

## BIOACTIVIDAD *in vitro* DE MATERIALES COMPUESTOS DE QUITOSANA/POLI(DL-LÁCTIDO)

### *In vitro* BIOACTIVITY OF CHITOSAN/POLY(DL-LACTIDE) COMPOSITES

S.A. Martel-Estrada<sup>1\*</sup>, I. Olivas-Armendáriz<sup>2</sup>, C.A. Martínez-Pérez<sup>2</sup> y J.G. Chacón-Nava<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Instituto de Arquitectura, Arte y Diseño. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Av. Del Charro 450 Norte, Col. Universidad, C.P. 32310, Cd. Juárez, Chihuahua, México.*

<sup>2</sup>*Instituto de Ingeniería y Tecnología, Universidad Autónoma de Cd. Juárez, Av. Del Charro 450 Norte, Col. Universidad, C.P. 32310, Cd. Juárez, Chihuahua, México.*

<sup>3</sup>*Centro de Investigación en Materiales Avanzados, Departamento de Materiales Compuestos, Miguel de Cervantes 120, Complejo Industrial Chihuahua, C.P. 31109, Chihuahua, México.*

Recibido 5 de Marzo 2012; Aceptado 27 de Septiembre 2012

#### Resumen

Sopores de materiales compuestos porosos de diferentes concentraciones de quitosana/poli(DL-láctido) fueron fabricados por separación de fases inducida térmicamente y liofilización para aplicación en ingeniería tisular. La bioactividad *in vitro* de los soportes fue evaluada analizando las capas de apatita producidas después de sumergir los soportes en un fluido fisiológico simulado como medio de incubación. La interacción entre los grupos funcionales del material compuesto fue analizado por medio de calorimetría por barrido diferencial. La formación de apatita fue analizada usando espectroscopía de infrarrojo por Transformada de Fourier, microscopía electrónica de barrido por emisión de campo acoplada a un sistema de espectrometría por energía dispersiva y difracción por rayos X. Los resultados acumulativos de estas pruebas sugieren que los materiales compuestos desarrollados podrían tener aplicaciones potenciales en ingeniería tisular.

**Palabras clave:** quitosana, poli(DL-láctido), apatita, bioactividad, separación de fases térmicamente inducida.

#### Abstract

Porous composites scaffolds of different concentration of chitosan/ Poly(DL,lactide) were fabricated for tissue engineering applications by thermally induced phase separation and lyophilization techniques. The *in vitro* bioactivity evaluation of the scaffolds was carried out by analyzing the apatite layers produced on them using Simulated Body Fluid (SBF) as incubation medium. The interaction between functional groups in the composite was analyzed using differential scanning calorimetry. The apatite formation was analyzed using FTIR spectroscopy, Field Emission Scanning Electron Microscopy coupled to energy-dispersive electron X-ray spectroscopy and X-ray diffraction. The cumulative results obtained from IR spectra and SEM-EDS, suggest that the developed composites might have potential applications in tissue engineering.

**Keywords:** chitosan, poly(DL-lactide), apatite, bioactivity, thermally induced phase separation.

## 1 Introducción

El principal constituyente del hueso es el fosfato de calcio. Esta sustancia es similar en composición y estructura a los minerales en el grupo de apatita (Wopenka y col., 2005). La hidroxiapatita ha sido considerada uno de los principales constituyentes del

hueso y de la parte mineralizada del cartílago (Vallés y col., 2009). Los materiales biocompatibles forman en su superficie una capa de carbonato contenido hidroxiapatita que es similar a la apatita del hueso, la cual *in vivo* se une al hueso (Oliveira y col., 2009). Debido a esta propiedad, este tipo de materiales han

\*Autora para la correspondencia. E-mail: mizul@yahoo.com; adriana.martel@uacj.mx  
Tel. (52-656)-688-4820 Ext. 4635, Fax (52-656)688-4820

sido ampliamente investigados para aplicaciones en ingeniería tisular (Lukito y col., 2005).

La bioactividad puede ser inducida en superficies bioinertes, por la formación de grupos funcionales o por la formación de fases cerámicas que tienen el potencial de producir grupos funcionales cuando son expuestos al medio ambiente del cuerpo (Leonor y col., 2008). El proceso de formación de hidroxiapatita en materiales bioactivos puede ser reproducido en un fluido fisiológico simulado (SBF, por sus siglas en inglés), que es capaz de predecir la bioactividad *in vivo* (Kokubo y col., 2006). El fluido fisiológico simulado ha sido utilizado en diferentes concentraciones, incluyendo 1X hasta 5X (Kong y col., 2006; Varma y col., 1999; Mohamed y col., 2008). Su ventaja principal es que es un método biomimético que no requiere equipo especial o procesos de alta temperatura para producir una capa de hidroxiapatita. Las propiedades de esta capa pueden afectar la viabilidad y proliferación celular (Kong y col., 2006). El proceso de formación de apatita requiere consumo de iones de calcio y fósforo de los alrededores del fluido corporal. El fosfato de calcio usa iones de OH<sup>-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Mg<sup>2+</sup> de la solución simulada hasta que cristaliza en hidroxiapatita (Vallés y col., 2009). En esta investigación fue utilizada la solución simulada a una concentración de 1.5X ajustada a 7.40 pH y 36.5° C. Además las muestras fueron preparadas utilizando tetraetilortosilicato (TEOS) de acuerdo a un procedimiento establecido previamente (Olivas-Armendáriz y col., 2009).

De acuerdo con investigaciones previas, el uso de la quitosana en la ingeniería tisular tiene algunas limitaciones, entre ellas que muestra pérdida de bioactividad (Leonor y col., 2008; Kong y col., 2006). La quitosana es uno de los polímeros más prometedores debido a sus excelentes propiedades de biodegradabilidad, biocompatibilidad, incluso es antibacteriana y no tóxica (Olivas-Armendáriz y col., 2009; Duan y col., 2006). Es un polisacárido compuesto de glucosamina y unidades de N-acetil glucosamina unidas por un enlace  $\beta$  (1-4) glicosídico (Becerra-Bracamontes y col., 2009; Huang y col., 2007). Por otro lado, el Poli(DL-láctido) (PDLLA) es un polímero que ha sido ampliamente estudiado para aplicaciones ortopédicas debido a su alta estabilidad mecánica, así como a su biocompatibilidad *in vivo* y a que posee un buen potencial osteoconductivo (Rezwan y col., 2006).

A pesar de los múltiples estudios realizados sobre estos polímeros, aún no se ha reportado la bioactividad de un material compuesto de quitosana y PDLLA. Wu

y col., (2008) realizaron una investigación utilizando estos polímeros, pero no evaluaron su bioactividad y su método de preparación era distinto al propuesto en la presente investigación, ya que involucraba un proceso de extracción de solvente previa a la liofilización, puesto que utilizaban acetona para el láctido; además, involucraba una extracción de la parte láctica. Por el contrario, en esta investigación se utilizó cloroformo debido a que tiene un punto de fusión más alto que la acetona, lo que permitió procesar el material, sin este tipo de extracciones.

De acuerdo con las características anteriormente mencionadas, es razonable creer en la bioactividad de un material compuesto de quitosana/PDLLA. Por lo tanto, en este estudio, diferentes concentraciones de compuestos, biodegradables y biocompatibles de quitosana/PDLLA fueron desarrollados a través del método de separación de fases térmicamente inducida. Estos materiales compuestos fueron utilizados para investigar la bioactividad *in vitro* de los soportes analizando las capas de hidroxiapatita producidas en ellos por medio del uso de un fluido fisiológico simulado como medio de incubación. La formación de apatita fue analizada utilizando espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier, microscopía electrónica de barrido por emisión de campo, espectrometría por energía dispersiva y difracción por rayos X. Además, se realizó un estudio de calorimetría por barrido diferencial para verificar las interacciones entre los dos compuestos.

## 2 Metodología

### 2.1 Preparación de los materiales compuestos

Los soportes de los materiales compuestos de quitosana/poli(DL-láctido) (Ch/PDLLA) en diferentes composiciones, 70/30, 50/50 y 30/70 fueron desarrollados a través de la técnica de separación de fases térmicamente inducida, a través de una metodología desarrollada previamente (Martel y col., 2010). Brevemente se elaboró una solución de PDLLA al 5 % (%w/v) en cloroformo. Esta solución se agregó por goteo a una velocidad de 10  $\mu$ L/min aproximadamente a una solución de quitosana al 2% (%w/w) disuelta previamente en una solución de ácido acético al 1%. Después de que la solución de PDLLA se agregaba completamente, se permitía que la composición se agitara durante una hora a 40° C, seguida de 10 minutos de baño en ultrasonido para

eliminar burbujas de la mezcla. Posteriormente, cada material compuesto era inmediatamente congelado en hielo seco (-78° C) por un tiempo determinado (3 ó 6 horas), para evitar una separación de fases prematura. El solvente fue extraído por un sistema de liofilización Labconco FreeZone 2.5. Los materiales compuestos fueron neutralizados por inmersión en etanol a -20° C durante 12 horas, y posteriormente, por una inmersión en NaOH-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH en solución acuosa (preparada utilizando etanol al 80 % previamente mezclado con un 0.5(w/w%) de NaOH) a la misma temperatura. Entonces, las muestras se lavaron con abundante agua destilada por lo menos 5 veces y se volvieron a liofilizar para extraer la humedad residual.

## 2.2 Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier

Para realizar la caracterización química de los soportes se utilizó un espectrómetro FTIR-ATR Nicolet 6700. Cada muestra seca fue utilizada sin ninguna preparación especial para las pruebas de espectroscopía por Transformada de Fourier. Todos los espectros fueron registrados utilizando una resolución de 100 escaneos y 16 cm<sup>-1</sup>.

## 2.3 Caracterización por calorimetría por barrido diferencial

Las mediciones por calorimetría por barrido diferencial fueron llevadas a cabo en un instrumento Netzsch DSC 200 PC (Alemania). Con la finalidad de borrar el historial térmico de todas las muestras primeramente fueron calentadas desde temperatura ambiente hasta 260° C a 20°C/min. Posteriormente, fueron enfriadas desde 260°C hasta -20°C a la misma temperatura a una velocidad de 20°C/min. Finalmente, fueron calentadas desde -20° C hasta 260°C a 10°C/min en una atmósfera de nitrógeno.

## 2.4 Caracterización de la morfología y bioactividad *in vitro*

Antes de someter los materiales compuestos a la solución SBF 1.5X, se les dio una preparación de superficie. Cada muestra de aproximadamente 10 mm x 5 mm x 5 mm, se sumergió en 5 ml tetra-etiloortosilicato (TEOS) durante 2 horas a 60° C. Una vez transcurrido este tiempo se lavaron con alcohol etílico y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Para los estudios de bioactividad, las muestras previamente tratadas se colocaron en 5 mL SBF

1.5X con un pH de 7.40, durante cierto periodo de tiempo medido en semanas a 37° C. Los periodos de observación fueron 7, 14, 21 y 28 días. Cada dos días se cambiaba la solución SBF para que fuera refrescada de iones. Cuando un intervalo de tiempo se cumplía, las muestras se removían de sus recipientes. Se lavaban con suficiente agua destilada y se ponían a secar al vacío a 30° C por una semana como mínimo.

Un microscopio electrónico de barrido por emisión de campo, acoplado a un sistema de espectrometría por energía dispersiva fue usado para observar la morfología y detectar la concentración de calcio y fósforo en la superficie después del tratamiento con el fluido fisiológico simulado. La relación CA/P fue estimada para cada material compuesto.

Los patrones de difracción por rayos X de la capa formada en la superficie del material fueron analizados entre 2θ = 10° y 2θ = 80° con un paso de 2θ = 0.02° en un instrumento de difracción de rayos X en un modo continuo (PANalytical X'Pert PRO), con la finalidad de verificar la presencia de picos que confirmaran la presencia de calcificaciones.

## 2.5 Materiales

La quitosana fue comprada en Carbomer, Inc (Estados Unidos). El Poli(DL, láctido) con una viscosidad inherente de 0.34 dL/g en CHCl<sub>3</sub> fue adquirido en Lactel (Estados Unidos). Los solventes utilizados fueron etanol y cloroformo (CTR Scientific, México) y ácido acético glacial (Mallinckrodt, Estados Unidos).

También fue utilizado fosfato ácido de sodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), Tris(Hidroximetil) amino metano (NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>), tetraetiloortosilicato (TEOS) y fosfato diácido de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) que fueron obtenidos de SIGMA (Monterrey, México); hidróxido de sodio (NaOH), cloruro de sodio (NaCl), carbonato ácido de sodio (NaHCO<sub>3</sub>), cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O), sulfato de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) y cloruro de potasio (KCl) adquiridos de Fisher-Scientific (Monterrey, México).

## 3 Resultados y discusión

Mediante el análisis de los espectros de infrarrojo, fueron visualizados algunos cambios en los picos característicos de las sustancias. En la Fig. 1 a y b, se muestra el espectro de infrarrojo de la quitosana, PDLLA y los materiales desarrollados a partir de estas sustancias a diferentes rangos de número de

onda. El espectro de la quitosana muestra las bandas características en  $1570\text{ cm}^{-1}$ , que puede ser asignada a la vibración de flexión N-H (amida II), el pico en  $1650\text{ cm}^{-1}$  corresponde al modo de estiramiento C=O (amida I) (Fig. 1a), y el pico en  $1380\text{ cm}^{-1}$  (Fig. 1b) es del modo de estiramiento -C-O del grupo primario de alcohol en la quitosana. La banda en  $1034\text{ cm}^{-1}$  sugiere la presencia de un grupo éter. Además el espectro muestra los picos atribuidos a la estructura sacárida en  $1150\text{ cm}^{-1}$  y  $897\text{ cm}^{-1}$  (Fig. 1b).

El espectro PDLLA muestra las principales bandas de este láctido en  $2924\text{ cm}^{-1}$ ,  $3447\text{ cm}^{-1}$ ,  $3862\text{ cm}^{-1}$  que corresponden al estiramiento OH, grupo final, mientras que los picos en  $751\text{ cm}^{-1}$  y  $866\text{ cm}^{-1}$  pueden ser atribuidos al modo de flexión CH. Otra banda intensa es localizada en  $1752\text{ cm}^{-1}$  (Fig. 1a) que corresponde al estiramiento C=O del poliláctido. Además, la banda en  $1453\text{ cm}^{-1}$  es atribuida a las vibraciones del grupo  $\text{CH}_3$ . Los picos de absorción de las vibraciones de estiramiento =C-O están localizadas en  $1050\text{ cm}^{-1}$ ,  $1089\text{ cm}^{-1}$ ,  $1126\text{ cm}^{-1}$  y  $1188\text{ cm}^{-1}$  (Fig. 1b).

La banda N-H fue afectada y desplazada desde 1570 cm<sup>-1</sup> hasta 1543 cm<sup>-1</sup>, 1542 cm<sup>-1</sup> y 1543 cm<sup>-1</sup>(Fig. 1a), respectivamente para los materiales compuestos 70/30, 50/50 y 30/70. Por otro lado, el pico que corresponde a los grupos primarios de alcohol (estiramiento -C-O) se desplazó desde 1380 cm<sup>-1</sup> a 1397 cm<sup>-1</sup>, 1393 cm<sup>-1</sup> y 1394 cm<sup>-1</sup> (Fig. 1b) para los materiales compuestos 70/30, 50/50 y 30/70 respectivamente. El espectro muestra una banda pronunciada en 1752 cm<sup>-1</sup> que corresponde al enlace C=O del poli(DL-láctido) pero ligeramente desplazado a la derecha y con una intensidad reducida para las composiciones 70/30 (1743 cm<sup>-1</sup>), 50/50 (1744 cm<sup>-1</sup>) y 30/70 (1749 cm<sup>-1</sup>) (Fig. 1b).

La quitosana es un polímero semicristalino debido a sus fuertes enlaces moleculares de hidrógeno inter e

intra moleculares (Wu y col., 2008). Esta es la razón por la que es difícil encontrar una Tg a través de los métodos de calorimetría por barrido diferencial (DSC, por sus siglas en inglés). No obstante, fue posible encontrar la Tg para el PDLLA y los materiales compuestos Ch/PDLLA. La Tg encontrada a través de este análisis fue 45.3°C, 42.1°C 35.6°C y 39.9° C para los compuestos 70/30, 50/50, 30/70 Ch/PDLLA y el PDLLA, respectivamente.

Todos los eventos anteriormente descritos sugieren una interacción entre el grupo amino de la quitosana y los grupos carboxilo del poli(DL-láctido) en la mezcla. Resultados similares fueron reportados por Wan *y col.* (2007) y Niu *y col.* (2009) en sus estudios de ácido poliláctico/quitosana y poliláctido/quitosana, respectivamente. Durante sus investigaciones, ellos encontraron que es posible que existan enlaces de hidrógeno formados entre los grupos amino de la quitosana y los grupos carboxilos del DL láctido o los grupos hidroxilos de la quitosana y los carboxilos del DL láctido.

Es importante mencionar que durante este estudio, los materiales compuestos mostraron una estructura que consistía principalmente de planos profundos del soporte y pocos poros en la superficie. La formación de poros menores a  $100 \mu\text{m}$  fue considerablemente mayor conforme disminuía la cantidad de quitosana en el soporte, aunque en general se trató de superficies altamente porosas. El tamaño de poro y la porosidad obtenida se muestra en la Tabla 1.

Como se señaló anteriormente, la bioactividad puede ser inducida en superficies bioinertes ya sea por la formación de grupos funcionales o por la formación de capas de fases cerámicas que tengan el potencial de formar grupos funcionales, tales como Ca-P, cuando sean expuestos al medio ambiente del cuerpo (Leonor y col., 2009).

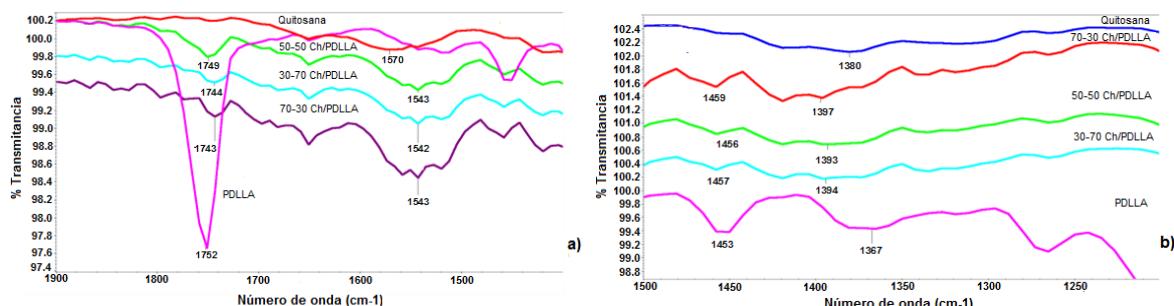


Fig. 1. Espectros de la quitosana, PDLLA y los materiales compuestos a) de 1400 a 1900  $\text{cm}^{-1}$  y b) de 1000 a 1500  $\text{cm}^{-1}$ .

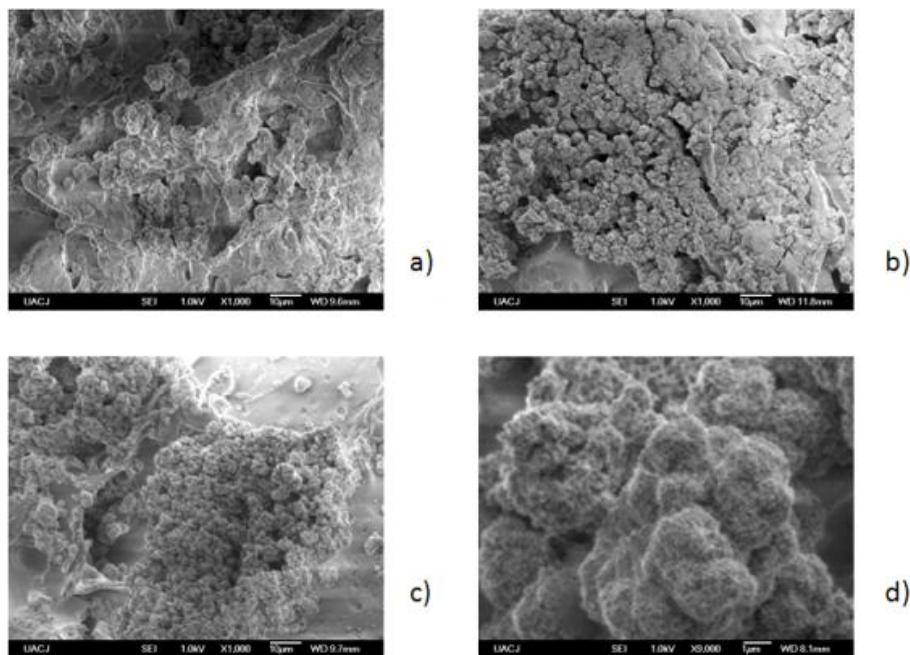


Fig. 2. Mineralización producida en los materiales compuestos a) 70/30 Ch/PDLLA, b) 50/50 Ch/PDLLA y c) 30/70 Ch/PDLLA a los 28 días, adicionalmente se muestra el compuesto d) 30/70 Ch/PDLLA a los 21 días.

Tabla 1. Distribución de tamaño de poro y porosidad de los materiales compuestos

	Tamaño de poros	Porosidad	1-10 $\mu\text{m}$	10-100 $\mu\text{m}$	> 100 $\mu\text{m}$
Quitosana	$\leq 506 \mu\text{m}$	81 %	22.95 %	44.26 %	32.79 %
70/30	$\leq 948 \mu\text{m}$	84 %	49.26 %	30.82 %	19.92 %
50/50	$\leq 457 \mu\text{m}$	65 %	41.28 %	51.60 %	7.12 %
30/70	$\leq 1721 \mu\text{m}$	82 %	42.64 %	40.48 %	16.88 %

La Fig. 2 muestra las típicas estructuras de hidroxiapatita a los 28 días de cultivo en la solución del fluido fisiológico simulado (Vallés y col., 2009), las cuales son aglomerados que forman una capa continua en forma de coliflores compuestas por esferas de 1 a 3  $\mu\text{m}$ . La Fig. 2c muestra la imagen correspondiente al material compuesto 30/70. A mayores amplificaciones, se pueden ver más capas superpuestas a los agregados originales en forma de pequeños racimos de uva, que sugieren la existencia de sitios de nucleación secundaria para formación adicional de apatita en el compuesto 30/70 pero a los 21 días.

Por otro lado, los perfiles de espectrometría por energía dispersiva (EDS, por sus siglas en inglés), muestran que estas capas corresponden a formaciones de Ca y P en la superficie del polímero, como se puede ver en la Fig. 3. No obstante, estos perfiles señalaron relaciones Ca/P de 1.14, 1.68 y 1.85 a los 28 días para los materiales 70/30 Ch/PDLLA, 50/50 Ch/PDLLA

y 30/70 Ch/PDLLA respectivamente. Es importante considerar que estas relaciones son congruentes con lo que pudo ser observado en las imágenes de SEM en donde se aprecian las aglomeraciones calcificadas sobre la superficie y dentro de los poros de la muestra. Este resultado coincide con investigaciones previas que sugieren que poros de 1  $\mu\text{m}$  y menos juegan un rol importante en la bioactividad (Sánchez-Salcedo y col., 2009).

Los resultados de SEM fueron confirmados por el análisis de los espectros de infrarrojo de los materiales compuestos. Utilizando el Principio de Superposición de ondas, para este análisis, se desarrollaron operaciones matemáticas con los espectros obtenidos, con la finalidad de que las bandas correspondientes a las clasificaciones fueran más visibles. Es decir, a los espectros obtenidos para las muestras con el tratamiento del fluido fisiológico simulado, se restó el espectro original sin tratamiento de cada compuesto. De esta manera, los espectros

mostrados en las imágenes sólo corresponden a los picos de los grupos funcionales formados durante la incubación de la muestra. El análisis IR (Fig. 4a) reveló la presencia de enlaces P-O en el modo de estiramiento  $v_3$ , alrededor de  $1046.0\text{ cm}^{-1}$ , así como la banda correspondientes al grupo  $\text{CO}_3^{2-}$  (Fig. 4b), fuera del plano en modo de estiramiento  $1467.6\text{ cm}^{-1}$  (Rinaudo y col., 2006; Wopenka y col., 2005). De acuerdo con la presencia de estas bandas es posible sugerir que se formó apatita carbonatada.

La Fig. 5 muestra los espectros de difracción de la muestra 30/70 Ch/PDLLA antes y después de ser sometida al tratamiento del fluido fisiológico simulado por 7 días. Se puede ver que antes de ser sumergido en la solución, no era obvio ningún pico de absorción para el material compuesto. Una vez sumergido en la solución, son visibles ligeros picos en  $25.1^\circ$ ,  $31.9^\circ$ ,  $32.5^\circ$ ,  $33.8^\circ$  y  $34.3^\circ$  y que son atribuidos a apatita en los planos (002), (211), (112), (302) y (202). A través de la información obtenida de la difracción por rayos

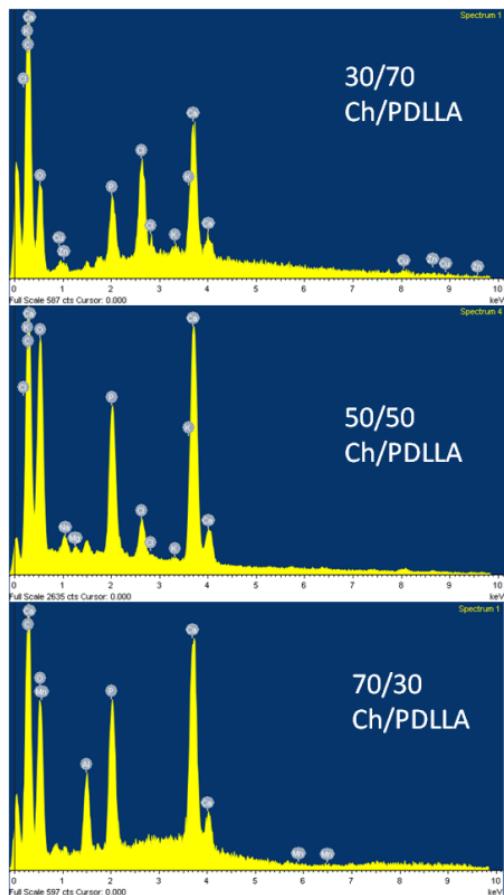


Fig. 3. Perfiles EDS para los materiales compuestos Ch/PDLLA.

X, espectroscopía por infrarrojo y espectrometría por energía dispersiva se puede deducir que se formó una capa de apatita carbonatada (Zhang y col., 2012; Vallés y col., 2009; Lei y col., 2009; Oliveira y col., 2009).

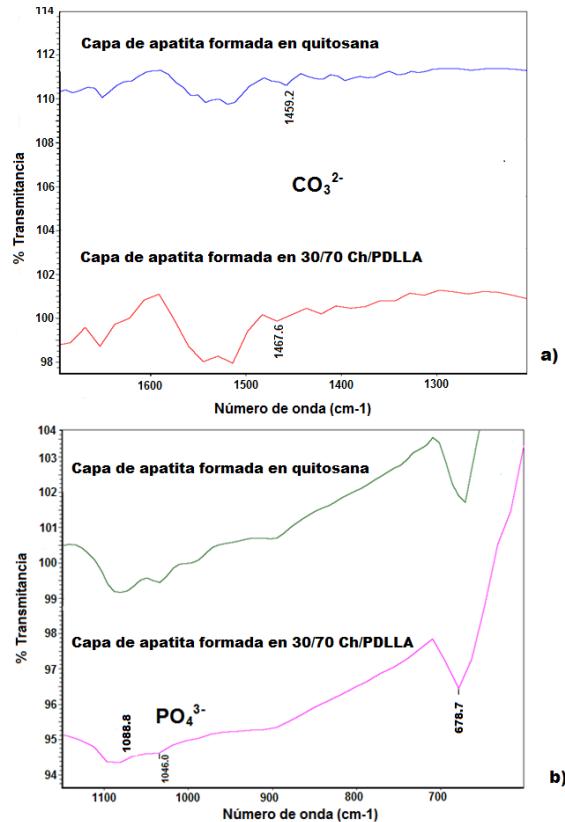


Fig. 4. Espectros de infrarrojo (restando los compuestos originales) mostrando los distintos números de onda en que se presentan los a) enlaces P-O y b) enlaces  $\text{CO}_3^{2-}$  en las muestras calcificadas de los materiales compuestos Ch/PDLLA.

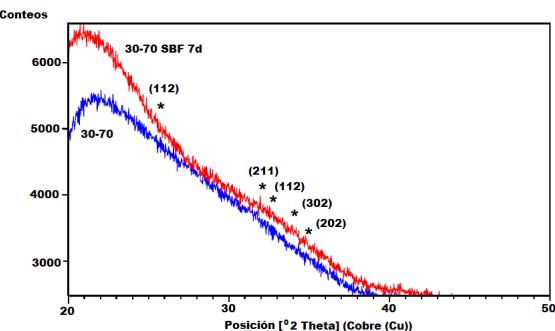


Fig. 5. Espectros de Difracción por Rayos X mostrando ligeros picos atribuidos a la apatita en diferentes planos para el material compuesto 30/70 Ch/PDLLA antes y después de ser sumergido en la solución fisiológica simulada (SBF, por sus siglas en inglés) por 7 días.

## Conclusiones

Se prepararon exitosamente materiales compuestos de quitosana/poli(DL-láctido) a través del método de separación de fases inducida térmicamente utilizando cloroformo como solvente de la parte láctica del compuesto. Además, se encontró una morfología porosa bioactiva que podría ser apropiada para aplicaciones de ingeniería tisular. Los resultados sugieren que los materiales compuestos con un mayor porcentaje de poros menores a 100  $\mu\text{m}$ , forman una mayor nucleación de las capas de apatita carbonatada. La habilidad de los compuestos para formar en su superficie una capa mineralizada fue evidente a través de los resultados acumulativos obtenidos por los espectros de infrarrojo, espectrometría por energía dispersiva y difracción por rayos X.

## Agradecimientos

Los autores desean reconocer y agradecer el financiamiento y apoyo de la Secretaría de Educación Pública y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a través del proyecto Fomix-Gobierno del Estado de Chihuahua CHIH-2010-C01-148041. Además, desean agradecer profundamente el apoyo del M. en C. Christian Chapa durante la caracterización SEM/EDS.

## Referencias

- Becerra-Bracamontes, F., Sánchez-Díaz, J., Arellano-Ceja, J., Gómez-Alvarez, A. y Martínez-Ruvalcaba, A. (2009). Efecto del pH y la concentración del fosfato dibásico de sodio en las propiedades de hinchamiento de hidrogeles de quitosana. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 8, 121-126.
- Duan B., Yuan X., Zhu Y., Zhang Y., Li X., Zhang Y. y Yao K. (2006). A nanofibrous composite membrane of PLGA-chitosan/PVA prepared by electrospinning. *European Polymer Journal* 42, 2013-2022.
- Huang X., Ge D. y Xu Z. (2007). Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization. *European Polymer Journal* 43, 3710-3718.
- Kokubo T. y Takadama H. (2006). How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity. *Biomaterials* 27, 2907-2915.
- Kong L., Gao Y., Lu G., Gong Y., Zhao N. y Zhang X. (2006). A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *European Polymer Journal* 42, 3171-3179.
- Leonor I., Baran E., Kawashita M., Reis R., Kokubo T. y Nakamura T. (2008). Growth of a bonelike apatite on chitosan microparticles after a calcium silicate treatment. *Acta Biomaterialia* 4, 1349-1359.
- Lei, B., Chen, X., Wang, Y. y Zhao, N. (2009). Synthesis and *in vitro* bioactivity of novel mesoporous hollow bioactive glass microspheres. *Materials Letters* 63, 1719-1721.
- Lukito F., Xue J. y Wang J. (2005). *in vitro* bioactivity assessment of 70 (wt.)%SiO<sub>2</sub>-30(wt.)%CaO bioactive glasses in simulated bodyfluid. *Materials Letters* 59, 3267-3271.
- Martel-Estrada S., Martínez-Pérez C., Chacón-Nava J., García-Casillas P. y Olivas-Armendariz I. (2010). Synthesis and thermo-physical properties of chitosan/poly(dl-lactide-co-glycolide) composites prepared by thermally induced phase separation. *Carbohydrate Polymers* 81, 775-783.
- Mohamed, K. R. y Mostafa, A. A. 2008. Preparation and bioactivity evaluation of hydroxyapatite-titania/chitosan-gelatin polymeric biocomposites. *Materials Science and Engineering: C* 28, 1087-1099.
- Niu X, Feng Q, Wang M, Gui X. y Zheng Q. (2009). *in vitro* degradation and release behavior of porous poly(lactic acid) scaffolds containing chitosan microspheres as a carrier for BMP-2-derived synthetic peptide. *Polymer Degradation and Stability* 94, 176-182.
- Olivas-Armendáriz, I., García-Casillas, P., Martínez-Villafañe, A. y Martínez-Pérez, C. 2009. Synthesis and characterization of porous chitosan-polyurethane blends. *Cellular Polymers* 28, 159-172.
- Olivas-Armendáriz, I., García-Casillas, P., Martel-Estrada, A., Martínez-Sánchez, R., Martínez-Villafañe, A. y Martínez-Pérez, C. (2009). Preparación y caracterización de compositos de quitosana/nanotubos de carbono. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 8, 205-211.

- Oliveira A., Costa S., Sousa R. y Reis R. (2009). Nucleation and growth of biomimetic apatite layers on 3D plotted biodegradable polymeric scaffolds: Effect of static and dynamic coating conditions. *Acta Biomaterialia* 5, 1626-1638.
- Rezwan, K., Chen, Q., Blaker, J. y Boccaccini, A. 2006. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27, 3413-3431.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science* 31, 603-632.
- Vallés A., Gallego G. y Monleón P. (2009). Biomimetic apatite coating on P(EMA-co-HEA)/SiO<sub>2</sub> hybrid nanocomposites. *Polymer* 50, 2874-2884.
- Varma H., Yokogawa Y., Espinosa F., Kawamoto Y., Nishizawa K., Nagata F. y Kameyama T. (1999). Porous calcium phosphate coating over phosphorylated chitosan film by a biomimetic method. *Biomaterials* 20, 879-884.
- Wan Y., Wu Q., Wang S., Zhang S. y Hu Z. (2007). Mechanical properties of porous polylactide/chitosan blend membranes. *Macromolecular Materials and Engineering* 292, 598-607.
- Wopenka B. y Pasteris J. (2005). A mineralogical perspective on the apatite in bone. *Materials Science and Engineering: C* 25, 131-143.
- Wu, H., Wan, Y., Cao, X. y Wu, Q. (2008). Proliferation of chondrocytes on porous poly(dl-lactide)/chitosan scaffolds. *Acta Biomaterialia* 4, 76-87.
- Zhang, Y., Shan, W., Li, X., Wei, J., Li, H., Ma, J. y Yan, Y. (2012). Bioactivity and cytocompatibility of dicalcium phosphate/poly(amino acid) biocomposite with degradability. *Applied Surface Science* 258, 2632-2638.