensable este paso pues así se neutraliza el medio ácido y se detiene la reacción de degradación. Tras haber ajustado el pH, se filtró a presión reducida colocando un papel filtro en un embudo de Büchner separando así las partes insolubles, a lo recuperado se le agregó etanol al 96% a un volumen de 3:1 (habiendo comenzado con 100 ml se añadieron 300 ml).



Figura 5. Filtrado y decantación

El etanol es prácticamente un solvente orgánico que ayuda a reducir la solubilidad del quitosano degradado en agua y permitirá recuperar el quitosano degradado en forma de polvo o partículas sólidas. Se dejó en reposo 24 horas y se realizó un proceso de centrifugación a la solución donde una vez obtenido todo el precipitado, éste se lavó 3 veces con agua destilada para eliminar el etanol e hidróxido. Después se guardó en tubos y se metió a congelar para posteriormente secar por liofilización.

Ácido hialurónico: se preparó una solución para la degradación del ácido hialurónico siguiendo la misma metodología que el quitosano excepto que el hialurónico se disolvió en 100 ml de únicamente agua destilada; la solución de mantuvo en agitación por 24 horas (hasta su completa disolución). Posteriormente se añadió 10ml de H₂O₂ al 30% a la solución de ácido hialurónico y la solución se calentó en un baño de agua a una temperatura de 80 °C por 4 horas.



Figura 6. Equilibrio de temperatura

El pH se ajustó a 10 a temperatura ambiente con una solución de NaOH 5M. Tras haber ajustado el pH, se filtró a presión reducida colocando un papel filtro en un embudo de Büchner, a lo recuperado se le agregó etanol al 96% a un volumen de 3:1 (habiendo comenzado con 100 ml se le añadieron 300 ml).

Se dejó en reposo 24 horas y se realizó un proceso de centrifugación a la solución donde una vez obtenido todo el precipitado, éste se lavó 3 veces con agua destilada para eliminar el etanol y el hidróxido de sodio. Después se guardó en tubos y se metió a congelar para posteriormente secar por liofilización.

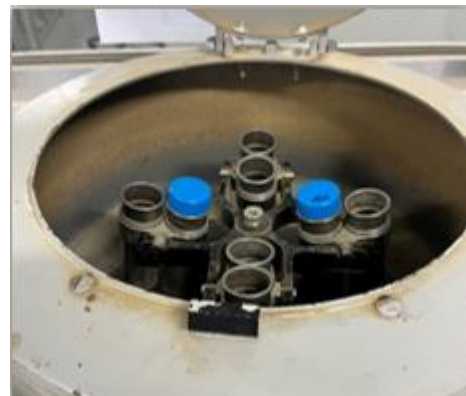


Figura 7. Centrifugación

- Degradación con Peryodato de sodio

Quitano: de acuerdo con el método de Yunpeng Cai, para el quitano de peso molecular bajo se preparó una solución de 100 ml de ácido acético al 2% (agua destilada), a éste se añadieron 3.8 gr de QPMB (2.5 mmol) se dejó en agitación magnética por 24 horas para lograr la completa disolución. Posteriormente, se inició la oxidación con peryodato, se pesaron 0.54 gr de peryodato de sodio (2.5 mmol) y se disolvió en 5ml de agua destilada. La reacción debe mantenerse en obscuridad y realizarse de manera controlada por lo que se cubrió la solución de quitano con aluminio y se le añadió por goteo. Se dejó reaccionar por 2 horas.

Una vez cumplidas las dos horas, se añadió 1 ml de etilenglicol para detener la reacción y se dejó en agitación una hora más. Al finalizar se guardó en tubos para meter a congelar y luego secar por liofilización.

Ácido hialurónico: Se disolvió 1 gr de ácido hialurónico (2.5 mmol) en 100 ml de agua destilada para iniciar su degradación y se dejó 24 horas en agitación. Posterior a la disolución se inició la reacción de oxidación. Se envolvió el vaso con aluminio para que éste estuviera en oscuridad, se pesaron 0.54 gr de peryodato de sodio (2.5 mmol) y se disolvió en 5ml de agua destilada; se le añadió por goteo a la solución de ácido hialurónico y se dejó reaccionar por 2 horas. Esto para que las moléculas de peryodato puedan efectuar con la oxidación y por la luz no se rompan enlaces que dañen o deterioren el proceso o reacción de oxidación.

Una vez cumplidas las dos horas se añadió 1ml de etilenglicol para detener la reacción, se dejó en agitación por una hora más y al finalizar se guardó en tubos para meter a congelar y luego secar por liofilización.

II.II.II. Preparación de películas

Se llevaron a cabo 2 pruebas de solubilidad antes de la caracterización. En la primera prueba con lo obtenido del método de peryodato se prepararon películas; disolviendo 50 mg de ambos en 5 ml y se metieron a un horno de vacío a 60 inHg, tras 24hrs se retiró y a las películas obtenidas se les hizo una prueba de solubilidad, esto quiere decir que si la película se disolvía en el agua destilada se cumplía el objetivo de ser soluble.



Figura 8. Películas de pruebas de solubilidad

Se repitió con el otro método realizado con H₂O₂, verificando así la capacidad o diferencia de solubilidad de ambos métodos. Para la segunda prueba se realizó una combinación de lo obtenido

del ácido hialurónico con el quitosano para cruzar ambos materiales, donde usando 25 mg en 2.5 ml de agua destilada de cada uno siendo un total de 50 mg y 5 ml; algo que no se esperaba era que ambos tuvieran cargas opuestas por lo que cruzar sus partículas de esta manera no fue posible, de manera alternativa se decidió realizar este cruce de dos maneras diferentes.

Para poder tener una película que tuviera ambos componentes, se realizaron más películas de QPMM y

QPMB (50 mg en 5 ml de agua destilada) pues con éstas se realizó una prueba donde:

- Películas de QPMM y QPMB se cubrieron por completo en una disolución de AH (50 mg en 5 ml) en un molde para después meter en un horno a vacío y 60 °C obtener otra película.

- Películas de QPMM y QPMB se dejaron expandir en agua destilada por 1 minuto para después cubrirlas en un molde con una disolución de AH (50 mg en 5 ml) para después meter en un horno a vacío y 60°C, la diferencia con el anterior método es que al expandirse la película de quitosano se permite que el AH se abra paso en las capas de la película y pueda existir una mejor adición.

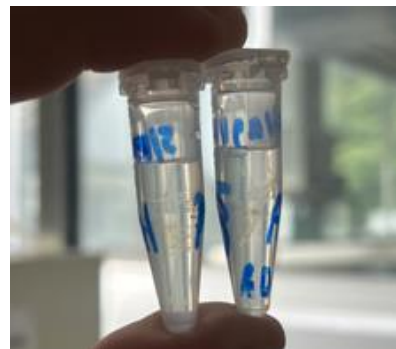


Figura 9. Películas cubiertas en ácido hialurónico

III. RESULTADOS

III.I. Yodo encontrado en la post-liofilización

De los quitosanos oxidados con peryodato se observó que, con el paso del tiempo, el contenido de los tubos comenzó a degradarse, a pesar de haber agregado el etilenglicol que indica el método de Cai, tal parece que no detuvo el proceso oxidativo del peryodato y es posible que continuara, en un proceso muy lento, oxidándose.



Figura 10. Efecto del peryodato en el quitosano

La figura 10 muestra el cambio de coloración de los productos obtenidos. También se notó que al abrir los tubos éste olía a yodo, claro este siendo un resultado alterno a lo buscado se puede decir que, al igual que la povidona yodada que es usada en cirugías, con lo obtenido tenemos ya un común desinfectante antimicrobiano combinado con nuestros oligómeros.

III.II. Pruebas de solubilidad

Se pudo observar una pequeña diferencia entre el quitosano de un tono color “amarillo” a diferencia del que parecía tener un exceso de yodo; tenían una viscosidad diferente, al disolverse un tono diferente y al retirar las películas del horno las que tenían el exceso de yodo se quebraban fácilmente, probablemente porque al continuar la degradación las cadenas quedaron más pequeñas y esto no permite la formación de una película continua.



Figura 11. Películas de quitosano (izquierda) y ácido hialurónico (derecha)

III.II. Caracterización

Para la espectroscopía FTIR están a continuación las gráficas de quitosano de peso molecular bajo, medio y el ácido hialurónico. De acuerdo con las variables utilizadas, sugiriendo una reproducibilidad fiable en el método de síntesis y caracterización implementados, a continuación, se presentan los resultados de caracterización.

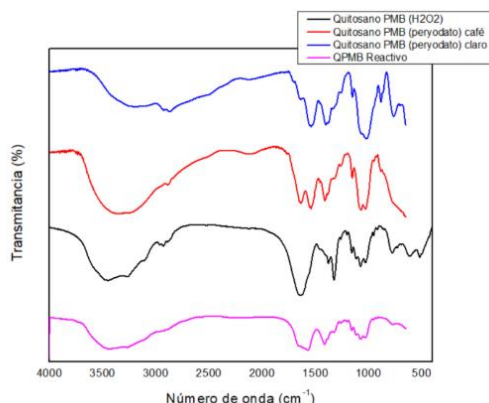


Figura 12. FTIR de quitosano de peso molecular bajo

A simple vista, podrían verse pequeños picos de transmitancia característicos de ciertos grupos funcionales específicos en los oligómeros, analizando los oxidados (color) negro, rojo y azul) en la región de los 3,200-3000 cm⁻¹ posibles vibraciones de estiramiento O-H o N-H, en la región de los 2,900 cm⁻¹ pequeñas vibraciones C-H, por los 1,200-1100 cm⁻¹ bandas características de C-O o C-N y posiblemente un pico en los 1,700 cm⁻¹ de C=O.

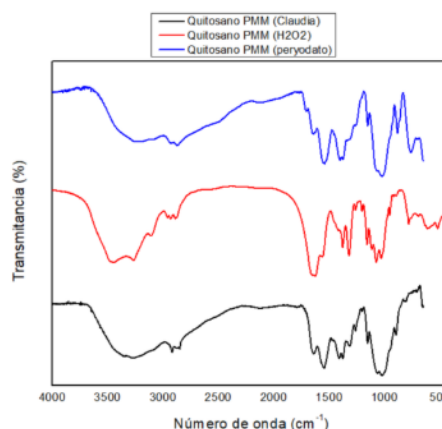


Figura 13. FTIR de quitosano de peso molecular medio

Para el FTIR del quitosano de peso molecular medio se pueden observar en la región de los 3100-3000 cm⁻¹ vibraciones de estiramiento O-H y/o N-H, también por la región de los 1700 cm⁻¹ grupos de carbonilos.

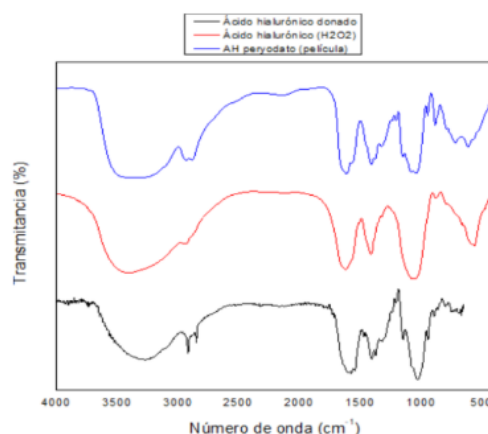


Figura 14. FTIR del ácido hialurónico

Para el FTIR del ácido hialurónico, en la región de los 3000 cm⁻¹ posiblemente un estiramiento de C-H, por los 1600 cm⁻¹, un estiramiento C=O tal vez y en los 1000 cm⁻¹ Un estiramiento C-O.

III.III. Curva de calibración de aldehídos

Para determinar la cantidad de aldehídos en la muestra se realizó la prueba colorimétrica con Purpald. Se construyó una curva de calibración con formaldehído con concentraciones de 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 y 6 ppm. Realizando la regresión lineal se obtuvo el valor de R igual a 0.9896 y del intercepto igual a 0.0182.

Posteriormente a esta curva, se realizó la prueba con los materiales obtenidos (quitosano de peso molecular medio,

quitosano de peso molecular bajo y ácido hialurónico) del método de peryodato y se obtuvieron estos datos.

Muestra	Volumen (μl)	Abs (550nm)	Conc. Aldehídos (ppm)	Conc. final de aldehídos (ppm)
AH PY	100	0.1369	1.23	12.3
QPMB PY	1000	0.0623	0.56	0.56
QPMB PY	1000	0.1094	0.99	0.99

Tabla 1. Concentraciones de aldehídos en las muestras

IV. DISCUSIÓN

- Quitosano

Los resultados obtenidos en el presente estudio sobre los oligómeros de quitosano muestran concordancia con hallazgos previos reportados por Sukmark et al. (2011), quienes evaluaron la actividad de oligómeros y polímeros de quitosano derivados de diferentes fuentes marinas contra patógenos transmitidos por alimentos. En su investigación, se destacó la eficacia del quitosano oligomérico proveniente de calamar contra *Vibrio parahaemolyticus*, además de mostrar actividad moderada frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp.

Estas bacterias representan un amplio espectro de patógenos tanto Gram positivos como Gram negativos, lo que sugiere una acción antimicrobiana versátil del oligómero de quitosano. En nuestro caso, el oligómero de quitosano preparado a partir de peryodato de sodio y peróxido de sodio también demostró actividad antimicrobiana de acuerdo al artículo. Dado que el mecanismo de acción del quitosano se basa en su interacción electrostática con la membrana celular bacteriana, que conduce a la desestabilización de la pared celular y posterior lisis, es razonable inferir que este mecanismo puede mantenerse activo frente a bacterias similares a las reportadas en el estudio de Sukmark.

- Ácido hialurónico

Para la actividad antimicrobiana del ácido hialurónico (AH) los hallazgos coinciden con lo reportado por diversos autores que han documentado propiedades antimicrobianas del AH, particularmente cuando se formula como hidrogel o se combina con otros compuestos terapéuticos. En el estudio de comparación entre ácido hialurónico y miel de abeja en la mucosa de cobayos (Revista Estomatológica Herediana, 2024), se evidenció que el AH contribuye a la reducción de la carga bacteriana y favorece la cicatrización, lo cual fue atribuido a su capacidad para formar una barrera física que limita la colonización bacteriana, además de sus propiedades bioadhesivas y moduladoras del microambiente tisular.

Asimismo, investigaciones desarrolladas por i+Med han demostrado que hidrogeles de ácido hialurónico entrecruzado cargados con antibióticos como cefuroxima, tetraciclina y amoxicilina presentan una liberación sostenida y actividad antimicrobiana efectiva contra *Staphylococcus aureus*, lo que posiciona al AH como una matriz versátil para aplicaciones terapéuticas. Aunque el

ácido hialurónico por sí solo no posee una potente actividad bactericida directa, su utilidad radica en su capacidad para mejorar la eficacia de otros compuestos y modificar el entorno biológico para inhibir el desarrollo microbiano.

V. CONCLUSIONES

El objetivo de la investigación se basó en la preparación y obtención de oligómeros de quitosano a partir de la degradación oxidativa del mismo para posteriormente ser implementado en mezclas poliméricas de ácido hialurónico con el fin de encontrar nuevas aplicaciones en la medicina regenerativa; se busca la aplicación potencial de dichos resultados como un sustituto dérmico. Se cumplieron satisfactoriamente los objetivos planteados, pues se llevó a cabo el desarrollo y síntesis de los oligómeros de quitosano con las características y parámetros controlados y apegados a la metodología utilizada (Tao Sun y Cai), la cual se centra en la degradación oxidativa del quitosano.

La metodología ha demostrado ser muy efectiva pues en ambas existe una oxidación, sin embargo, el método de Cai con el peryodato de sodio obtuvo mejores resultados; una observación durante la investigación fue la relación entre el tiempo de exposición de los oligómeros de quitosano en el baño de agua a 80°C y el rendimiento de la obtención; comprobé que en un tiempo de exposición menor resulta en que se obtiene una mayor cantidad de oligómeros. Otro de los aspectos fue la precisión en los volúmenes de los reactivos; así como el control del pH donde todas las pruebas debían ajustarse de un valor ácido (aproximadamente entre 3 – 4) al valor básico de 10; esta etapa implicó hacer pruebas para el lograr equilibrar el pH; sin embargo, durante el desarrollo de las muestras se presentaron fluctuaciones muy abruptas del NaOH cada vez que se agregaba una nueva proporción a la solución, lo que requería estar en agitación constante para su estabilización. De estos desafíos entendí la importancia de tener un monitoreo regular y controlado de las condiciones de reacción, registrar los resultados y tiempos de reacción, síntesis, etc., para ajustar los parámetros del proceso en cada prueba. En la etapa de caracterización comprendí mucho mejor el comportamiento y propiedades de los oligómeros de quitosano y las mezclas poliméricas; se usaron distintas técnicas de caracterización, y además de los aspectos que mencioné anteriormente, aprender a utilizar e interpretar los equipos de caracterización es también una faceta importante en la formación científica. Se amplió mi conjunto de competencias gracias al manejo de equipos de caracterización como fueron: FTIR y RAMAN.

Cabe destacar que aún queda mucho por definir y mejorar del material, así mismo es necesario realizar las pruebas de hemocompatibilidad las cuales aún no se ha decidido si se mandará a Ciudad de México para verificar o se probará con las muestras que se encuentran en el CICY. De la misma forma la prueba experimental con pacientes con heridas de quemaduras o heridas en las epidermis no tan profundas, claro que se hará una selección de la población

que cumpla las características, que también deben ser definidas, y verificar su proceso de curación y cicatrización.

REFERENCIAS

- [01] Tomás, A., Villermo, A. (2020) Proyecto Final de Ingeniería Química, obtención de oligómeros de quitosano a partir de crestas de gallo. Facultad de Química, Departamento de Ingeniería Química, Universidad Tecnológico Nacional.
- [02] Mary C., James Mc. (2015) The content and size of hyaluronan in biological fluids and tissues. *Frontiers in immunology*.
- [03] Shital D., Sachin S. (2018) Extraction, purification, and characterization of hyaluronic acid from rooster comb. *Applied Natural Science Foundation*.
- [04] C. Lárez Velásquez, “Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro,” 2006. [Online]. Available: www.saber.ula.ve/avancesenquimica.
- [05] M. Rinaudo, “Chitin and chitosan: Properties and applications,” *Prog Polym Sci*, vol. 31, no. 7, pp. 603–632, Jul. 2006, doi: 10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2006.06.001.
- [06] A. T. Rodríguez-Pedroso, ; M A Ramírez-Arrebato, L L Barrera-Necha, and ; S Bautista Baños, (2017) “Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos. vol. 15, no. 3, pp. 307–317.
- [7] Liu, X., Yang, S., & Xu, Y. (2018). Periodate oxidation of chitosans with different chemical compositions. *Carbohydrate Polymers*, 181, 1096-1103. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.022>
- [8] Zhao, J., Jiang, T., & Wang, Y. (2020). A hyaluronic acid-based hydrogel enabling CD44mediated chondrocyte binding and gapmer oligonucleotide release for modulation of gene expression in osteoarthritis. *Biomaterials*, 230, 119615. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.119615>